



Université de Perpignan **Via Domitia**

Université Via
Domitia
Perpignan - France



Université Ibn Zohr
Faculté des Sciences
Agadir - Maroc

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de
DOCTEUR

De l'Université Via Domitia de Perpignan

&

De l'Université Ibn Zohr d'Agadir

Spécialité: **Chimie Physique**

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

Par : **Idriss BAKAS**

Soutenue publiquement le 17 Décembre 2012

Devant la commission d'examen composée de :

Ali ASSABANE	Professeur, Faculté des Sciences Agadir, Maroc (Président)
Saad Alami YOUNSSI	Professeur, Faculté des Sciences Techniques Mohammedia, Maroc (Rapporteur)
Mohammed BOUJTITA	Maître de Conférences HDR, Faculté des Sciences Techniques de Nantes, France (Rapporteur)
Thierry NOGUER	Professeur, Université de Perpignan Via Domitia, France (Examinateur)
El habib AIT ADDI	Professeur habilité, École Supérieure de Technologie d'Agadir, Maroc (Co-encadrant)
Régis ROUILLOON	Professeur, Université de Perpignan Via Domitia, France (directeur de thèse)
Yhya AIT ICHOU	Doyen, Professeur, Faculté des Sciences Agadir, Maroc (directeur de thèse)

Dédicaces

❖ Je dédie cette thèse à ... ❖

A la mémoire de mon Père Ahmed

Je dédie cet événement marquant de ma vie à la mémoire de mon père disparu trop tôt. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'un fils qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !

A ma très chère mère El haja Sultana

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon très cher oncle El haj OMAR et A ma chère Tente El haja HAJOU

Vous étiez mes deuxièmes parents, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je vous porte.

Mon ange gardien et mon fidèle compagnant dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse.

Vous avez toujours été présents pour les bons conseils.

Votre éducation et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie professionnelle et personnelle.

Veuillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts.

Dédicaces

A mes chers frères et sœurs

Fadma, Moushamed, Saadia, Abbderahim, Ibrahim, Aicha

A mes chers cousins et cousines.

Khadija, Hassan, Said, Awicha, Moushamed

*En témoignage de l'attachement, de l'amour et de
l'affection que je vous porte.*

*Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus
profond et mon affection la plus sincère.*

A mes chers petits neveux

Soufiane, Azedine, Ahmed, Yassine

*Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour
vous, Votre joie et votre gaieté me comblient de bonheur.*

*Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser
à votre tour vos vœux les plus chers.*

Remerciements

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans cette thèse représente le fruit d'une collaboration franco-marocaine entre le Laboratoire de l' Institut de Modélisation et d'Analyse en Géo-Environnement et Santé (IMAGES) de l'université de Perpignan Via Domitia en FRANCE, dirigé par le Professeur **Thierry NOGUER** et le laboratoire AQUAMAR, Equipe de Matériaux, Photocatalyse et Environnement (EMPE), de la faculté des sciences Ibn Zohr d'Agadir au MAROC, dirigé par le Professeur **Yhya AIT ICHOU**. Les études réalisées ont en particulier contribué à l'exécution d'un projet de collaboration franco-marocaine, qui'a bénéficié du soutien financier du programme Hubert Curien «Volubilis» MA/09/215 (2009-2012)

En rédigeant cette dernière page de manuscrit, je suis obligé de reconnaître que la réalisation de cette thèse a exigé beaucoup de patience et de dévotion personnelle, tout au long de ces nombreuses années passées au sein des deux laboratoires. Ce fruit récolté est issu de beaucoup de recherche et de beaucoup d'aide reçue de nombreuses personnes que je tiens à remercier ici :

Je tiens à exprimer ma très profonde gratitude à mes directeurs de thèse **Régis ROUILLOU**, de l'Université de Perpignan Via Domitia (France) et **Yhya AIT ICHOU**, de l'Université Ibn Zohr d'Agadir (Maroc), pour m'avoir encadré durant mes travaux de thèse avec efficacité et disponibilité. Pour leur aide précieuse ainsi que leur soutien et leur confiance dont ils m'ont honoré tout au long de ces années de travail en commun. Je leur adresse ici ma sincère et profonde reconnaissance : qu'ils soient certains de ma gratitude.

Je remercie également Monsieur **El Habib AIT ADDI**, professeur à l'Ecole Supérieure de Technologies d'Agadir (ESTA) et co-encadrant de ce travail de thèse, pour sa sympathie, pour son soutien, ses idées et conseils, ainsi que pour son aide précieuse.

Une pensée particulière est accordée à Monsieur **Thierry NOGUER**, directeur du laboratoire IMAGES, et professeur à l'Université Via Domitia de Perpignan (France), pour sa grande disponibilité, son ouverture d'esprit, sa bonne humeur, ses conseils sincères et fructueux durant nos nombreuses discussions.

Une partie de ce manuscrit n'aurait pu être écrite sans les expériences réalisées par Madame **Elena PILETSKA** au sein de laboratoire Cranfield Health de l'université de Cranfield (Angleterre), c'est un grand plaisir de la remercier pour sa participation à mon travail de thèse.

Un grand Merci à ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail : **Ewa MOCZKO** post-doc au laboratoire Cranfield Health de l'université de Cranfield (Angleterre), **Georges ISTAMBOULIE** post-doc au laboratoire IMAGES de l'Université de Perpignan Via Domitia (France)

Remerciements

Je tiens également à remercier Monsieur **Ali ASSABBANE**, professeur à la faculté des sciences de l'Université Ibn Zohr d'Agadir, pour son soutien et son encouragement.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur **Mohammed BOUJTITA**, maitre de conférences à la faculté des sciences et techniques de Nantes (France), Monsieur **Saad Alami YOUNSSI**, professeur à la Faculté des sciences et technique du Mohammedia (Maroc), d'avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteur de ce travail.

J'adresse un grand merci à tous les doctorants et ex-doctorants des deux laboratoires (IMAGES et EMPE) qui ont fait régner une ambiance chaleureuse et dynamique pendant les années de ce travail.

Mes dernières pensées iront vers ma famille, et surtout mes parents, qui m'ont permis de poursuivre mes études jusqu'à aujourd'hui.

Résumé

RESUME

L'analyse des insecticides organophosphorés à l'état de traces dans des échantillons complexes tels que les matrices environnementales ou les denrées alimentaires nécessite une étape de purification avant l'analyse afin de limiter la présence d'effets de matrice. L'extraction sur phase solide (SPE) est devenue la méthode de choix pour ce type de traitement de l'échantillon. Divers supports d'extraction sont disponibles mais ils peuvent entraîner des coexactions d'interférents gênant l'analyse. Afin de pallier ce manque de sélectivité, des supports sélectifs fondés sur des mécanismes de reconnaissance moléculaire ont été développés. Les polymères à empreintes moléculaires appelés MIPs (molecularly imprinted polymers) qui possèdent des cavités spécifiques complémentaires d'une molécule empreinte, ont été envisagés comme support d'extraction sélective des insecticides organophosphorés (OPs) les plus couramment utilisés. Dans un premier temps, une modélisation moléculaire en utilisant un logiciel SYBYL 7.0 (Tripos Inc., St Louis, MO, USA) pour sélectionner des monomères fonctionnels présentant une bonne affinité pour les OPs, en particulier le méthidathion, le malathion, le diméthoate et le fenthion, a été réalisée. Les monomères sélectionnés ont été utilisés pour synthétiser les polymères (MIPs) par voie radicalaire. Les MIPs synthétisés sont caractérisés par les isothermes de Langmuir-Freundlich et par l'analyse microscopique (MEB). L'étude de l'effet de plusieurs paramètres sur la rétention des insecticides par les MIPs sous forme de supports SPE a montré que la polarité élevée des solutions de percolation diminue cette rétention : cette étude a donné l'hexane comme solvant de percolation préféré, grâce à sa polarité faible et à sa miscibilité avec l'huile d'olive. Une étape de lavage qui permet de minimiser des interactions non spécifiques a été optimisée pour chaque insecticide. Cette méthode d'extraction a été appliquée à des matrices aqueuses et des rendements d'extraction élevés ont été atteints grâce à une étude de l'influence du pH et de la force ionique. Finalement le protocole optimisé est utilisé pour l'extraction des insecticides à partir d'huile d'olive et des résultats très intéressants ont été obtenus avec des limites de détection inférieures aux limites autorisées. Un système de dosage simple et rapide des métabolites des insecticides utilisés, basé sur la combinaison de l'extraction par des cartouches de MIPs et une détection par biocapteur ampérométrique a été également utilisé.

Mots-clés : Polymères à empreintes moléculaires, Insecticides organophosphorés, Huile d'olive

Abstract

ABSTRACT

The analysis of organophosphate insecticides residues in complex samples such as the environmental matrices or the foodstuffs is remaining hard considering the presence of matrices effect. For this, a sample clean-up is required to clean the sample and preconcentrate the insecticides before chromatography analysis, in order to identify and quantify them easily. Solid phase extraction has become the method of choice for the treatment of such complex samples. Various extracting sorbents are available but coextraction of interfering compounds can be observed. Thus, polymeric sorbents called MIPs (molecularly imprinted polymers) developing a binding based on a molecular recognition mechanism have been suggested as sorbent for the selective extraction of the organophosphate insecticides which are some of the most commonly used pesticides.

Firstly, a molecular modelling by using a SYBYL 7.0 software (Tripos Inc., st. Louis, MB, the USA) to select functional monomers presenting a good affinity for the organophosphate insecticides, particularly methidathion, malathion, dimethoate and fenthion was realized. The selected monomers were used for synthesized polymers (MIPs) by radicalaire way. Then synthesized MIPs were characterized using the Langmuir-Freundlich isotherms and the microscopic analysis (MEB). The effect of several parameters on the binding of insecticides using MIPs as sorbent in slide phase extraction (SPE) was studied; it shows that the high polarity of the percolation solutions decreases this binding. Therefore, the hexane seems to be the best solvent of percolation, due to its low polarity and to its miscibility with olive oil. The washing step which allows minimizing non specific interactions was optimized for each insecticide. This extraction method was applied to aqueous matrices and high extraction yields were obtained after studying of the effect of pH and the ionic strength. Finally the optimized protocol was used for the selective extraction of insecticides from olive oil: very interesting results were obtained with limits of detection lower than the authorized limits. A simple and fast system for analysis of the metabolites insecticides, based on the association of the extraction using MIPs cartridges and detection by amperometric biosensor was also used.

Keywords: *Molecularly imprinted polymers, Organophosphate insecticides, Olive oil*

Liste de publications et de communications

PUBLICATION :

- ❖ **Idriss Bakas**, Najwa Ben Oujji, Ewa Moczko, Georges Istamboulie, Sergey Piletsky, Elena Piletska, Ihya Ait-Ichou, Elhabib Ait-Addi, Thierry Noguer, Régis Rouillon. **Molecular imprinting solid phase extraction for selective detection of methidathion in olive oil.** Analytica Chimica Acta, 734 (2012) 99-105
- ❖ Najwa Ben Oujji, **Idriss Bakas**, Georges Istamboulie, Ihya Ait-ichou, Elhabib Ait-addi, Regis Rouillon, Thierry Noguer. **Acetylcholinesterase immobilized on magnetic beads for pesticides detection: Application to olive oil analysis.** Sensors 12 (2012) 7893-7904
- ❖ **Idriss Bakas**, Najwa Ben Oujji, Ewa Moczko, Georges Istamboulie, Sergey Piletsky, Elena Piletska , Ihya Ait-Ichou, Elhabib Ait-Addi, Thierry Noguer, Régis Rouillon ¹. **Computational and experimental investigation of molecular imprinted polymers for selective extraction of dimethoate and its metabolite omethoate from olive oil.** Journal of Chromatography A, Accepted with corrections, Novembre 2012
- ❖ Najwa Ben Oujji, **Idriss Bakas**, Georges Istamboulie, Ihya Ait-ichou, Elhabib Ait-addi, Regis Rouillon, Thierry Noguer. **Sol-gel immobilization of acetylcholinesterase for biosensor determination of organophosphate pesticides in olive oil.** Journal of Food Control, 30 (2013) 657-661

ACTE DE CONGRES

- ❖ Ben Oujji Najwa **Bakas Idriss**, Istamboulie Georges, Ait-Addi Elhabib, Rouillon Régis, Ait-Ichou Ihya, Noguer Thierry. **Biocapteur à acétylcholinestérase pour la détection des insecticides organophosphorés**

Liste de publications et de communications

utilisés en oléiculture. 2^{ème} Colloque International «chimie, environnement et développement durable» Rabat Maroc 20 - 21 Octobre 2011

- ❖ **Bakas Idriss**, Ben Oujji Najwa, Istamboulie Georges, Moczko Ewa, Piletsky Sergey,Ait-Addi Elhabib, Noguer Thierry, Ait-Ichou Ihya, Rouillon Régis. **Modélisation moléculaire et synthèse des polymères à empreintes moléculaires (MIPs) pour la pré-concentration des insecticides organophosphorés à partir des solvants organiques polaire et apolaire et d'huile d'olive.** 2^{ème} Colloque International «chimie, environnement et développement durable» Rabat Maroc 20 - 21 Octobre 2011

- ❖ **Bakas Idriss**, Ben Oujji Najwa , Istamboulie Georges, Moczko Ewa, Piletsky Sergey,Ait-Addi Elhabib, Noguer Thierry ,Ait-Ichou Ihya, Rouillon Régis . **Extraction solide-liquide par des polymères à empreintes moléculaires (MIP) et détection par CLHP et biocapteur enzymatique des résidus d'insecticides organophosphorés dans l'huile d'olive.** 42ème Congrès du Groupe Français des Pesticides -ENSI-Poitiers France 30 mai au 1er juin 2012

PRESENTATION ORALE :

- ❖ **I.Bakas**, N. Ben Oujji, G. Istamboulie, E. Moczco, E. Ait-Addi, R. Rouillon, J-L. Marty, I. Ait-Ichou. T. Noguer. **Use of molecular modeling to design molecularly imprinted polymers for selective extraction of organophosphorus insecticides from olive oil**, XVI èmes rencontres transfrontalières « capteurs et biocapteurs » Toulouse France 29-30 septembre 2011-

- ❖ Ben Oujji Najwa , **Bakas Idriss**, Istamboulie Georges, Ait-Addi Elhabib, Rouillon Régis, Ait-Ichou Ihya ,Noguer Thierry .**Biocapteur à acetylcholinestérase pour la détection des insecticides organophosphorés utilisés en oléiculture.** 2^{ème} Colloque International «chimie, environnement et développement durable» Rabat Maroc 20 - 21 Octobre 2011

Liste de publications et de communications

- ❖ Bakas Idriss, Ben Oujji Najwa, Istamboulie Georges, Moczko Ewa, Piletsky Sergey, Ait-Addi Elhabib, Noguer Thierry, Ait-Ichou Ihya, Rouillon Régis. **Modélisation moléculaire et synthèse des polymères à empreintes moléculaires (MIPs) pour la pré-concentration des insecticides organophosphorés à partir des solvants organiques polaire et apolaire et d'huile d'olive.** 2^{ème} Colloque International «chimie, environnement et développement durable» Rabat Maroc 20 - 21 Octobre 2011

- ❖ Bakas Idriss, Ben Oujji Najwa, Istamboulie Georges, Moczko Ewa, Piletsky Sergey, Ait-Addi Elhabib, Noguer Thierry, Ait-Ichou Ihya, Rouillon Régis. **Extraction solide-liquide par des polymères à empreintes moléculaires (MIP) et détection par CLHP et biocapteur enzymatique des résidus d'insecticides organophosphorés dans l'huile d'olive.** 42^{ème} Congrès du Groupe Français des Pesticides -ENSI-Poitiers France 30 mai au 1er juin 2012

- ❖ Bakas Idriss, Ben Oujji Najwa, Istamboulie Georges, Moczko Ewa, Piletsky Sergey, Ait-Addi Elhabib, Noguer Thierry, Ait-Ichou Ihya, Rouillon Régis. **Polymères à empreintes moléculaires (MIPs) pour la pré-concentration des insecticides organophosphorés à partir d'huile d'olive.** 1^{er} Congrès Pluridisciplinaire des Doctorants de l'UPVD Perpignan France 7 au 8 juin 2012

- ❖ Ben Oujji Najwa, Bakas Idriss, Istamboulie Georges, Ait-Addi Elhabib, Rouillon Régis, Ait-Ichou Ihya, Noguer Thierry. **Développement de biocapteur pour la détection des organophosphorés utilisés pour le traitement des oliviers.** 1^{er} Congrès Pluridisciplinaire des Doctorants de l'UPVD Perpignan France 7 au 8 juin 2012

- ❖ Ben Oujji Najwa, Bakas Idriss, Istamboulié Georges, Ait-Ichou Ihya, Ait-Addi Elhabib, Rouillon Régis and Noguer Thierry: **Biosensors based on immobilisation of acetylcholinesterase on magnetic microbeads and sol gel**

Liste de publications et de communications

for detection of organophosphorus used for the treatment of olive trees.
Second International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences, Brasov, Romania. May 24th - 27th, 2012.

PRESENTATION PAR AFFICHE :

- ❖ Najwa Ben Oujji, Idriss Bakas, Georges Istamboulie, Elhabib Ait-Addi, Ihya Ait-Ichou, Régis Rouillon, Thierry Noguer. **Biosensor for the detection of organophosphates used in the treatment of olive trees** XVI èmes rencontres transfrontalières « capteurs et biocapteurs » Toulouse France 29-30 septembre 2011.
- ❖ I.Bakas, N. Ben Oujji, G. Istamboulie, E. Moczco, I. Ait-Ichou, E. Ait-Addi, R. Rouillon, J-L. Marty, T. Noguer. **Synthèse et utilisation des polymères à empreintes moléculaires (MIP) pour l'extraction des insecticides organophosphorés à partir d'huile d'olive.** 9ème congrès francophone de l'AfSep sur les sciences séparatives et les couplages 23-25 mars 2011 Université Paul Sabatier, Toulouse France
- ❖ Ben Oujji Najwa, Bakas Idriss, Istamboulie Georges, Moczco Ewa, Ait-Ichou Ihya, Ait-Addi Elhabib, Rouillon Régis, Marty Jean-Louis, Noguer Thierr. **Biosensors and MIPs for organophosphate control in olive.** XV Trobada Transfronterera de Sensors i Biosensors - Sant Carles de la Ràpita Spain. Septembre 16th, 17th, 2010.

Sommaire

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES TABLEAUX	4
LISTE DES FIGURES	6
INTRODUCTION GENERALE.....	10

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

NOTIONS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LA MATRICE BIOLOGIQUE UTILISEE, LES MOLECULES CIBLES, LES PHENOMENES D'ADSORPTION ET LES METHODES DE DETECTION UTILISEES.

I) L'huile d'olive	14
I.1. Généralités	14
I.2. Production et consommation.....	14
I .3. Composition et caractéristiques	16
I .4. Les effets bénéfiques de l'huile d'olive sur la santé	17
II) Les pesticides	17
II.1. Généralités	18
II.2. Les pesticides organophosphorés	19
II.3. Techniques d'analyses usuelles pour les insecticides organophosphorés	21
III) L'adsorption	25
III.1. Généralités.....	25
III.2. Modèles d'isothermes	25
III.2.1.Isotherme de Langmuir	25
III.2.2.Isotherme de Freundlich.....	26
III.2.3. Autres modèles	27
IV) Méthodes de détection utilisées	27
IV.1. Les biocapteurs	27
IV.1.1. Définition	27
IV.1.2. Le bio-récepteur : l'acétylcholinestérase	29
IV.1.3. Les biocapteurs électrochimiques	29
IV.1.3.1. Détection potentiometrique	29
IV.1.3.2. Détection ampérométrique	30

Sommaire

IV.1.3.3. Détection Impédancemétrique	30
IV.2. La chromatographie liquide à haute performance HPLC-UV	31

CHAPITRE II

POLYMERES A EMPREINTE MOLECULAIRE ET METHODES D'EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE (SPE)

I. Introduction.....	33
II. Les polymères a empreintes moléculaires : principe et applications.....	33
II.1. Principe général de l'impression moléculaire	33
II. 2 . Définition des composantes du système de polymérisation	35
II.2.1. Les amorceurs.....	35
II.2.2. Les cibles	36
II.2.3. Les monomères fonctionnels	36
II.2.4. Les monomères réticulants	38
II.2.5. Le solvant porogène.....	39
II.3. Complexation entre molécule cible et monomères fonctionnels.....	39
II.3.1. Approche covalente	39
II.3.2. Approche non-covalente	40
II.3.3. Approche semi-covalente	43
II.4. Différents modes de fabrication	45
II.4.1. Le polymère monolithique.....	45
II.4.2. Les billes sphériques.....	46
II.4.3. Les membranes	49
II.5. Molécules cibles et Applications	50
II.5.1. Application en séparation	50
II.5.2. Application en tests immunologiques.....	52
II.5.3. Application dans les Capteurs	54
II.5.4. Application dans la synthèse et la catalyse.....	56
II.5.5. Autres applications	59
III. L'extraction sur phase solide (solide-liquide)	60
III.1. Introduction	60
III.2 .Principe.....	61
III.3 .Méthode conventionnelle d'extraction sur phase solide	62
III.4 .Paramètres clés de l'extraction sur phase solide	64

Sommaire

III.4 .1. Le volume de fin de fixation	64
III.4 .2. La capacité.....	65
III.5. Extraction en différé et extraction en ligne	66
III.5. 1. Extraction en différé.....	66
III.5. 1.1. Principe.....	66
III.5. 1.2. Matériel d'extraction	66
III.5. 1.2. 1. Les cartouches	66
III.5. 1.2. 2. Les disques	67
III.5. 2.Extraction en ligne	69
III.5. 2.1. Principe.....	69
III.5. 2. 2. Les précolonnes.....	72
III.6. Les différents adsorbants utilisés	72
III.6. 1. Les adsorbants polaires	72
III.6. 2. Les adsorbants apolaires.....	73
III.6. 3. Les échangeurs d'ions	74
III.6. 4. Les supports mixtes	74
III.6. 5. Limitations des supports conventionnels	75
III.7. Extraction solide liquide en utilisant les MIPs (MISPE)	77
IV. Conclusion	78

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III

MODELISATION MOLECULAIRE ET VALIDATION EXPERIMENTALE

I. Introduction.....	80
II. Partie expérimentale.	81
II.1. La modélisation moléculaire	81
II.1.1. Principe	81
II.1.2. Minimisation de structure	82
II.1.2 .1. Méthode des champs de force	82
II.1.2 .2. Méthode de minimisation	83
II.1.3. Les charges	85
II.1.4. Le criblage de la molécule cible	87
II.1.5. Conception des polymères par ordinateur	88
II.2. Les supports polymériques	89

Sommaire

II.2.1. Préparation des polymères non imprimés utilisés dans la microplaque	89
II.2.2. Préparation des polymères à empreintes moléculaires	90
II.2.3. Extraction sur solide-liquide SPE.....	90
II.2.4. Adsorption en utilisant les microplaques.....	91
III. Résultats et discussion.....	92
III.1. Sélection des monomères par modélisation	92
III.2. Validation expérimentale	97
III.2.1. Corrélation polymères virtuels-polymères réels	97
III.2.2. Extraction solide-liquide en utilisant les MIPs	103
IV. Conclusion	108

CHAPITRE IV

SYNTHESE ET CARACTERISATION DES POLYMERES A EMPREINTES MOLECULAIRES

I. Introduction.....	110
II. Partie expérimentale	110
II.1. Synthèse.....	110
II.2. Conditions expérimentales	113
II. 3. Isothermes d'adsorption	113
II. 4. Microscope Electronique à Balayage (MEB)	114
III). Résultats et discussion	115
III. 1. Cinétique d'adsorption	115
III. 2. Isothermes d'adsorption (concentration en insecticides constante et..... masse de polymère variable)	117
III. 3. Isothermes d'adsorption (concentration en insecticides variable et..... masse de polymère constante).....	119
III. 4. Analyse morphologique	126
IV. Conclusion	128

CHAPITRE V

OPTIMISATION DU PROTOCOLE D'EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE (SPE) EN UTILISANT LES POLYMERES A EMPREINTES MOLECULAIRES COMME PHASE STATIONNAIRE

I. Introduction.....	130
----------------------	-----

Sommaire

II. Partie expérimentale	130
II. 1. Présentation des différents MIPs synthétisés.....	130
II. 2. SPE en milieu organique	131
II. 3. SPE en milieu aqueux.....	131
III. Résultats et discussion.....	132
III. 1. Effet de quantités des réactifs sur la sélectivité de MIP	132
III. 1. 1. Effet du ratio molaire : molécule cible/monomère fonctionnel	132
III. 1. 2. Effet du monomère réticulant (crosslinker)	134
III. 2 .Optimisation des conditions SPE	136
III. 2. 1. Quantité de polymère empaqueté dans les cartouches SPE	136
III. 2. 2. Effet du débit de percolation	137
III. 2. 3. Effet du solvant de percolation.....	138
III. 2. 4. Effet du volume de percolation	141
III. 2. 5. Optimisation de la solution de lavage	143
III. 2. 5. 1. Optimisation de la solution de lavage pour le méthidathion	143
III. 2. 5. 2. Optimisation de la solution de lavage pour le diméthoate	147
III. 2. 5. 3. Optimisation de la solution de lavage pour le malathion	150
III. 2. 5. 4. Optimisation de la solution de lavage pour le fenthion.....	151
III. 2. 6. Sélectivité des MIPs synthétisés	153
III. 3. Application aux solutions aqueuses	156
III. 3. 1. Effet du volume	156
III. 3. 2. Effet du pH.....	158
III. 3. 3. Effet de la force ionique.....	160
VI. Conclusion	161

CHAPITRE VI

APPLICATION DES POLYMERES A EMPREINTES MOLECULAIRES AU « CLEAN-UP» D'UN ECHANTILLON NATUREL ET DETECTION PAR HPLC-UV ET BIOCAPTEUR ENZYMATIQUE : CAS DE L'HUILE D'OLIVE DOPEE PAR DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORES

I .Introduction.....	163
II. Partie expérimentale	164
II. 1. Les MIPs utilisés	164
II.2. Méthodes de préparation des échantillons.....	164

Sommaire

II. 2.1. Extraction solide-liquide sur cartouches MIPs	164
II. 2.2. Extraction solide-liquide sur cartouche C ₁₈	166
II. 2.2.1.Extraction liquide-liquide	166
II. 2.2.2. Purification sur colonnes C ₁₈	166
II. 3. Détection ampérométrique des insecticides organophosphorés	166
III .Résultats et discussion.....	168
III. 1. Extraction des insecticides organophosphorés à partir d'huile olive	168
III. 2. Validation de la méthode.....	173
III. 3. Les limites de détection et limites de quantification	175
III. 4. Comparaison avec les méthodes conventionnelles utilisant les cartouches C ₁₈	176
III. 5. Effet de la matrice	177
III. 6. Durée de vie des MIPs	180
III. 6. Combinaison MIPs-biocapteur.....	181
VI. Conclusion	184
CONCLUSION GENERALE	182
PERSPECTIVE.....	185
BIBLIOGRAPHIE	191
PERSPECTIVE	
ANNEXES	

LISTE DES ABREVIATIONS

***C :** Degré celsius

2,4-D : Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

AChE : Acétylcholinestérase

ACh-Cl : Acétylthiocoline

ASE: Accelerated solvent extraction;

ACN : Acétonitrile

AFNOR : Association française de normalisation

AIBN : Azoisobutyronitrile

ATC ADN : Acide désoxyribonucléique

cAMP : 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate

COI : Conseil Oléicole International

DCM : Dichlorométhane

DMF : N,N-diméthylformamide

DSPE : Extraction de phase solide dispersive (dispersive solid phase extraction)

DVB : Divinylbenzène

EGDMA : Ethyleneglycoldiméthacrylate

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay.

Eq : Equation

GC-ECD: Gas chromatography using electron-capture-detector

GC-MS : Gas chromatography using mass spectrometry detector

GC-PFPD : Gas chromatography/pulsed flame photometric detector

GC-QqQ-MS/MS : Chromatography-triple quadrupole mass spectrometry

HPLC-DAD: High performance liquid chromatography with diode array detection

HS-SPME: Solid phase microextraction in mode headspace

IFEN : Institut Français de l'Environnement

IR : Infrarouge

KD : Constante de dissociation

LDL : Lipoprotéines de basse densité (low density lipoprotein)

LLE : Extraction liquide-liquide (liquid-liquid extraction)

LMR : limite maximale résiduelle

Liste des abréviations

LOD: limite de détection

log P : Coefficient de partage

LOQ : limite de quantification

M : Médiateur

M : Molaire

MASE : Membrane assisted solvent extraction

MEB : Microscopie électronique à balayage

MeOH : Méthanol

mg : Milligramme

MIA: Molecularly imprinted sorbent assay

min : Minute

MIP : Polymère à empreinte moléculaire (Molecularly Imprinted Polymer)

mL : Millilitre

mm ou mmol : Millimole

n : Nombre des essais

NaNO₃ : Nitrate de sodium

nd : Non détectable

nm : Nanomètre

OMS : Organisation mondiale de la Santé

OPs : Organophosphates

PAH : Polycyclic aromatic hydrocarbon

PGC : Carbone graphite poreux

PTFE : Polytetrafluoroethylene

RIA : Radio-Immuno-Assay

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RSD : Relative standard déviation

SBSE : Stir-bar sorptive extraction

SE : solvant d'extraction

SEM : Scanning electron microscopy

SPE : Extraction sur phase solide (Solid phase extraction)

SPME : microextraction sur phase solide (solid phase microextraction)

T : Template = molécule cible = molécule à imprimer = molécule empreinte=analyte

TCNQ : Tetracyanoquinodimethane

TEM : Transmission electron microscopy

Liste des abréviations

TFA : *Acide trifluoroacétique*

TOTAD: *Through oven transfer adsorption desorption;*

UASEME: *Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction*

UV : *Ultraviolet*

Vf : *Volume de fin de fixation*

µl : *Microlitre*

Liste des tableaux

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. 1: Répartition de la production mondiale d'huile d'olive (campagne 2010/2011) [4].	15
Tableau I. 2: Répartition de la consommation mondiale d'huile d'olive (campagne 2010/2011) [5].	16
Tableau I. 3 Performances analytiques de certaines méthodes chromatographiques utilisées pour l'analyse des pesticides organophosphorés.....	24
Tableau II.1 : Réactions croisées de polymères imprimés (MIP) et de différents tests immunologiques commerciaux (ELISA et RIA) contre le cortisol et la corticostérone pour des substances de structure similaire (reproduit à partir de la référence [151].	53
Tableau II. 2 : Sensibilité de capteurs basés sur des MIPs en utilisant différents principes de transduction	56
Tableau III . 1: Classement des monomères fonctionnels suivant leurs interactions avec le méthidathion.	93
Tableau III . 2: Classement des monomères fonctionnels suivant leurs interactions avec le diméthoate.	94
Tableau III . 3: Classement des monomères fonctionnels suivant leurs interactions avec le malathion.	95
Tableau III . 4: Classement des monomères fonctionnels suivant leurs interactions avec le fenthion.....	97
Tableau IV . 1: Temps d'équilibre d'adsorption des insecticides organophosphorés par les polymères MIP et NIP	117
Tableau IV. 2 : Paramètres des isothermes d'adsorption représentés par le modèle Langmuir-Freundlich (A) et Scatchard (B).	125
Tableau V. 1 : Variation du pourcentage de rétention en fonction des quantités de polymère mis dans les cartouches SPE. (n= 3)	137
Tableau V. 2: Pourcentages de rétention sur MIPS et NIPs des insecticides étudiés en fonction de la nature du solvant percolé. (n =3)	139

Liste des tableaux

Tableau V. 3 : Pourcentages de fenthion détectés dans les fractions de lavage et d’élution des polymères NIP et MIP en fonction de la concentration en acétonitrile dans la solution de lavage. (n=3, RSD< 4,8)	152
Tableau V. 4: Pourcentage des insecticides organophosphorés détectés dans les fractions de lavage et d’élution après l’extraction en utilisant différentes MIPs (n=3).....	153
Tableau V. 5: Pourcentage des insecticides organophosphorés détectés dans les fractions de lavage et d’élution après l’extraction en utilisant les MIPs à base des formes oxon (métabolites) du diméthoate et du malathion.....	155
Tableau VI . 1: Polymères MIPs utilisés.....	164
Tableau VI . 2 : Protocoles d’extraction utilisés	165
Tableau VI . 3 : Limites de détection et de quantifications des insecticides organophosphorés étudiés	176
Tableau VI .4: Rétention des insecticides sur les MIPs après l’extraction à partir des solutions contenant différents pourcentages d’huile d’olive. (n= 3)	179
Tableau VI . 5 : Détection des insecticides par biocapteur après l’extraction par MIPs s partir de l’échantillon avec le mélange des trois- insecticides, ou à partir d’échantillon avec un seul insecticide.....	183

LISTE DES FIGURES

Figure I. 1: Structure générale des organophosphorés.	19
Figure I. 2: Schéma d'hydrolyse de l'acétylcholine.....	20
Figure I. 3: Exemple de l'interaction de l'AchE avec un composé organophosphoré.....	20
Figure I. 4 : Représentation schématique de principe de fonctionnement d'un biocapteur [46].	28
Figure I. 5: Un capteur ampérométrique, d'après [49].....	30
Figure II. 1: Représentation graphique du processus d'impression moléculaire ([73])	34
Figure II. 2: Structures des amorceurs radicalaires les plus couramment utilisés pour la préparation des MIPs.....	36
Figure II. 3: Structure des monomères fonctionnels couramment utilisés pour la préparation des MIPs.....	37
Figure II. 4: Structure des monomères réticulants classiquement utilisés pour la préparation des MIPs.....	38
Figure II. 5: Schéma représentant un exemple de préparation d'un polymère à empreintes moléculaires par voie covalente [85].	40
Figure II. 6 : Schéma de l'impression moléculaire par voie non-covalente d'un dipeptide par liaisons hydrogène avec l'acide méthacrylique (d'après la référence [97]).	41
Figure II. 7: Exemple d'impression moléculaire par voie semi-covalente dans laquelle le «template» polymérisable est lié directement au polymère (d'après la référence [115])......	44
Figure II. 8: Exemple d'impression moléculaire par voie semi-covalente dans laquelle le «template» et les monomères sont liés par un groupe espaceur (d'après la référence [116]).	45
Figure II. 9: Micrographes par SEM et TEM de polymères obtenus par différentes méthodes de polymérisation ([132]).....	48
Figure II. 10 : Chromatographie en phase gazeuse d'extraits de plasma humain. (A) après extraction standard liquide-liquide ; (B) après extraction en phase solide avec un polymère imprimé. Pic 1 : «template», R1=R2=Me, Pic 2 : saméridine, R1= Me, R2=Et, Pic 3 : étalon interne, R1=R2=Et. (Reproduit à partir de la référence [149])	52
Figure II. 11: (A) Représentation schématique d'un capteur par microgravimétrie piézoélectrique contenant, comme élément de reconnaissance, un polymère imprimé avec le S-propranolol ; (B) signal obtenu dans une solution contenant différents concentrations de S- et de R- propranolol (Reproduit à partir de la référence [155]).	55

Liste des figures

Figure II. 12 : Schémas représentant la manière dont un polymère imprimé dirige l'acétylation d'un stéroïde vers un groupement hydroxyle spécifique, en masquant les autres hydroxyles libres. (Reproduit à partir de la référence [177])......	59
Figure II. 13: Criblage d'une petite bibliothèque combinatoire de stéroïdes en mode HPLC sur garnissage MIP imprimé par la 11- α-hydroxyprogesterone : (A) polymère imprimé, (B) polymère contrôle [129]. Bibliothèque : 11- α-hydroxyprogesterone (molécule cible, 1), 11-β- hydroxyprogesterone (2), 17- α-hydroxyprogesterone (3), progesterone (4), 4-androstene-3,17-dione (5), 1,4-androstadiene-3 ,17-dione (6) , corticostérone (7), cortexone (8) ,11- déoxycortisol (9),cortisone (10), cortisone-21-acétate (11) , cortisol-21-acétate (12) (Reproduit à partir de la référence [85]).....	60
Figure II. 14 : Protocole général d'une extraction sur phase solide [180]	63
Figure II. 15 : Cartouches pour l'extraction sur phase solide. Adapté de [184,185]	67
Figure II. 16: Disque pour l'extraction sur phase solide et son dispositif [187]	68
Figure II. 17: Plaque SPE de 96 cartouches [188]	68
Figure II. 18: Couplage en ligne de l'extraction sur phase solide avec la chromatographie en phase liquide [181].....	69
Figure II. 19: Exemple d'effet de matrice en HPLC-MS ² . Analyse du triflumizol dans différents légumes dopés à la même quantité. Adapté de [200].....	76
Figure IV. 1: Schéma de synthèse du MIP MBAA -Methidathion.....	112
Figure IV. 2 : Cinétiques d'adsorption des insecticides organophosphorées sur les polymères MIPs et NIPs.	116
Figure IV. 3: Profils d'adsorption des insecticides organophosphorées sur les polymères MIP et NIP. Concentration en molécule cible : 10µg/mL dans ACN ; température ambiante ; volume solution : 1 mL	118
Figure IV. 4 : Isothermes d'affinité à l'équilibre des polymères incubés dans des solutions d'acétonitrile en présence de leurs insecticides respectifs.	121
Figure IV. 5 : Représentation selon Scatchard de l'adsorption des insecticides organophosphorés sur les polymères.....	123
Figure IV. 6 : Clichés MEB de MIP et NIP après broyage (clichés réalisés par Monsieur GORAND Dimitri, service de microscopie électronique de laboratoire PROMES-CNRS Université de Perpignan).....	127
Figure V. 1: Effet de la variation de la concentration de la molécule cible dans le milieu de polymérisation, sur le facteur d'impression des insecticides organophosphorés dans leur MIP.	

Liste des figures

(n=3, RSD < 3%). T = molécule cible, M= monomère fonctionnel, Ret = monomère réticulant.....	133
Figure V. 2 : Effet de la variation de la concentration en monomère réticulant dans le milieu de polymérisation, sur le facteur d'impression des insecticides organophosphorés dans leurs MIPs. (n=3, RSD < 3, 6%). T = molécule cible, M= monomère fonctionnel, Ret = monomère réticulant.....	135
Figure V. 3 : Effet du débit de percolation sur les rétentions par leurs Mips des insecticides organophosphorés. (n=3, RSD < 3, 9).....	138
Figure V. 4: Pourcentages de rétention sur MIPs des insecticides organophosphorés étudiés en fonction du volume de percolation de trois solvants. (n= 3).....	142
Figure V. 5: Pourcentages de méthidathion détectés dans les fractions de lavage et d'élution des polymères NIP et MIP. Lavage avec 2ml de différents solvants, et élution avec 1 ml de méthanol/2% TFA	145
Figure V. 6 : Pourcentages de méthidathion détectés dans les fractions de lavage et d'élution des polymères NIP et MIP en fonction de la variation de la concentration de dichlorométhane dans la solution de lavage. Lavage avec 2ml de mélange hexane / dichloromethane, et élution avec 1 ml de méthanol/2% TFA.....	146
Figure V. 7: Pourcentages de diméthoate détectés dans les fractions de lavage et d'élution des polymères NIP et MIP. Lavage avec 2ml de différents solvants, et élution avec 1 ml de méthanol/2% TFA	148
Figure V. 8 : Pourcentages de diméthoate détectés dans les fractions de lavage et d'élution des polymères NIP et MIP en fonction de la variation de la concentration de dichlorométhane dans la solution de lavage. Lavage avec 2ml de mélange hexane / dichloromethane, et élution avec 1 ml de méthanol/2% TFA.....	149
Figure V. 9: Pourcentages de malathion détectés dans les fractions de lavage et d'élution des polymères NIP et MIP. Lavage avec 2ml de différents solvants, et élution avec 1 ml de méthanol/2% TFA.....	150
Figure V. 10 : Pourcentages de fenthion détectés dans les fractions de lavage et d'élution des polymères NIP et MIP. Lavage avec 2ml de différents solvants, et élution avec 1 ml de méthanol/2% TFA.....	151
Figure V. 11 : Pourcentages d'insecticides organophosphorés retenues par leurs polymères (A : MIPs et B : NIPs) après lavage de chaque polymère en utilisant son protocole optimisé (n= 3, RSD < 3,1%).....	157

Liste des figures

Figure V. 12 : Effet du pH sur la rétention des insecticides organophosphorées par leurs MIPs à partir d'un échantillon aqueux de 10 mL (n=3 et RSD <4,0).....	159
Figure V. 13 : Effet de la force ionique sur la rétention des insecticides organophosphorées par leurs MIPs (n=3 et RSD <4,3).	160
Figure VI. 1 : Protocole de préparation des échantillons d'huile d'olive	165
Figure VI. 2 : Détection ampérométrique de la thiocholine	167
Figure VI. 3 : Chromatogrammes des solution d' elution d'insecticides (méthidathion, diméthoate, malathion, fenthion) après l'extraction de 1mL d'huile d'olive à travers les MIPs, NIPs et la silice C ₁₈ . Conditions chromatographiques en Annexe V	172
Figure VI. 4 : Courbes représentant les quantités d'insecticides extraites par MIPs, en fonction des quantités introduites dans huile d'olive.	174
Figure VI. 5: Chromatogrammes des solutions d'élution après l'extraction de méthidathion à partir de 10mL hexane/20%huile d'olive par MIP.....	178
Figure VI. 6 : Essais de détection des trois insecticides (forme oxon) par un biocapteur ampérométrique à AChE immobilisée dans une matrice sol-gel [237] : comparaison de l'inhibition obtenue avec des solutions standard (tampon) et après extraction à partir d'huile d'olive par MIPs (échantillons naturel)	182
Figure VII. 1: Les courbes de Nyquist de 1mM [Fe (CN) 6] 4/3 pour :(A) électrode modifiée par le NIP et (B) électrode modifiée par le MIP en utilisant une gamme de fréquences de 100mHz-100 kHz et un potentiel de 0.1V.....	190

INRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'huile d'olive est un élément clé du régime méditerranéen. Très présente dans l'alimentation des pays méditerranéens et préconisée par de nombreux diététiciens, elle fait l'objet de nombreuses recherches sur ses propriétés médicinales et cosmétiques. Elle est l'une des huiles végétales les plus anciennes et la seule qui peut être consommée sous sa forme brute sans traitement préalable.

Elle représente la source lipidique typique du régime méditerranéen, et sa consommation est associée à une protection contre plusieurs maladies : cardiovasculaires, désordres neurologiques, cancers du sein et du colon... ainsi qu'à ses propriétés antioxydantes. Ces bienfaits sont liés à sa composition en acides gras bien-équilibrée, où l'acide oléique est le composant principal et à la présence de biomolécules mineures, comme des vitamines et des antioxydants naturels.

La forte demande en huile d'olive vierge de bonne qualité est due non seulement à ses vertus de santé mais également à ses propriétés organoleptiques.

Au Maroc, l'huile d'olive bénéficie d'une connotation fortement économique et sociale. La superficie arboricole nationale est en grande partie composée de la culture de l'olivier érigeant cette dernière en tant que principale culture fruitière du pays. Toutefois, les capacités actuellement en exploitation évaluées à 590000 hectares demeurent bien loin du potentiel oléicole réel national.

Malgré l'importante production d'huile d'olive (130,000 tonnes) qui positionne le Maroc au 4^{ème} rang derrière l'ensemble des pays producteurs de l'Union Européenne, de la Tunisie et de la Syrie, le Maroc comme tous les pays méditerranéens qui cultivent les oliviers est confronté aux effets néfastes de ravageurs comme les insectes qui peuvent provoquer des

Introduction générale

dégâts importants sur les cultures et peuvent limiter considérablement la production, si leurs populations ne sont pas maîtrisées.

Les principaux ravageurs de l'olivier sont la cochenille noire, la teigne, la psylle et la mouche de l'olivier. Afin de limiter l'attaque des oliveraies par les ravageurs et maintenir ainsi un niveau de production élevé, des traitements phytosanitaires sont employés. Parmi les produits les plus utilisés, on trouve les insecticides organophosphorés et carbamates. Ces produits chimiques employés ne sont pas inoffensifs, et ils peuvent diminuer la qualité de l'huile extraite. En effet, tout résidu de ces insecticides présent sur le fruit peut se retrouver dans l'huile comme ces insecticides sont liposolubles. Étant donné leur toxicité pour les êtres humains, une attention toute particulière doit être apportée aux problèmes de sécurité alimentaire posés par ces contaminants.

Les méthodes classiques les plus utilisées jusqu'à présent pour la détection de ces insecticides sont basées sur des analyses qui utilisent des techniques chromatographiques en phase gazeuse couplée à différents détecteurs : spectrométrie de masse (CPG/MS), ionisation de flamme (FID), capteur électronique (ECD), phosphore d'azote (NPD). Bien que ces techniques soient très performantes et permettent de détecter de très faibles concentrations, elles montrent certaines limites comme un matériel coûteux, ainsi que le besoin d'un personnel qualifié. Ces analyses peuvent se faire par une méthode simple comme l'HPLC-UV si elle est précédée par des étapes de purification des échantillons.

L'extraction liquide-liquide a été pendant longtemps la méthode la plus couramment employée pour le traitement de l'échantillon, mais celle-ci est à présent supplantée par l'extraction sur phase solide qui offre une méthode plus rapide avec une consommation réduite en solvants organiques et des rendements d'extraction plus élevés grâce à la grande diversité des supports d'extraction disponibles qui peuvent donc être adaptés à la nature des composés recherchés. Toutefois, la rétention des analytes sur ces supports repose

Introduction générale

essentiellement sur la polarité. Ainsi, de nombreux composés interférents de polarité voisine à celle des analytes peuvent être coextraits, ce qui peut gêner leur identification et leur quantification. A cet effet, des supports sélectifs basés sur un mécanisme de reconnaissance moléculaire ont été développés afin de gagner en sélectivité en éliminant une grande majorité d'interférents. Dans ce contexte, une approche intéressante consiste à utiliser des supports polymériques à empreintes moléculaires.

Ces supports imprimés possèdent en fait des cavités ayant une complémentarité stérique et fonctionnelle avec la molécule cible. Leur potentiel lors de leur utilisation comme support d'extraction a déjà été largement démontré pour des analytes de différentes natures dans des échantillons complexes (environnementaux, alimentaires, fluides biologiques...). Lors de la percolation de l'échantillon suivie de l'étape de lavage, la présence de cavités spécifiques permet de retenir sélectivement les substances recherchées alors que les composés interférents sont éliminés. Cependant, la difficulté principale réside dans le choix des réactifs employés pour réaliser la synthèse du support et ainsi permettre la formation des cavités grâce à de fortes interactions non covalentes entre le monomère fonctionnel utilisé et la molécule empreinte.

L'objectif de cette thèse est principalement de simplifier la phase préparatoire avant la mesure en regroupant les étapes d'extraction et de purification des insecticides et de leurs produits de dégradation grâce à l'emploi de cartouches contenant des polymères à empreintes moléculaires (MIPs). En collaboration avec l'université de Cranfield (Angleterre), la technique de conception des matériaux à empreinte moléculaire utilisant une bibliothèque virtuelle de modèles moléculaires des monomères fonctionnels capables ou non d'interagir avec la molécule à analyser est employée. Cette méthode permet un gain de temps conséquent dans l'élaboration des nouveaux MIPs. Les potentialités des différents matériaux à empreintes

Introduction générale

moléculaires sont évaluées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC-UV).

Après extraction spécifique, un biocapteur est utilisé pour la détection des insecticides.

Le chapitre I présente un travail bibliographique sur l'huile d'olive qui est l'échantillon naturel à analyser, les insecticides organophosphorés et les méthodes d'analyses utilisées au cours de cette étude.

Le chapitre II s'appuie sur des travaux publiés afin d'expliquer la démarche suivie au cours de la préparation des MIPs ainsi que sur les utilisations qui en ont été faites. Ces matériaux, encore très peu développés, constituent la majeure partie de ce travail.

Le chapitre III décrit le développement d'une méthode de sélection des monomères fonctionnels, par modélisation, dans le but de faciliter la synthèse des polymères imprimés. Cette méthode est validée par des essais d'adsorption.

Dans le chapitre IV, nous nous sommes intéressés à la synthèse et à la caractérisation des polymères imprimés (MIPs) en utilisant des méthodes d'isothermes d'adsorption et des analyses morphologiques.

L'optimisation du protocole d'extraction solide-liquide en utilisant les MIPs ainsi que son application aux solutions aqueuses sont traitées dans le chapitre V.

Les supports à base des MIPs, optimisés dans le chapitre V, sont appliqués dans le chapitre VI, à l'extraction et à la préconcentration des insecticides organophosphorés présents dans l'huile d'olive. Cette méthode est validée par une comparaison avec des méthodes conventionnelles (cartouches C₁₈). Les potentialités des différents matériaux sont évaluées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Finalement, un biocapteur ampérométrique est utilisé pour la détection des métabolites (formes oxon) des insecticides organophosphorés utilisés présents dans de l'huile d'olive.

CHAPITRE I

**NOTIONS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LA
MATRICE BIOLOGIQUE UTILISÉE, LES
MOLECULES CIBLES, LES PHENOMÈNES
D'ADSORPTION ET LES MÉTHODES DE
DETECTION UTILISÉES**

I) L'huile d'olive

I.1. Généralités

L'étude de l'huile d'olive mérite une attention particulière, compte tenu de la place spécifique qu'elle occupe parmi les huiles de table, et ceci pour plusieurs raisons :

- l'huile d'olive est la plus ancienne huile connue; sa consommation remonte à l'antiquité,
- sa zone de production correspond à celle de la civilisation gréco-romaine et c'est grâce à l'extension de cette dernière que la culture de l'olivier, la production et la consommation de l'huile d'olive se sont répandues dans tout le bassin méditerranéen,
- l'huile qui est le jus d'un fruit est presque uniquement consommée à l'état vierge. Elle est pratiquement la seule aujourd'hui à avoir cette particularité.

Toutes les études démontrent que les régimes alimentaires à base d'huile d'olive sont bénéfiques pour la santé humaine en diminuant le risque de plusieurs maladies. De nombreuses recherches ont été faites pour en garantir sa pureté, son authenticité et sa qualité.

Elle est également la première huile sur laquelle on a observé l'influence de la variété, la région de culture et les conditions climatiques sur sa composition et ses caractéristiques [1].

I.2. Production et consommation

À l'échelle mondiale, la production d'huile d'olive ne représente qu'environ 2,5% des huiles de table [2], loin derrière l'huile de soja, l'huile de palme, l'huile de colza et l'huile de tournesol [3] ; mais elle occupe une place notable dans la consommation en lipides des pays méditerranéens : 54% de la consommation d'huile végétale en Grèce.

Après une forte augmentation au cours des années 1990, la production mondiale d'huile d'olive reste relativement stable depuis le début des années 2000 avec une production annuelle située entre 2,4 et 3,2 millions de tonnes [4]. Les variations observées d'une année à l'autre sont dues à la fois aux conditions climatiques et au fait que les olives ne se

Chapitre I

développent que sur des bois de 2 ans (récolte bisannuelle). La production mondiale est grandement influencée par celles de l'Espagne et de l'Italie qui représentent à elles seules près des 2/3 de la production mondiale (Tableau I.1).

Tableau I. 1: Répartition de la production mondiale d'huile d'olive (campagne 2010/2011) [4].

Pays	Production (x 1000 tonnes)	Production (%)
Espagne	1389,6	47,2
Italie	440	14,9
Grèce	300	10,2
Portugal	62,9	2,1
Chypre	6,5	0,22
France	5 ,6	0,19
Slovénie	0,7	0,02
Total Europe	2205,3	75,04
Syrie	180	6,12
Turquie	160	5,44
Maroc	130	4,42
Tunisie	120	4,08
Algérie	50	1,7
Total Monde	2938,5	

Depuis la campagne 1999/2000, seule l'Espagne a très significativement augmenté sa production d'huile d'olive, les autres pays ont eu une production stable voire légèrement décroissante (Italie, Grèce). La production marocaine a augmentée les dernières années, et elle se situe autour des 130 000 tonnes soit 4,42 % de la production mondiale. Les principaux pays producteurs sont également les principaux consommateurs de cette huile. Le tableau I.2 donne la consommation globale des principaux pays consommateurs d'huile d'olive.

Chapitre I

Tableau I. 2: Répartition de la consommation mondiale d'huile d'olive (campagne 2010/2011) [5].

Pays	Consommation (x 1000 tonnes)	Consommation (%)
Italie	660	22,1
Espagne	555,4	18,6
Grèce	230	7,7
France	113,6	3,8
Portugal	72	2,4
Allemagne	60,1	2,0
Royaume-Uni	57,7	1,9
Total Europe	1855,9	63,2
Etats-Unis	275	9,2
Syrie	128	4,2
Turquie	115	3,8
Maroc	90	3,0
Brésil	61	2,0
Algérie	45	1,5
Japon	35,5	1,18
Tunisie	30	1,0
Total Monde	2984	

Les tableaux I.1 et I.2 montrent que l'huile d'olive est principalement un produit méditerranéen, tant pour sa production que pour sa consommation. Cette production millénaire joue un rôle important dans l'économie de ce bassin et elle fait également partie de sa culture et de son régime alimentaire [6 ,7].

I .3. Composition et caractéristiques

L'huile d'olive contient un grand nombre de composés structurellement hétérogènes dont les principaux sont les triacylglycérols (>95%), une faible quantité d'acides gras libres, du glycérol, des pigments, et un grand nombre de composants dits «mineurs» présents en faibles quantités (0,5 à 15%) qui ont des effets bénéfiques. On peut séparer ces composés en tocophérols, phénols, composés aromatiques, hydrocarbures et stérols [8].

Aparicio et ses collaborateurs (1999) [9], ont estimé la contribution des composés phénoliques, des acides gras, l' α -tocophérol et les pigments dans la stabilité de l'huile, à

Chapitre I

environ 30%, 27%, 11% et 6% respectivement. De nombreux facteurs rassemblés dans quatre groupes principaux affectent les caractéristiques de l'huile d'olive : environnemental (sol, climat), agronomique (irrigation, fertilisation), culture (maturité et récolte du fruit) et technologique (stockage après la récolte, système d'extraction).

I .4. Les effets bénéfiques de l'huile d'olive sur la santé

De nombreuses recherches récentes ont confirmé les bienfaits de l'huile d'olive pour la santé. Riche en acides gras insaturés, principalement l'acide oléique, en antioxydants (polyphénols), en vitamine E et autres constituants, l'huile d'olive diminue le risque des maladies cardiovasculaires, le taux du mauvais cholestérol (LDL) dans le sang et protège contre la formation de cellules cancéreuses [10].

En effet, depuis la fin des années 50, des études épidémiologiques ont permis de constater que les maladies cardio-vasculaires, comme l'athérosclérose, la maladie coronarienne et l'infarctus ainsi que la mortalité dont ils sont responsables, n'avaient pas la même fréquence dans les pays du Nord de l'Europe que dans ceux du pourtour méditerranéen. Dans les pays méditerranéens où l'huile d'olive constitue la principale source de matières grasses dans l'alimentation quotidienne, on constate qu'il y a moins des gens souffrant de maladies cardio-vasculaires [11-13].

L'huile d'olive contient des anti-oxydants qui s'opposent à l'oxydation des lipoprotéines LDL, une des premières étapes importantes dans le développement de l'athérosclérose. Elle s'oppose, dans une certaine mesure, à l'agrégation des plaquettes et à la formation des caillots qui peuvent déclencher l'infarctus du myocarde. Par ailleurs, plusieurs études ont montré qu'un supplément en vitamine E entraîne une augmentation des taux d' α -tocophérol, aussi bien dans le plasma que dans les molécules des LDL [14,15].

II) Les pesticides

Chapitre I

II.1. Généralités

Un pesticide correspond à une substance répandue sur une culture pour lutter contre des organismes considérés comme nuisibles à l'homme et/ou à son environnement (virus, bactéries, champignons, plantes, vers, mollusques, insectes, oiseaux, rongeurs, autres mammifères etc). On qualifie de pesticides toutes les substances chimiques naturelles ou de synthèse utilisées en agriculture pour contrôler les différentes sortes de nuisibles, à l'exception des produits utilisés en médecine vétérinaire et en médecine humaine. Selon l'IFEN (1998), le terme pesticide, tel qu'il est utilisé par le grand public, englobe de très nombreux produits chimiques et biologiques. Ils sont définis par leur but :

- soit de protéger les productions végétales ou de détruire les indésirables dans les zones de production agricole. Ce sont les « produits phytosanitaires » des professionnels, ou les « produits phytopharmaceutiques » et « produits antiparasitaires à usage agricole » des juristes. Il existe actuellement 700 substances actives différentes homologuées entrant dans la composition d'une dizaine de milliers de spécialités commerciales ;
- soit de détruire ou repousser des organismes nuisibles pour l'homme, ses productions ou ses autres activités. Ce sont des pesticides non agricoles, soumis à une réglementation distincte.

On regroupe les pesticides selon leur famille chimique, dont les plus connues sont : les triazines, les carbamates, les urées substituées, les organophosphorés, les organochlorés , etc. Certains, comme les dérivés du cuivre, du soufre, la nicotine, les pyréthrines, les huiles végétales, des goudrons de bois, le chlorate de sodium sont utilisés depuis fort longtemps (certains depuis le XVIII ème siècle) pour des soins aux végétaux ou pour désherber. La façon la plus commode de classer les produits phytosanitaires est de les considérer selon la nature du ravageur visé. On distingue les trois grandes familles suivantes :

Chapitre I

- insecticides *stricto sensu* et espèces voisines : acaricides (acariens) et aphicides (pucerons). Sont aussi incluses les substances qui perturbent leur développement normal en empêchant l'éclosion des œufs (ovicides) et des larves (larvicides) ou la maturation sexuelle des adultes ;
- herbicides (désherbants totaux, sélectifs, débroussaillants, défanants et antigerminatifs) ;
- fongicides et fongistatiques.

II.2. Les pesticides organophosphorés

Les pesticides organophosphorés (OPs) sont des pesticides de seconde génération dérivés de structures de gaz neurotoxiques. Bien que moins persistants que les organochlorés, ils sont cependant beaucoup plus toxiques [16]. Ils s'attaquent au système nerveux. Les organophosphorés présentent une structure générale incluant un groupe P=O ou P=S, un groupe R₃ partant, sensible à l'hydrolyse et échangeable avec des réactifs nucléophiles, deux substituants R₁ et R₂ possédant une stabilité accrue vis-à-vis de l'hydrolyse (Figure I.1).

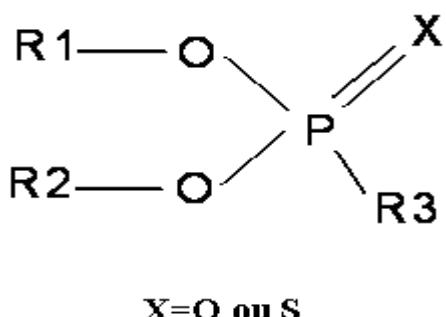


Figure I. 1: Structure générale des organophosphorés.

La plupart des insecticides organophosphorés sont des organothiophosphates et nécessitent une activation métabolique qui transforme le P=S en P=O [17]. Seuls les groupements P=O interagissent avec les estérases du type acétylcholinestérase. Leur action insecticide, tout comme leur toxicité pour les hommes, vient de l'inhibition de

Chapitre I

l'acétylcholinestérase (AchE). Il s'agit d'une enzyme terminant la neurotransmission en hydrolysant l'acétylcholine (Figure I.2).

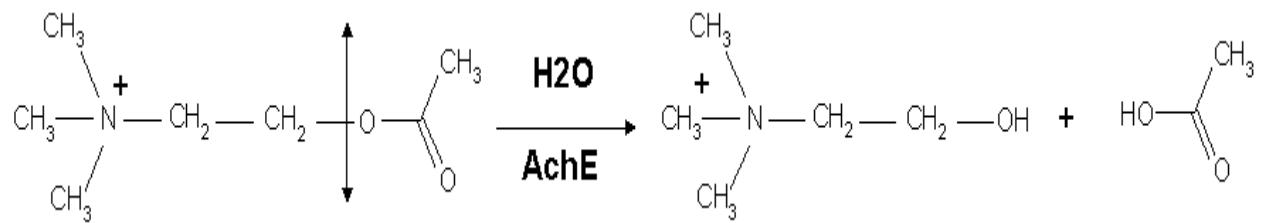


Figure I. 2: Schéma d'hydrolyse de l'acétylcholine.

Son site catalytique est constitué de plusieurs acides aminés qui ont un rôle précis dans l'hydrolyse de son substrat et les processus d'interaction avec des composés inhibiteurs [18, 19]. Les composés organophosphorés bloquent le site actif de l'AchE au niveau du résidu sérine par une attaque nucléophile produisant un adduit stable (Figure I.3).

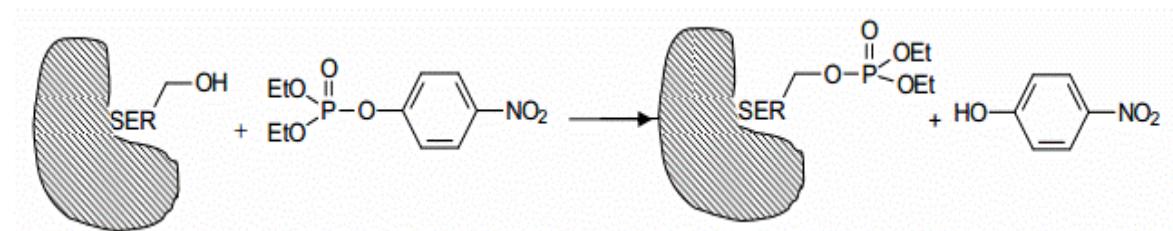


Figure I. 3: Exemple de l'interaction de l'AchE avec un composé organophosphoré
SER = Sérine.

Cette inactivation entraîne un excès d'acétylcholine provoquant une sur-stimulation cholinergique [20]. La toxicité de ces composés est fonction de leur capacité à être absorbés par l'organisme et ensuite de leur capacité à former des complexes stables avec l'AChE. Les paramètres déterminant la toxicité sont la labilité de la liaison P=X, l'hydrophobicité et l'encombrement stérique généré au niveau du site actif de l'enzyme.

Chapitre I

Un des exemples de pesticides organophosphorés est le methidathion. C'est un pesticide à large spectre c'est-à-dire touchant plusieurs espèces d'insectes, dont l'utilisation a été interdite par l'Union Européenne en 2010 [21]. Il figure dans la classification de l'OMS sous le sigle 1a c'est-à-dire extrêmement dangereux. Sa toxicité est liée à un de ses produits de dégradation : le methidathion-oxon. En effet, le methidathion conduit, par transformation de la fonction P=S en P=O, au methidathion-oxon dont la toxicité est plus élevée.

D'autres insecticides qui rentrent dans le cadre de cette étude, comme le malathion, le fenthion ou le dimethoate entrent dans la catégorie «modérément toxique» de la classification de l'OMS. Comme avec le méthidation, la toxicité de ces composées est issue d'un de ces métabolites, qui présentent des risques de génotoxicité et de carcinogénicité [22]. Leur structures chimique sont présentées Annexe I.

II.3. Techniques d'analyses usuelles pour les insecticides organophosphorés

Etant données la toxicité des pesticides et la législation en terme de LMR, des techniques analytiques ont été développés pour répondre aux besoins de détection et de dosage de ces substances dans des échantillons divers. Les techniques de détection usuelles des pesticides reposent sur deux étapes permettant l'analyse des composés à partir d'échantillons prélevés dans l'environnement :

- L'extraction du pesticide de la matrice complexe.
- La séparation puis la détection et enfin la quantification.

L'extraction du pesticide de sa matrice complexe, composée soit de sels et d'acides humiques dans le cas d'échantillons de sols, soit de protéines de sérum dans le cas d'échantillons sanguins ou encore d'acides ou autres dans les fruits, légumes et vins, est une étape délicate. Deux normes AFNOR, citées comme références [23], concernant l'analyse d'échantillons d'eau qui contiennent soit des pesticides organochlorés soit de l'atrazine et de

Chapitre I

la simazine (deux herbicides de la famille des triazines) décrivent une extraction par un solvant organique de type hexane ou dichlorométhane. Selon les propriétés physicochimiques des molécules, ce procédé d'extraction liquide/liquide peut s'avérer insuffisant voire inefficace pour récupérer les pesticides à partir d'une matrice complexe. Ainsi d'autres modes d'extraction, adaptés à la nature de l'échantillon, ont été développés afin d'optimiser le processus d'extraction, de permettre son automatisation et de diversifier les molécules analysées. Les traitements des échantillons, selon leur nature, pour permettre l'extraction des composés organophosphorés sont décrits de manière exhaustive par John [24]; par exemple, les échantillons cliniques sont essentiellement préparés par précipitation. Dans la grande majorité des autres échantillons, l'une des techniques les plus utilisées est l'extraction en phase solide (SPE). La grande diversité des phases adsorbantes disponibles commercialement permet de diversifier les analytes extraits. Sanchez-Ortega *et al.*, [22] ont développé l'application de la microextraction en phase solide (SPME), couplée à la chromatographie liquide haute performance, pour la détection des composés organophosphorés. L'intérêt de la SPME est de permettre simultanément l'extraction et la préconcentration d'un analyte à partir d'une matrice environnementale. Une technique originale, la SBSE (Stir-bar sorptive extraction) fait intervenir un agitateur magnétique recouvert de phase adsorbante [24]. L'extraction en phase solvant assistée par membrane (MASE : membrane assisted solvent extraction) repose, quant à elle, sur l'utilisation d'une membrane et le partage de l'analyte, à l'équilibre, entre la membrane et le milieu échantillonné [25]. Queleque soit la technique utilisée, les résultats d'extraction dépendent de la concentration en sels, du pH, du temps d'extraction, de la vitesse d'agitation et de la nature de la phase d'accueil du pesticide.

Les normes NF-EN 15662 et NF-EN 12393-2 préconisent l'emploi de la chromatographie en phase gazeuse (GC) pour les étapes de séparation, détection et quantification. Couplée à des détecteurs à ionisation de flamme, par photométrie de flamme

Chapitre I

ou encore à la spectrométrie de masse, la GC permet d'obtenir de hautes résolutions pour réaliser des analyses multi-résidus. Ainsi Wong *et al.*, [26] ont montré que le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à un détecteur par photométrie de flamme permettait d'obtenir des seuils de détection de $0,05\mu\text{g.L}^{-1}$.

Le couplage avec la spectrométrie de masse amène à des limites de détection très faibles de l'ordre de $0,005\mu\text{g.g}^{-1}$ [26]. Néanmoins, son utilisation est limitée par son incompatibilité avec des pesticides polaires ou thermolabiles [27] ou encore par la complexité de mise en œuvre pour les composés ioniques [24]. La chromatographie liquide haute performance (HPLC) présente une alternative intéressante et elle est de plus en plus utilisée.

La détection de ces substances repose donc sur l'extraction optimale des pesticides de leur matrice complexe et ensuite sur le dosage de très faibles quantités. Les enjeux pour l'évolution de ces techniques, étant données les réglementations européennes actuelles, sont de diminuer les limites de détection et d'optimiser l'extraction des pesticides.

Le tableau ci-dessous rassemble des données pertinentes pendant la période 2010-2011 concernant l'analyse de certains pesticides organophosphorés par des méthodes chromatographiques.

Chapitre I

Tableau I. 3 Performances analytiques de certaines méthodes chromatographiques utilisées pour l'analyse des pesticides organophosphorés

Pesticide	Méthode de détection	Méthode de préparation	LOD	Références
Chlorpyrifos	GC-MS GC-ECD	LLSE LLE	0,13 µg kg ⁻¹ 14,0 µg kg ⁻¹	Hassan <i>et al.</i> , 2010[28] Pinho <i>et al.</i> , 2010[29]
Diazinon	GC-QqQ MS/MS	DSPE	0,37 µg kg ⁻¹	Qu <i>et al.</i> , 2010[30]
Dichlorvos	GC-MS GC-MS GC-QqQ MS/MS	ASE HS-SPME DSPE	6,00 µg kg ⁻¹ 3,80 µg L ⁻¹ 1,50 µg kg ⁻¹	Wu <i>et al.</i> , 2011[31] Rodrigues <i>et al.</i> , 2010[32] Qu <i>et al.</i> , 2010[30]
Paraoxon	GC-MS	ASE	1,10 µg kg ⁻¹	Wu <i>et al.</i> , 2011[31]
Malathion	GC-MS GC-MS GS-MS GC/PFPD GC-MS GC-QqQ MS/MS	ASE SPME TOTAD SPE SPME DSPE	0,20 µg kg ⁻¹ 0,03 µg L ⁻¹ 0,07 µg L ⁻¹ 0,03 µg L ⁻¹ 2,00 µg kg ⁻¹ 0,22 µg kg ⁻¹	Wu <i>et al.</i> , 2011[31] Filho <i>et al.</i> , 2010b[33] Toledano <i>et al.</i> , 2010[34] Wang <i>et al.</i> , 2010[35] Filho <i>et al.</i> , 2010a[36] Qu <i>et al.</i> , 2010[30]
Parathion	GC-MS GC-MS HPLC-DAD GS-MS GC/PFPD GC-QqQ MS/MS	ASE HS-SPME UASEME TOTAD SPE DSPE	0,20 µg kg ⁻¹ 4,70 µg L ⁻¹ 0,10 µg L ⁻¹ 0,12 µg L ⁻¹ 0,02 µg L ⁻¹ 1,50 µg kg ⁻¹	Wu <i>et al.</i> , 2011[31] Rodrigues <i>et al.</i> , 2010[32] Wu <i>et al.</i> , 2010[37] Toledano <i>et al.</i> , 2010[34] Wang <i>et al.</i> , 2010[35] Qu <i>et al.</i> , 2010[30]
Parathion-methyl	GC-MS GC-MS HPLC-DAD GC-MS GC/PFPD GC-MS GC-QqQ MS/MS	ASE HS-SPME UASEME SPME SPE SPME DSPE	0,80 µg kg ⁻¹ 10,9 µg L ⁻¹ 0,10 µg L ⁻¹ 0,02 µg L ⁻¹ 0,03 µg L ⁻¹ 5,00 µg kg ⁻¹ 0,75 µg kg ⁻¹	Wu <i>et al.</i> , 2011[31] Rodrigues <i>et al.</i> , 2010[32] Wu <i>et al.</i> , 2010[37] Filho <i>et al.</i> , 2010b[33] Wang <i>et al.</i> , 2010[35] Filho <i>et al.</i> , 2010a[36] Qu <i>et al.</i> , 2010[30]
Phosmet	GC-MS HPLC-DAD	ASE UASEME	0,50 µg kg ⁻¹ 0,10 µg L ⁻¹	Wu <i>et al.</i> , 2011[31] Wu <i>et al.</i> , 2010[37]
Phorate	GC-MS GC-QqQ MS/MS	ASE DSPE	0,70 µg kg ⁻¹ 0,62 µg kg ⁻¹	Wu <i>et al.</i> , 2011[31] Qu <i>et al.</i> , 2010[30]
Trichlorfon	GC-MS GC-MS	SPME ASE	0,07 µg L ⁻¹ 5,1 µg kg ⁻¹	Filho <i>et al.</i> , 2010b[33] Wu <i>et al.</i> , 2011[31]

III) L'adsorption

III.1. Généralités

L'adsorption à l'interface soluté/solide est un phénomène de nature physique ou chimique par lequel des molécules présentes dans un effluent liquide ou gazeux, se fixent à la surface d'un solide [38]. Ce phénomène dépend à la fois de cette interface et des propriétés physico-chimiques de l'adsorbat [39]. Ce phénomène spontané provient de l'existence, à la surface du solide de forces non compensées, qui sont de nature physique ou chimique. Ces forces conduisent respectivement à deux types d'adsorption : la chimisorption et la physisorption.

Tous les systèmes adsorbant/adsorbat ne se comportent pas de la même manière. Les phénomènes d'adsorption sont souvent abordés par leur comportement isotherme. Les courbes isothermes décrivent la relation existante à l'équilibre d'adsorption entre la quantité adsorbée et la concentration en soluté dans un solvant donné à une température constante.

III.2. Modèles d'isothermes

Plusieurs lois ont été proposées pour l'étude de l'adsorption. Elles expriment la relation entre la quantité adsorbée et la concentration en soluté dans un solvant à une température donnée. Nous rappellerons ci-dessous les principales lois utilisées.

III.2.1.Isotherme de Langmuir

C'est le modèle le plus utilisé pour commenter les résultats trouvés au cours de l'adsorption des composés organiques en solution aqueuse. Nous résumons ci-dessous ses principales caractéristiques.

Chapitre I

A une température constante, la quantité adsorbée Q est liée à la capacité maximale d'adsorption Q_m , à la concentration à l'équilibre C_e du soluté et à la constante d'affinité K par l'équation:

$$\frac{Q}{Q_m} = \frac{KC_e}{1 + KC_e} \quad (\text{Eq 1})$$

La transformée linéaire de ce modèle a pour équation [40] :

$$\frac{1}{Q} = \frac{1}{Q_m} + \frac{1}{K \cdot Q_m} * \frac{1}{C_e} \quad (\text{Eq 2})$$

En portant $1/Q$ en fonction de $1/C_e$ on obtient une droite de pente $1/KQ_m$ et d'ordonnée à l'origine $1/Q_m$, cela permet la détermination des deux paramètres d'équilibre de l'équation Q_m et K .

Parmi les caractéristiques de l'isotherme de Langmuir, on peut citer sa simplicité et le fait que les paramètres Q_m et K qu'il permet d'évaluer, ont un sens physique. La valeur de K est liée à la force d'interaction entre la molécule adsorbée et la surface du solide ; la valeur de Q_m exprime la quantité de soluté fixée par gramme de solide dont la surface est considérée comme totalement recouverte par une couche monomoléculaire. Cette simplicité est une conséquence des hypothèses restrictives qui permettent d'établir ce modèle [41] : l'équivalence de tous les sites d'adsorption et la non-dépendance de l'énergie d'adsorption avec le taux de couverture de la surface. Ceci se traduit par l'absence des interactions entre des espèces adsorbées et adjacentes sur la surface.

III.2.2.Isotherme de Freundlich

C'est une équation empirique largement utilisée pour la représentation pratique de l'équilibre d'adsorption. Elle ne repose sur aucune base théorique. Toutefois l'expérience

Chapitre I

montre qu'elle décrit bien les résultats d'adsorption des micropolluants par les solides tels que les charbons actifs, les sols et les argiles [42]. Elle se présente sous la forme :

$$Q = K_f C e^{1/nf} \quad (\text{Eq 3})$$

Q: Quantité adsorbée par gramme du solide.

Ce: Concentration de l'adsorbat à l'équilibre d'adsorption.

K_f et 1/nf: constantes de Freundlich caractéristiques de l'efficacité d'un adsorbant donné vis-à-vis d'un soluté donné.

La transformée linéaire permettant de vérifier la validité de cette équation est obtenue par passage en échelle logarithmique [40]:

$$\ln Q = \ln K_f + 1/nf \ln Ce \quad (\text{Eq 4})$$

En traçant **Ln Q** en fonction de **Ln Ce**, on obtient une droite de pente **1/nf** et d'ordonnée à l'origine **Ln Kf**

III.2.3. Autres modèles

D'autres équations, dérivées de l'équation de Langmuir, sont avancées pour décrire les isothermes d'adsorption. C'est notamment l'équation de Fritz-Schlünder, celle de Radke-Prausnitz et celle de Toth.

IV) Méthodes de détection utilisées

IV.1. Les biocapteurs

IV.1.1. Définition

Un biocapteur est un outil analytique composé d'un élément biologique appelé biorécepteur lié à un transducteur. Le biorécepteur reconnaît spécifiquement une molécule du

Chapitre I

milieu et l'information biologique qui en résulte est convertie par le transducteur en un signal analytiquement utilisable [43].

Le premier biocapteur a été développé par Clark en 1962 [44] et depuis, les communautés de chercheurs de divers domaines ont travaillé ensemble pour développer des dispositifs de détection de plus en plus sophistiqués et fiables pour des applications dans différents domaines. L'objectif du développement d'un biocapteur est d'aboutir à un dispositif de taille réduite (portatif) permettant de détecter, d'alerter, voire de doser directement l'analyte cible, de façon rapide, de préférence sans nécessiter l'ajout d'autres réactifs ou de prétraitement de l'échantillon [45]. La figure I.4 correspond à une représentation schématique de principe de fonctionnement d'un biocapteur.

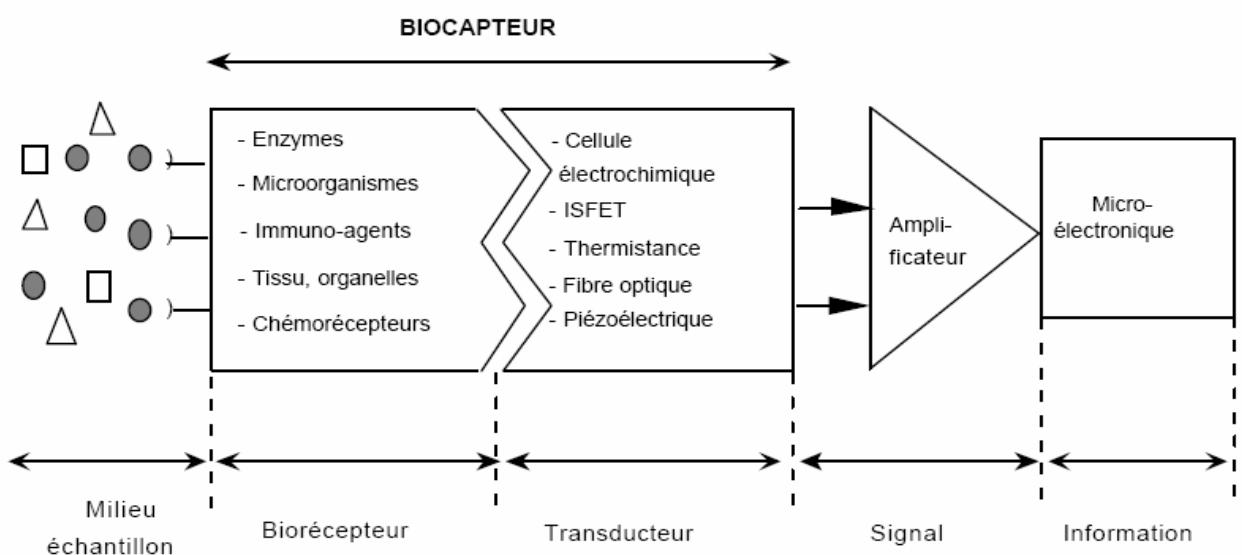


Figure I. 4 : Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur [46].

IV.1.2. Le bio-récepteur : l'acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme impliquée dans les mécanismes de transmission de l'influx nerveux à travers l'organisme. Dans les jonctions inter neuronales et neuromusculaires, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine (ACh), qui permet la transmission du message nerveux d'une cellule à l'autre (Figure I .2). Une fois l'information transmise, l'acétylcholine est rapidement inactivée par l'AChE, ce qui permet au système de revenir à son état de repos.

IV.1.3. Les biocapteurs électrochimiques

Les biocapteurs électrochimiques sont des outils capables de fournir des informations analytiques spécifiques, quantitatives ou semi-quantitatives, à l'aide de transducteurs électrochimiques [47]. Lors d'interactions biologiques et chimiques entre une substance biologique active et son substrat, une ou des espèces électroactives sont consommées et/ou générées. Durant ce procédé, un détecteur électrochimique mesure le signal électrochimique produit par les interactions. Ces biocapteurs sont intéressants en raison de leur capacité de miniaturisation, leur simplicité, leur faible coût et leur rapidité de réponse. Ils fonctionnent avec des systèmes de détection différents, comme la conductimétrie, la potentiométrie et l'ampérométrie [47,48].

IV.1.3.1. Détection potentiométrique

Les mesures potentiométriques reposent sur la mesure d'une différence de potentiel, entre une électrode de travail et une électrode de référence. Cette différence de potentiel est, d'après la loi de Nernst, proportionnelle au logarithme de la concentration de l'analyte.

$$E_p = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln[x] \quad (\text{Eq 5})$$

IV.1.3.2. Détection ampérométrique

Les biocapteurs ampérométriques mesurent des variations de courant à l'électrode de travail provenant de l'oxydoréduction à potentiel constant d'espèces électroactives produites lors d'une réaction biochimique directe ou indirecte. Contrairement aux biocapteurs potentiométriques, ils sont dépendants linéairement de la concentration, ce qui les rend plus sensibles. Ces biocapteurs ont également l'avantage d'être plus rapides, moins coûteux et plus disponibles que les biocapteurs conductimétriques et potentiométriques (*Figure I.5*).

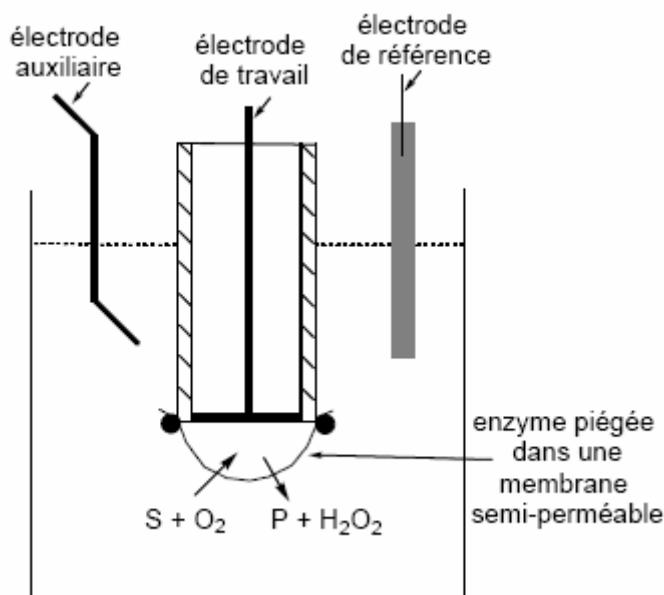


Figure I. 5: Schema d'un capteur ampérométrique,
d'après [49]

IV.1.3.3. Détection Impédancemétrique

La spectroscopie d'impédance électrochimique « EIS » est une excellente technique pour étudier les propriétés électriques interfaciales de n'importe quel matériau solide ou liquide connecté à un transducteur électrochimique [50]. C'est une technique non invasive qui

Chapitre I

ne requiert pas d'instrumentation complexe ce qui permet des applications courantes en laboratoire.

Les biocapteurs impédancemétriques mesurent l'impédance électrique d'une interface soumise à une faible tension alternative à différentes fréquences. L'impédance est donnée par le rapport tension/courant en prenant en compte le déphasage.

L'EIS est de plus en plus utilisée dans le développement de capteurs, comme par exemple pour la détection de pesticides [51], ou de molécules odorantes [52], l'étude de la dégradation de polymères [53]. En général, les mesures impédancemétriques sont adaptées à la détection de changements conformationnels du à la reconnaissance de molécules [54]

IV.2. La chromatographie liquide à haute performance HPLC-UV

La chromatographie en phase liquide (HPLC) est une technique de séparation des constituants d'un mélange en solution basée sur le partage des composés entre une phase mobile dont laquelle ils sont solubles et une phase dite, fixe ou stationnaire, qui exerce sur eux un effet retardant [55]. Ainsi, la séparation des composés repose sur les différences d'affinités et d'interactions d'un composé pour la phase mobile et la phase stationnaire. La phase stationnaire peut varier en fonction des interactions requises. Ainsi, selon les phénomènes mis en jeu lors de la séparation, différents types de chromatographie existent : l'adsorption, le partage, l'échange d'ion, la paire d'ion, l'échange de ligands, le transfert de charge et l'exclusion stérique[55] .

L' HPLC à polarité de phase inverse avec un gradient d'élution est la stratégie la plus communément utilisée pour l'analyse multirésidus de pesticides [56 ,57]. Elle permet en effet l'analyse des composés ayant des propriétés physico-chimiques variées. Les composés sont alors séparés selon leur différence d'hydrophobie par partage entre la phase stationnaire et la phase mobile. Cette dernière met en jeu une phase aqueuse et une phase organique : le méthanol ou l'acétonitrile.

Chapitre I

La majorité des phases stationnaires sont à base de silice chimiquement modifiée par greffage d'une chaîne alkyle octyl C₈ ou octadécyl C₁₈. De la silice avec des groupement aminopropyl, cyanopropyl, ou phényl peut aussi être utilisée. D'autres phases stationnaires apolaires à base de polymères tel que le copolymère styrène divinylbenzène sont également citées [58]. Par ailleurs, d'autres phases à base de carbone graphite poreux (PGC) existent. Cependant, ce type de phase est à réserver à l'analyse de composés polaires car les mécanismes mis en œuvre entraînent une trop forte rétention des substances apolaires. Ainsi, le PGC n'est pas préconisé lors du développement de méthodes d'analyse multirésidus.

De nombreux pesticides de polarité variée peuvent être efficacement analysés par HPLC à polarité de phase inverse sans aucune étape préalable de dérivation. Ainsi, depuis son introduction au cours des années 1980, l' HPLC couplée à des détecteurs de type ultraviolet (UV) ou fluorescence a été adoptée comme une technique complémentaire à la CPG dans le domaine de l'analyse de résidus de pesticides [59].

De part sa large gamme d'application, sa stabilité à long terme, sa facilité d'utilisation, son faible coût et l'amélioration de la sélectivité grâce au détecteur à barrettes de diode (Diode Array Detector, DAD), la détection UV a été longtemps la plus utilisée dans l'analyse de résidus de pesticides. Néanmoins, l'identification de pesticides dans des échantillons complexes peut être un problème pour l' HPLC couplée à des détecteurs conventionnels comme l'UV. Ces techniques ne sont en effet pas suffisamment spécifiques : elles manquent de sélectivité (grande ressemblance des spectres UV des pesticides d'une même famille chimique) et de sensibilité pour l'analyse de traces de composés présents dans des matrices complexes [60-65].

CHAPITRE II

POLYMERES A EMPREINTE MOLECULAIRE ET METHODES D'EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE (SPE)

I. Introduction

L'origine des polymères à empreintes moléculaires (Molecularly Imprinted Polymers : MIPs) peut être corrélée aux théories sur la fonction enzymatique et sur la formation d'anticorps. Les enzymes sont des protéines possédant un site actif complémentaire à une molécule particulière nommée substrat : le site actif de l'enzyme contient des groupes fonctionnels (acides aminés) qui interagissent *via* des liaisons hydrogène, électrostatiques ...etc avec le substrat.

En 1931, Polyakov *et al*, [66] mettent en évidence pour la première fois le caractère complexant d'un polymère de silice pour des dérivés benzéniques utilisés lors de la synthèse. La méthodologie de synthèse est reprise en 1949 par Dickey [67] qui réussit à obtenir un polymère sélectif du méthyl orange : il introduit alors une technique appelée « adsorption spécifique », référencée ensuite sous le nom « d'empreinte moléculaire » créant ainsi des récepteurs synthétiques. Le mécanisme de complexation qu'il propose, reprend la théorie de Pauling [68], sur la reconnaissance hautement spécifique des anticorps, une autre classe de protéine. Le site de fixation «binding site» qui est généré au cours de l'impression autour d'un substrat type enzyme, a une affinité et sélectivité souvent similaires à celles observées dans l'interaction anticorps-antigène. L'approche moderne de cette méthode à partir de polymères organiques synthétiques a été développée par Wulff *et al*, et Takagishi *et al*, en 1972 [69, 70]. Le concept d'empreinte moléculaire a beaucoup évolué et il inclut aujourd'hui une grande variété de polymères organiques préparés selon différentes techniques de polymérisation.

II. Les polymères à empreintes moléculaires : principe et applications

II.1. Principe général de l'impression moléculaire

Le processus de préparation des polymères à empreintes moléculaires s'effectue en présence d'une molécule cible (également appelée «template» ou analyte à étudier) d'un ou

Chapitre II

plusieurs monomères fonctionnels, d'un monomère réticulant dans un solvant approprié que l'on appelle solvant porogène. Un complexe se forme alors entre la molécule cible et les monomères fonctionnalisés via une interaction soit non-covalente, soit covalente grâce à une réaction chimique (*Figure II.1*). La polymérisation [71, 72], aboutit à la formation d'un polymère insoluble. L'extraction finale de la molécule cible laisse alors place à des cavités dans le corps de la matrice polymérique qui sont complémentaires de la molécule cible dans la forme, la taille et les fonctionnalités chimiques.

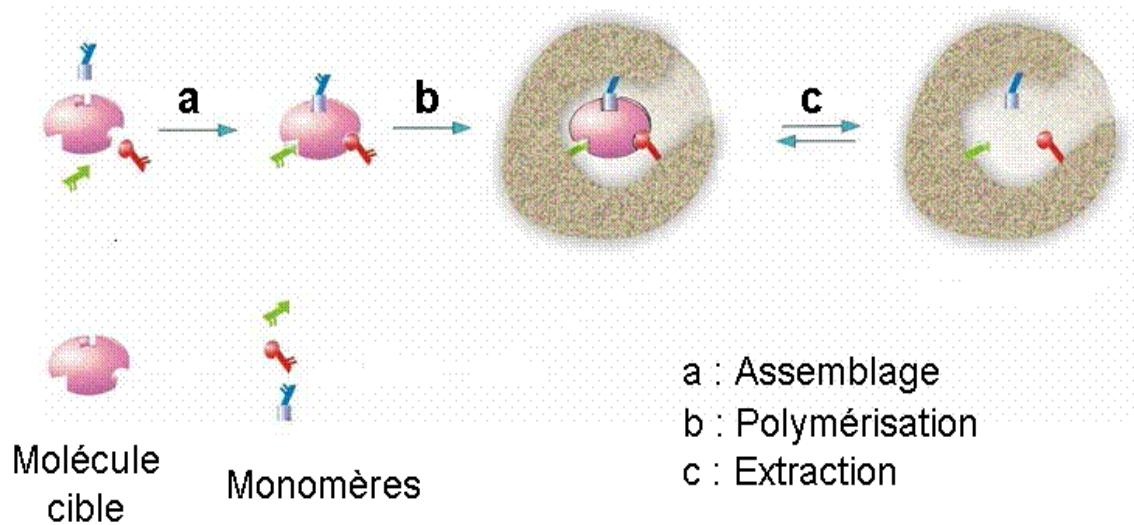


Figure II. 1: Représentation graphique du processus d'impression moléculaire ([73])

De nos jours, différentes molécules sont utilisées comme «template» pour synthétiser des empreintes moléculaires : des mono et oligosaccharides, des acides aminés, des peptides, des protéines, des composés biologiquement actifs tels que la théophylline et le diazépam, la morphine, la leu-enkephalin et la nicotine notamment. Cette diversité de substrats ainsi que la stabilité et la facilité de préparation des MIPs ont rendu ces récepteurs artificiels extrêmement attractifs pour résoudre les problèmes de séparation chimique [74,75], d'extraction sur phase solide (SPE) [76-79] et de détection des molécules d'intérêt biologique [80]. De plus, leur

Chapitre II

capacité à éliminer des composés indésirables dans les aliments ou dans les fluides biologiques a été démontrée [81].

II. 2 . Définition des composants du système de polymérisation

II.2.1. Les amorceurs

Dans la plupart des cas, l'amorçage de la polymérisation se fait par voie thermique ou par rayonnement ultra-violet (UV). De nombreux amorceurs peuvent être utilisés comme source de radicaux lors d'une polymérisation radicalaire. Généralement, des azo-amorceurs (*Figure II.2*) sont utilisés car ils sont capables d'amorcer un grand nombre de monomères, aussi bien par voie thermique que par voie photochimique. L'inconvénient de ce type d'amorceurs est qu'il forme des radicaux stables avec l'oxygène qui inhibent la polymérisation. Pour favoriser une bonne propagation de la polymérisation, il faut donc éliminer l'oxygène du milieu réactionnel. Cela se fait par ultra-sonication ou par bullage du milieu avec un gaz inerte.

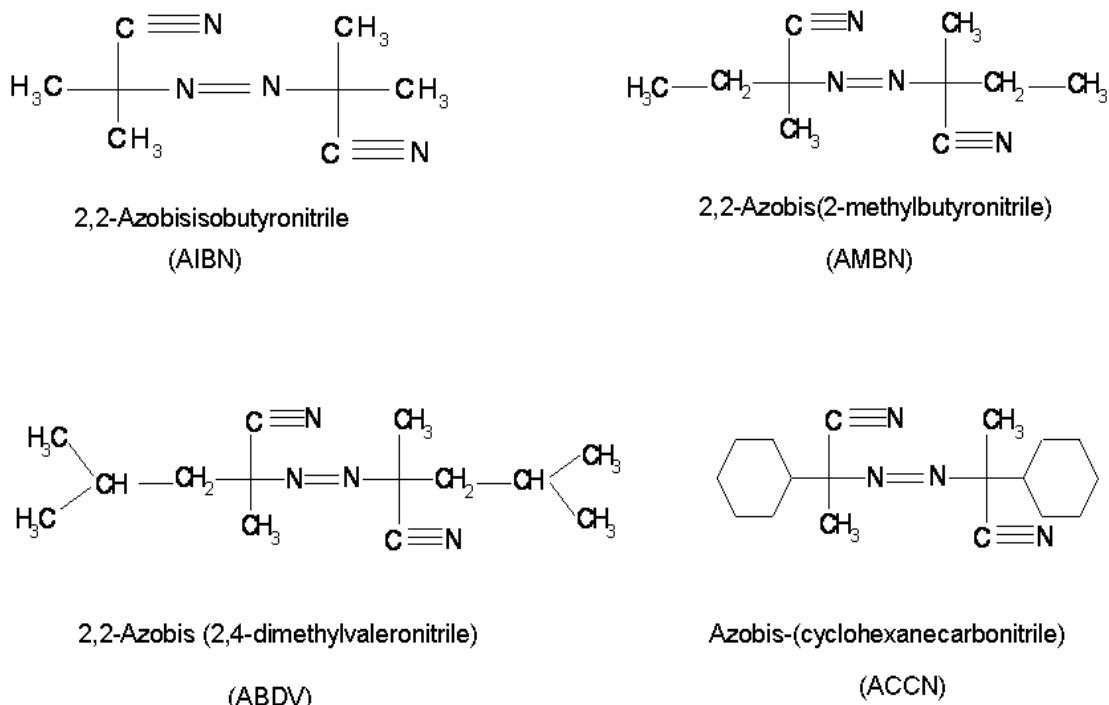


Figure II. 2: Structures des amorceurs radicalaires les plus couramment utilisés pour la préparation des MIPs.

II.2.2. Les cibles

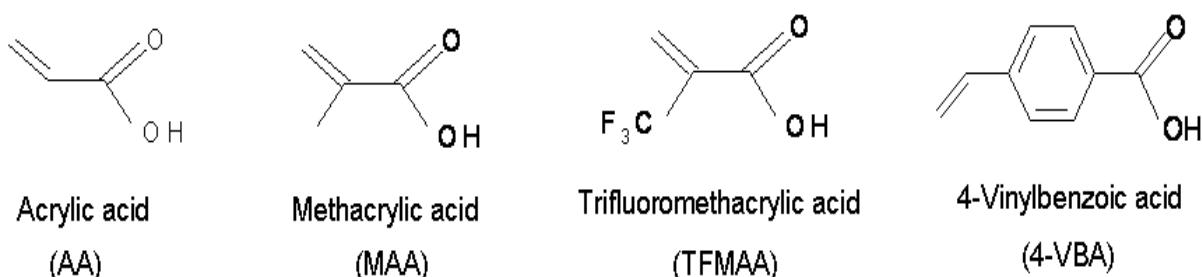
La structure chimique de la cible a un rôle central puisque c'est elle qui va définir l'organisation des fonctions portées par les monomères fonctionnels. Elle doit idéalement être inerte vis-à-vis des conditions de polymérisation pour pouvoir être compatible avec la polymérisation radicalaire et ne pas entrer dans le mécanisme réactionnel. En conséquence, il est nécessaire de vérifier au préalable que la cible ne comporte pas de fonctions polymérisables, ou inhibitrices de la polymérisation. Par ailleurs, afin de former des empreintes moléculaires, la cible doit répondre aux contraintes exigées par le procédé de synthèse, c'est-à-dire qu'elle présente une stabilité thermique et/ou aux irradiations UV.

II.2.3. Les monomères fonctionnels

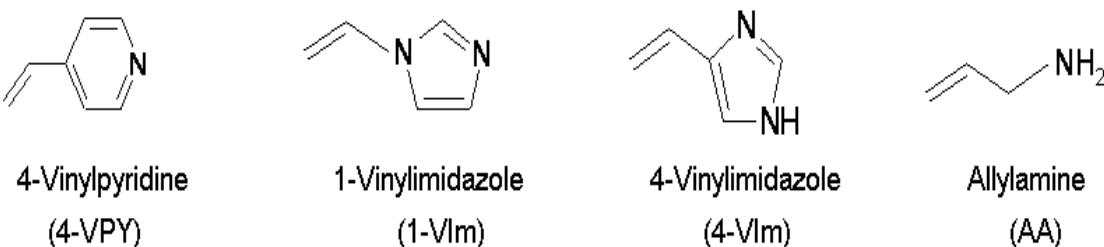
Chapitre II

Le choix du (des) monomère(s) fonctionnel(s) est primordial pour avoir une complémentarité des interactions avec la molécule à imprimer. En général, les monomères fonctionnels (*Figure II.3*) sont présents en excès par rapport à la cible afin de favoriser les interactions entre les fonctions de chacun. Le ratio monomère/cible optimal est déterminé par l'expérimentation avec des formulations contenant des quantités croissantes de cible [82]. La formation du complexe monomère/cible est gouvernée par la constante d'équilibre du système.

Les monomères acides



Les monomères basiques



Les monomères neutres

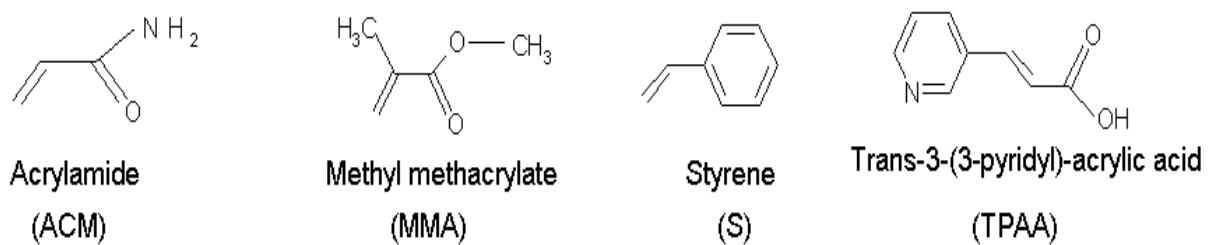


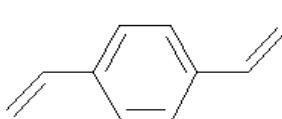
Figure II. 3: Structure des monomères fonctionnels couramment utilisés pour la préparation des MIPs.

II.2.4. Les monomères réticulants

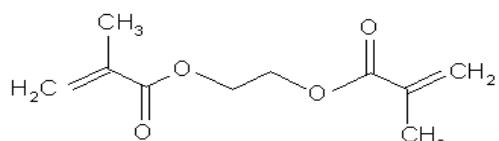
La sélectivité des MIPs est grandement influencée par le type et la quantité d'agent de réticulation. Celui-ci va permettre de :

- contrôler la morphologie de la matrice (gel de type macroporeux ou microgel),
- stabiliser la cavité correspondante à l'empreinte,
- apporter une stabilité mécanique à la matrice polymère,
- apporter des interactions complémentaires avec la cible, de type hydrophobe ou $\pi-\pi$, selon la nature du réticulant.

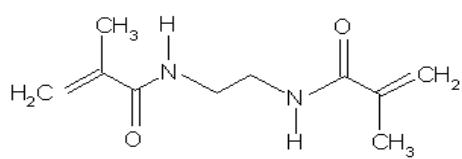
La quantité des monomères réticulants doit donc être suffisante pour préserver la stabilité des sites de reconnaissance. C'est grâce à cette rigidité que les microcavités tridimensionnelles gardent leur forme complémentaire en structure et en fonctions chimiques à celle de la cible même après son élimination. La rigidité de la matrice permet aux fonctions de rester dans leur position optimale pour que la reconnaissance soit efficace. Les monomères réticulants les plus couramment utilisés sont représentés ci-dessous (*Figure II.4*).



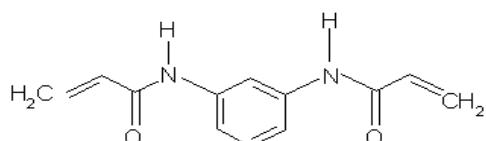
Divinylbenzene
(DVB)



Ethylene glycol dimethacrylate
(EGDMA)



N,N-ethylenebismethacrylamide
(EBMAA)



N,N-1,3-phenylenebis(2-methyl-2-propenamide)
(PBMP)

Figure II. 4: Structure des monomères réticulants classiquement utilisés pour la préparation des MIPs.

II.2.5. Le solvant porogène

Dans la préparation de MIPs, le solvant joue le rôle d'agent porogène, c'est-à-dire qu'il va conférer une structure poreuse au MIP. La qualité et la quantité de solvant vont influer sur la qualité de l'impression, ainsi que sur la structure même du MIP (morphologie, gonflement, taille des pores...) Pour choisir le solvant adapté, il existe quelques contraintes :

- il faut que les différents constituants du mélange soient solubles dans le solvant,
- le solvant doit produire des pores relativement larges pour permettre à la molécule cible de rentrer et de sortir du polymère,
- le solvant doit avoir une faible polarité pour ne pas provoquer d'interférences pendant la formation du complexe entre les molécules à imprimer et les monomères.

II.3. Complexation entre molécule cible et monomères fonctionnels

Comme représenté dans la *figure II.1*, le principe des empreintes moléculaires repose sur les interactions entre les monomères fonctionnels et la molécule cible avant l'étape de polymérisation. La nature des interactions dans le complexe de pré-polymérisation, permet de définir différentes approches pour la conception de l'empreinte moléculaire. Ces approches sont covalentes, noncovalentes, semi-covalentes ou basées sur des liaisons de coordination.

II.3.1. Approche covalente

Dans ce type d'approche [83,84], la molécule cible est liée de façon covalente à la matrice polymérique grâce à la présence d'un ou de plusieurs points d'ancrages présents sur la molécule cible (*Figure II.5*). Après extraction de cette dernière par rupture des liaisons covalentes, des sites d'interactions restent dans la cavité et la reconnaissance de la molécule cible s'effectue alors par la formation de liaisons covalentes entre les fonctions chimiques de l'empreinte et de la molécule cible (*Figure II.5*).

Chapitre II

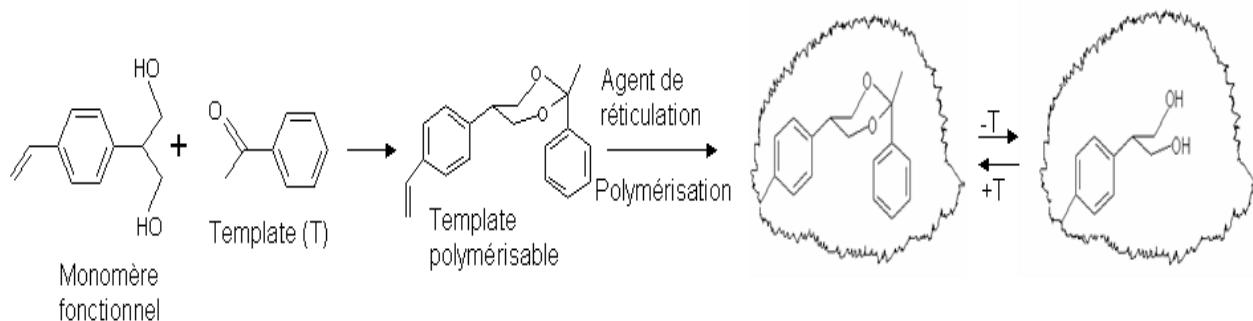


Figure II. 5: Schéma représentant un exemple de préparation d'un polymère à empreintes moléculaires par voie covalente [85].

La méthode classique d'impression covalente repose donc sur la formation de liaisons covalentes réversibles entre la molécule cible et la matrice polymérique. Les molécules les plus utilisées sont les bases de Schiff [86], les acétals/cétals [87, 88] et les esters boroniques [69,89,90]. Cette approche présente deux principaux avantages. Premièrement, les interactions entre la molécule cible et les monomères sont beaucoup moins sensibles à la polarité des solvants et à la température au cours du processus de polymérisation [91]. Deuxièmement, les groupements fonctionnalisés sont uniquement situés à l'intérieur de la cavité et non statistiquement répartis sur toute la matrice de polymère, comme dans le cas de l'approche non-covalente où un grand excès de monomère fonctionnel doit être utilisé [92-94]. Les interactions non-spécifiques sont ainsi minimisées. De plus, récemment, le groupe de Munoz-Olivas [95] a montré une grande homogénéité des cavités formées par des polymères imprimés préparés par voie covalente, avec une affinité élevée de ces derniers pour la molécule empreinte. Toutefois, le nombre de composés pouvant être imprimés par cette méthode reste limité (alcools, aldéhydes, cétones, amines et acides carboxyliques). La sensibilité à l'eau des liaisons covalentes entre le monomère fonctionnel et la molécule cible (imine, esters boroniques), peut poser problème car elle rend cette approche non envisageable dans des procédés de polymérisation en émulsion ou par précipitation.

II.3.2. Approche non-covalente

Chapitre II

L'approche non-covalente a été rapportée pour la première fois par le groupe de Mosbach en 1981 [96,97]. Dans cette méthode d'impression, les interactions entre les monomères et le «template» dans le complexe de pré-polymérisation (*Figure II.6*) sont des interactions faibles par rapport à l'énergie des liaisons covalentes. Ces interactions sont de type liaison hydrogène, liaison ionique, π - π stacking, liaison de Van Der Waals. L'étude et la compréhension des phénomènes d'interactions entre les monomères et la molécule cible sont très importantes pour obtenir des cavités ayant une bonne affinité pour la molécule cible. Ainsi, différentes techniques spectroscopiques ont été développées pour caractériser ces interactions, comme la spectroscopie UV-VIS [98 ,99], les expériences de titrage RMN [100], la spectroscopie FT-IR [101], la spectroscopie de fluorescence et la calorimétrie [102].

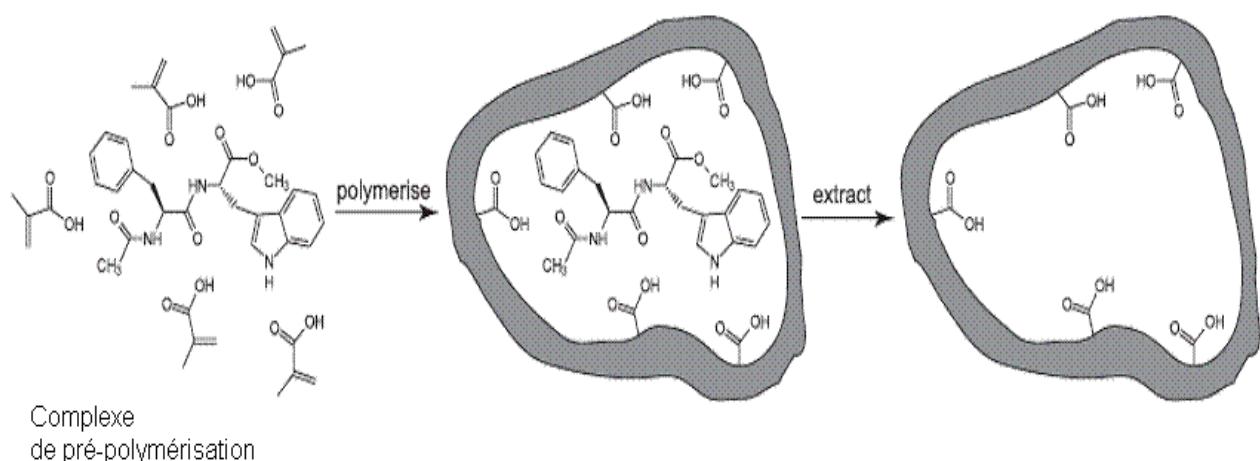


Figure II. 6 : Schéma de l'impression moléculaire par voie non-covalente d'un dipeptide par liaisons hydrogène avec l'acide méthacrylique (d'après la référence [97]).

Après polymérisation du complexe «template»-monomère en présence d'un agent de réticulation et l'extraction du «template» par lavage avec un solvant approprié (*Figure II.6*), la reconnaissance moléculaire s'effectue par des interactions non-covalentes entre les fonctions chimiques dans l'empreinte et la molécule cible.

Chapitre II

Du fait de sa mise en oeuvre aisée et du grand nombre de monomères fonctionnalisés commerciaux disponibles [103-105], cette méthode reste la plus utilisée dans la synthèse d'un polymère à empreintes moléculaires. Les principales limites de l'approche non-covalente sont liées à la formation du complexe de pré-polymérisation entre les monomères et le «template» [103-105]. Tout d'abord, les sites de reconnaissance sont très hétérogènes du fait de l'utilisation d'une grande quantité de monomères fonctionnels pour la formation du complexe de pré-polymérisation. Cette hétérogénéité se traduit par une large gamme des valeurs de constantes d'affinité (K_D) [106,107] et elle est également à l'origine des pics larges et asymétriques dans les applications chromatographiques [108,109]. Le deuxième problème est la quantité de monomère fonctionnalisé dispersé de façon aléatoire dans la matrice polymérique en dehors de la cavité de reconnaissance, en raison de l'excès de monomère utilisé pendant la polymérisation. Cet excès entraîne un grand nombre d'interactions non spécifiques avec la molécule cible. Beaucoup d'efforts ont été accomplis ces dernières années pour tenter de surmonter les problèmes d'interactions entre les monomères fonctionnalisés et le «template» dans l'approche non-covalente [103-105]. En plus de l'acide méthacrylique, d'autres monomères fonctionnalisés [103-105] ont été impliqués dans le but d'augmenter la force d'interaction avec la molécule à imprimer. Cette augmentation permet l'utilisation d'une quantité contrôlée de monomère fonctionnel, qui se traduit par une diminution des interactions non spécifiques. Dans l'approche non-covalente stoechiométrique [110], la force des interactions entre les monomères fonctionnalisés et le «template» est très grande et conduit à la formation d'un complexe très stable (K_a de l'ordre de 10^3 M^{-1})[110]. Dans ce cas, la quasi-totalité des monomères fonctionnalisés interagit avec le «template» et en conséquence seulement un faible pourcentage est placé de façon aléatoire dans la matrice polymérique. Cette approche a été étudiée par le groupe de Wulff [111] avec l'introduction d'amidines polymérisables capables d'interagir fortement avec des acides carboxyliques et

Chapitre II

avec des acides phosphoriques. De plus, ce dernier groupe de monomères s'avère particulièrement efficace dans la préparation de polymères imprimés utilisés comme catalyseurs dans les réactions d'hydrolyse [111-113].

II.3.3. Approche semi-covalente

Cette approche vise à combiner les avantages des deux méthodes précédentes (covalente et noncovalente) [114]. Dans un premier temps, le «template» polymérisable est lié de façon covalente au polymère. Suite à l'extraction de ce dernier par rupture des liaisons covalentes, on forme des fonctions chimiques (comme des acides carboxyliques) pouvant par la suite reconnaître la molécule cible *via* des interactions non covalentes comme des liaisons hydrogène. Notons par ailleurs qu'étant donné que le «template» est initialement lié de façon covalente à la matrice polymérique, le clivage de la molécule imprimée permet de laisser des groupes de reconnaissance situés uniquement à l'intérieur des empreintes formées. Par conséquent, la distribution de ces groupes est plus uniforme que dans le cas de l'approche non-covalente. Cela induit une diminution de la reconnaissance non spécifique du polymère [98,103].

Deux variantes de cette approche sont décrites dans la littérature :

- (i) le «template» et les monomères polymérisables sont directement liés entre eux. Cette méthode a été rapportée par Sellergren et Andersson [115] pour l'impression du *p* aminophénylalanine éthyle ester (*Figure II.7*).

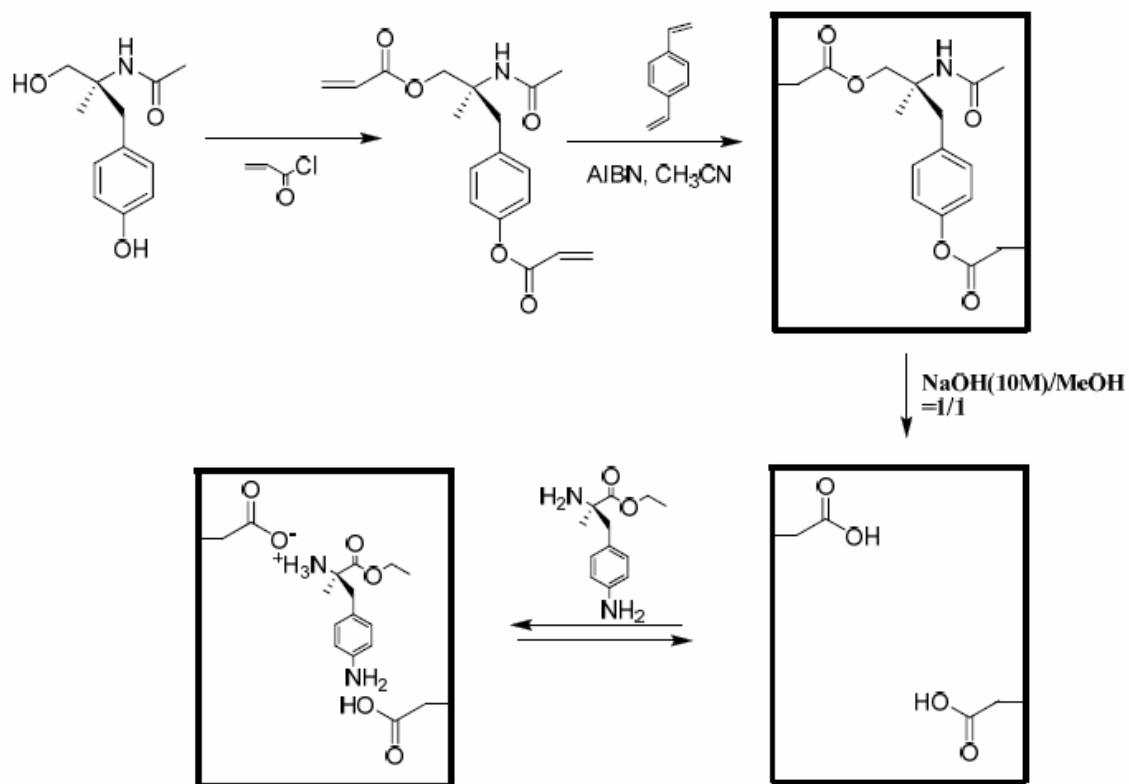


Figure II. 7: Exemple d'impression moléculaire par voie semi-covalente dans laquelle le «template» polymérisable est lié directement au polymère (d'après la référence [115]).

(ii) le «template» et les monomères sont liés par l'intermédiaire d'un groupement dit espaceur.

Whitcombe et Coll. [116] ont mis en place la technique en utilisant un espaceur de type carbonate pour l'impression du cholestérol. L'hydrolyse du polymère qui en résulte, avec NaOH dans du méthanol, libère la molécule cible (cholestérol) avec la perte simultanée de l'espaceur sous la forme de CO_2 (*Figure II.8*). Ceci permet de réaliser une empreinte avec un espace plus grand que la dimension du «template» favorisant généralement la recomplexation de la molécule cible.

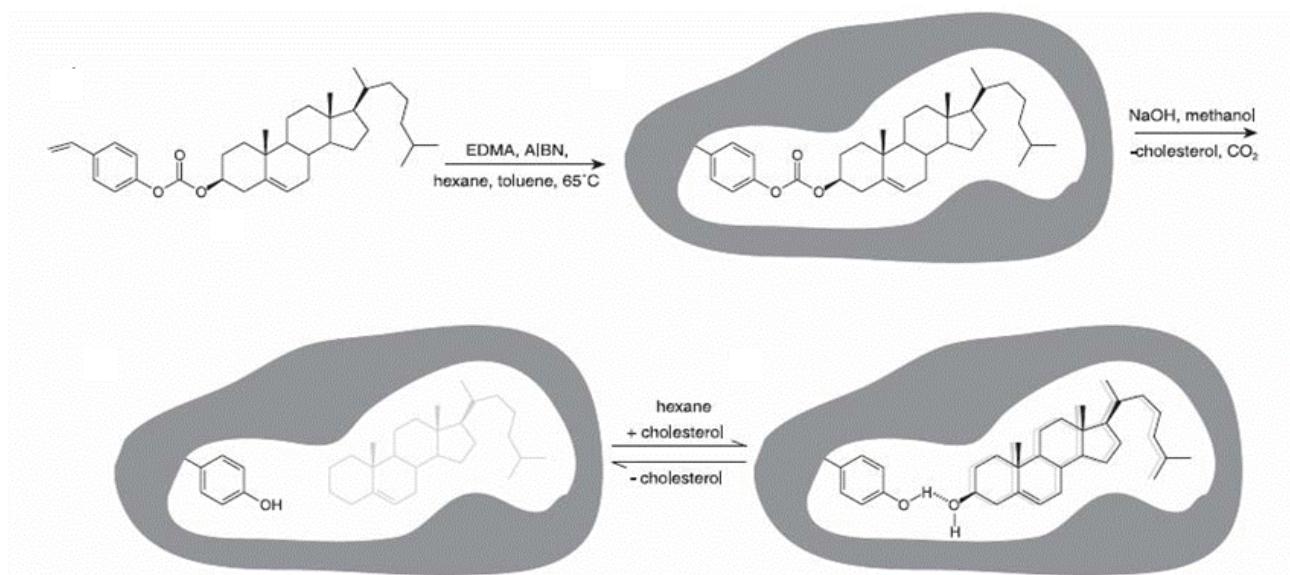


Figure II. 8: Exemple d'impression moléculaire par voie semi-covalente dans laquelle le «template» et les monomères sont liés par un groupe espaceur (d'après la référence [116]).

Le plus grand inconvénient de l'approche semi-covalente est l'étape d'hydrolyse du «template» après polymérisation. Dans le cas des fonctions esters, les conditions d'hydrolyse sont très drastiques (MeOH / NaOH concentrée à reflux durant plusieurs jours) [115,117]. Dans certains cas, ces conditions ne suffisent pas à cliver la liaison entre le «template» et la matrice polymérique. Pour surmonter ce problème, le clivage est parfois réalisé en conditions réductrices (utilisation de LiAlH₄) [118,119], ce qui entraîne la formation de fonctions alcool dans l'empreinte.

II.4. Différents modes de fabrication

II.4.1. Le polymère monolithique

Différentes techniques de synthèse sont employées en fonction notamment de l'utilisation que l'on veut faire de matériau. La plus commune reste celle donnant un bloc monolithique obtenu simplement après polymérisation d'une solution contenant dans un faible volume de solvant les différents monomères, la molécule cible, l'initiateur de radicaux.

Chapitre II

Le polymère compact est ensuite broyé et tamisé afin d'obtenir des particules de taille bien déterminée mais peut aussi être utilisé sans manipulation ultérieure [120,121]. Ce procédé génère des matériaux très résistants chimiquement et thermiquement [122] et sélectifs pour un grand nombre de molécules puisque le faible volume de solvant porogène favorise les contacts entre la molécule cible et les monomères. Cependant le broyage provoque la perte d'une grande quantité de polymère et les particules obtenues sont de forme hétérogène (*Figure 9a*) ce qui n'est pas très approprié dans l'utilisation du MIP comme phase stationnaire en HPLC par exemple.

II.4.2. Les billes sphériques

D'autres techniques ont été mises au point afin de donner directement des particules sphériques très homogènes dont le diamètre peut être déterminé en fonction des conditions expérimentales. Une technique très simple pour cela est la polymérisation par précipitation [123 ,124]. Les proportions du milieu de polymérisation peuvent être les mêmes que lors de la préparation d'un monolithe à l'exception du solvant qui est présent en plus grande quantité. Ainsi, dans ce milieu dilué, les monomères ne peuvent pas former un réseau polymérique rigide mais plutôt des nanobilles de polymère insolubles qui précipitent. La taille des particules est inférieure à $1\mu\text{m}$. Ceci est très intéressant pour des applications comme les tests de fixation puisque le solvant peut facilement s'infiltrer dans le réseau polymérique et favorise le contact de la molécule cible à toutes les cavités spécifiques. Mais du fait de gonflement des polymères, ces nanobilles ne peuvent être employées qu'en incubation dans un solvant, comme par exemple pour les tests de fixation ou la synthèse. En effet, la faible dimension des billes génère une pression d'entrée très importante qui fait que ces nanobilles ne peuvent être utilisées comme phase stationnaire en HPLC ou en SPE.

Chapitre II

Une autre méthode de préparation de nanoparticules est la polymérisation par émulsion, c'est-à-dire que les particules sont créées à l'interface d'un système biphasique stabilisé par un surfactant [125]. Une solution aqueuse est mise en contact avec le solvant porogène générant une émulsion à l'interface des deux phases où se produit la polymérisation. Dans ce cas précis, les monomères et la molécule cible ont été modifiés pour servir de surfactant et les billes obtenues ont un diamètre variant de 30 à 300 nm selon les conditions expérimentales. Cependant, avec les deux méthodes citées ci-dessus, les particules ne sont pas réellement sphériques (*Figure II.9 e*).

Pour des applications où le MIP est empaqueté dans une colonne et provoque des pressions d'entrée importantes, il est alors nécessaire de fabriquer des particules plus grosses. Des techniques similaires à celles de l'émulsion existent. On peut trouver la polymérisation par suspension où la phase dispersante est un solvant perfluorocarboné insoluble avec les solvants porogènes [126] et la polymérisation sur des microbilles de polystyrène par des étapes multiples de gonflement dans différents solvants [127] (*Figure II.9 b*). Ces deux méthodes donnent des particules sphériques de 5 à 50 µm de diamètre. Mais ces systèmes biphasiques créent plusieurs problèmes. Dans le cas de la méthode par suspension par exemple, la taille des particules dépend du solvant porogène. Et avec la méthode d'émulsion ou de gonflement successifs, l'eau utilisée pour former l'émulsion entre en compétition avec les monomères pour l'interaction avec la molécule cible ce qui diminue le nombre et la force des liaisons monomères-molécule cible et réduit le rendement et l'efficacité de l'impression moléculaire.

Dans d'autres cas, la polymérisation est réalisée sur un support possédant déjà les dimensions souhaitées. Ceci peut s'effectuer par une réaction simultanée de greffage et de formation du MIP sur des billes de silice fonctionnalisées [128,129] ou de polymères [130]. La silice peut aussi servir uniquement de "moule" afin de donner des billes de polymères de

Chapitre II

la même taille et forme que celles de la silice après dissolution de celle-ci [131]. Les particules formées de cette manière possèdent en général une plus grande surface active et la taille des billes est choisie au départ.

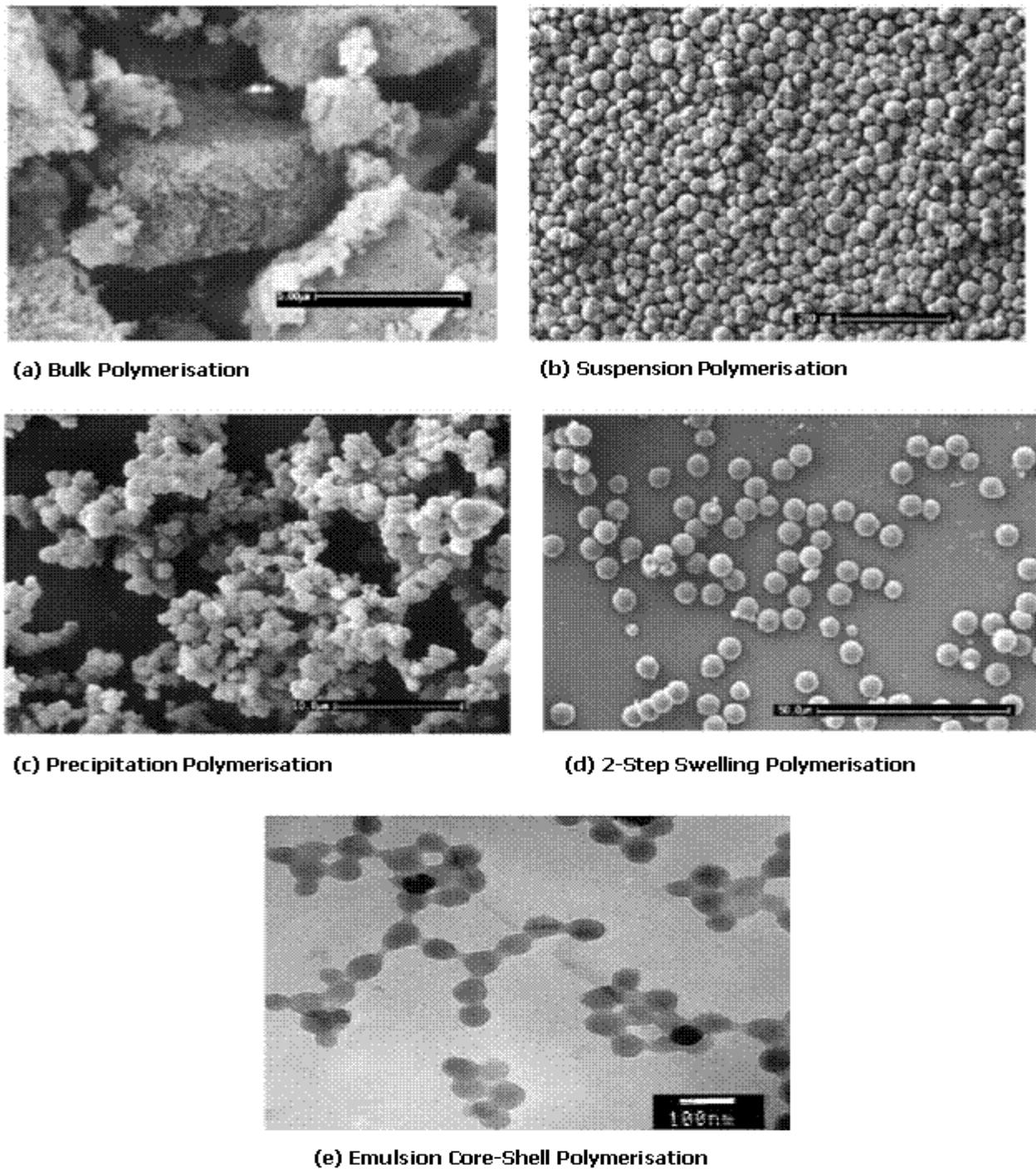


Figure II. 9: Micrographes par SEM et TEM de polymères obtenus par différentes méthodes de polymérisation [132]

Chapitre II

II.4.3. Les membranes

En SPE, les cartouches commerciales se présentent de plus en plus sous la forme d'un film mince dans lequel la phase stationnaire est imprégnée sur un disque en fibre de verre. Cette technologie offre l'avantage de permettre une percolation de plus grands volumes d'échantillons à des débits plus élevés, de réduire les volumes d'élution ainsi que les risques de colmatage en tête de colonne. Des films de MIPs ont alors été imaginés et testés pour une utilisation en SPE.

La synthèse de membranes de MIP utilisant les mêmes proportions que pour un MIP sous forme de monolith ou de nanosphères génère des films cassants avec une trop faible porosité pour pouvoir servir de phase stationnaire en SPE [133]. Des modifications de compositions ont du être apportées et une membrane souple et poreuse a été préparée en ajoutant au mélange initial molécule cible/monomère fonctionnalisé /monomère réticulant un second agent réticulant qui rend la membrane flexible ainsi qu'un solvant porogène constitué de diméthylformamide et de polyéthyléneglycol qui favorise la présence de macropores (70-200 nm). Les restrictions de cette méthode résultent des contraintes liées aux tests des membranes puisque les auteurs ont inséré celles-ci dans une colonne de garde et l'arrivée du solvant d'extraction a du se faire au moyen d'une pompe d'un système HPLC pour permettre la pénétration à travers la membrane. Bien que la capacité et la sélectivité de la membrane pour sa molécule cible (l'atrazine) soient très bonnes, la polymérisation dans un solvant polaire affaiblit les interactions de type liaison hydrogène entre la molécule cible et les monomères.

Ce problème peut être réduit par l'utilisation d'une membrane de filtration commerciale de polypropylène sur laquelle est greffé le polymère imprimé [134]. La membrane obtenue de seulement 10 nm d'épaisseur, accepte des débits de 10 ml/min. Une autre technique consiste à accrocher des nanoparticules de MIPs préparés par émulsion sur

Chapitre II

une membrane de polyamide sous pression [135]. D'autres équipes ont utilisée la technique d'inversion de phase qui consiste en la transformation du polymère de l'état liquide à l'état solide par exemple par coagulation du polymère dans l'eau [136].

Les membranes sont aussi très utiles comme support pour des capteurs car leur faible épaisseur favorise la reconnaissance moléculaire par diffusion à la surface du polymère. La présence de macropores est alors inutile. C'est pourquoi il a été possible de préparer des membranes en liant le MIP sur un matériau pelliculaire comme des films d'or modifiés [137,138]. La voie classique de synthèse de MIPs sous forme d'un film mince est cette fois-ci possible même si la membrane reste très fragile et cassante [139].

II.5. Molécules cibles et applications

L'impression moléculaire peut être appliquée à une très large gamme de molécules cibles notamment à des produits pharmaceutiques (alcaloïdes, amino-acides et peptides, bases nucléotides, stéroïdes et sucres), à des pesticides, à d'autres produits utilisés dans l'industrie agroalimentaire, ainsi qu'à des ions métalliques [140]. L'impression de ses composés peut maintenant être considérée comme de la routine. L'impression de structures plus grandes comme des protéines, des cellules et même des minéraux cristallins s'avère plus compliquée à mettre au point bien que plusieurs publications décrivent des systèmes spécialement adaptés pour ce type d'applications [141-143].

II.5.1. Application en séparation

La première application des polymères imprimés, et également la plus étudiée, est leur utilisation comme phase stationnaire en chromatographie d'affinité, en particulier pour la séparation des énantiomères des substances chirales. Les matériaux à empreintes moléculaires peuvent introduire une énantiosélectivité dans le polymère, pourtant synthétisé à partir des

Chapitre II

monomères non chiraux. L'avantage des polymères imprimés par rapport aux autres phases stationnaires chirales est qu'ils sont synthétisés «sur mesure» pour la molécule cible. Leur énantiosélectivité est donc connue à l'avance. Par exemple, si un polymère est imprimé avec l'énanthiomère L d'un aminoacide, une colonne HPLC contenant ce polymère va retenir l'énanthiomère L beaucoup plus que l'énanthiomère D. En revanche, une colonne contenant un polymère identique mais non imprimé ne pourra pas séparer les énanthiomères. Il est même possible d'obtenir des supports chromatographiques sélectifs pour des molécules contenant plusieurs centre chiraux : pour des molécules contenant deux centre chiraux, les 4 stéréoisomères peuvent être reconnus sélectivement par les MIPs correspondants. Par exemple un polymère imprimé avec le dipeptide Ac-L-Phe-L-Trp-OMe a permis de séparer sélectivement l'isomère LL des isomères DD, DL et LD (facteurs de séparation respectifs : $\alpha = 17,8 ; 14,2$ et $5,21$) [144]. Cette propriété des MIPs s'étend aux molécules contenant plus de deux centres chiraux. Par exemple, dans une étude sur les MIPs sélectifs pour des monosaccharides, de bonnes sélectivités ont été observées pour les différents stéréoisomères et anomères [145].

Les polymères imprimés ont été utilisés pour d'autres techniques de séparation comme la chromatographie sur couche mince [146], la chromatographie capillaire électrocinétique [147], ainsi que pour l'extraction en phase solide (SPE) [148]. Cette dernière application semble actuellement être celle qui est la plus proche de la commercialisation. Il y a en effet un grand besoin de matrices d'affinité capable d'extraire et d'enrichir sélectivement des analytes pour l'analyse médicale, agroalimentaire ou environnementale. Il a été montré à de nombreuses reprises qu'une extraction sur un polymère imprimé peut conduire à de meilleurs résultats que des méthodes classiques comme l'extraction liquide-liquide ou l'extraction sur cartouche C₁₈. La *figure II.10* donne l'exemple de l'extraction à partir de sérum humain de la saméridine qui est un analgésique, suivie de sa quantification par chromatographie en phase

Chapitre II

gazeuse [149]. Un problème potentiel dans ce type d'applications étant le relargage dans la solution à analyser de traces de la molécule cible utilisée lors de la synthèse de MIP. En conséquence, un analogue structural de la saméridine a été utilisé dans cet exemple pour l'impression du polymère. Comme cet analogue structural peut facilement être détecté en chromatographie, son relargage parasite par le MIP n'interfère pas avec la détection de la saméridine.

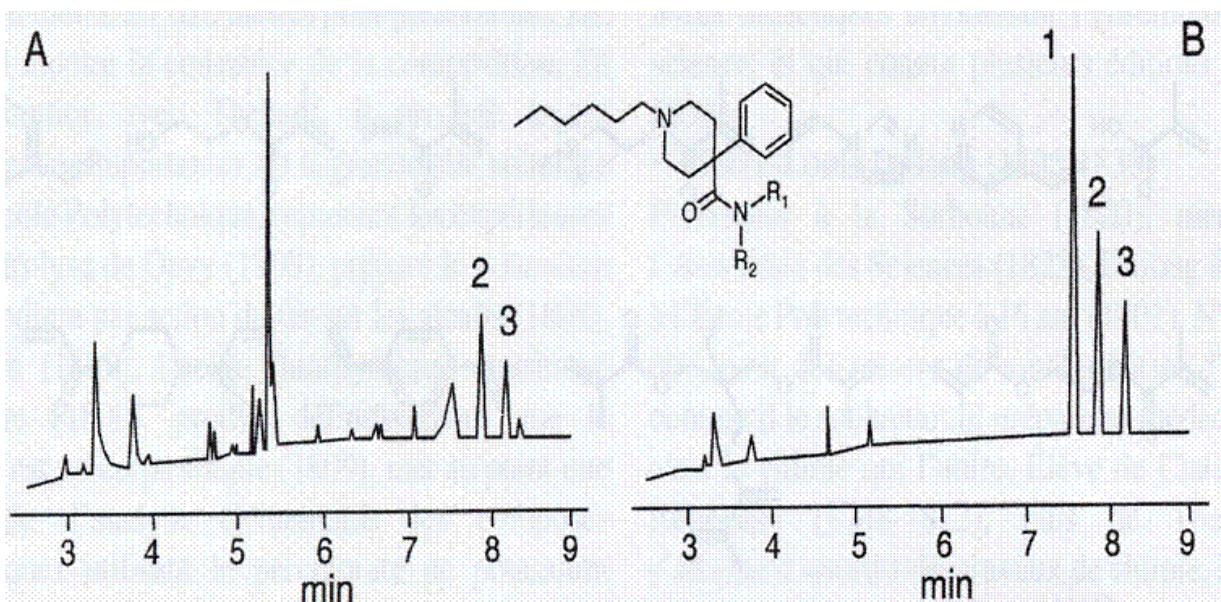


Figure II. 10 : Chromatographie en phase gazeuse d'extraits de plasma humain. (A) après extraction standard liquide-liquide ; (B) après extraction en phase solide avec un polymère imprimé. Pic 1 : «template», R₁=R₂=Me, Pic 2 : saméridine, R₁= Me, R₂=Et, Pic 3 : étalon interne, R₁=R₂=Et. (Reproduit à partir de la référence [149])

II.5.2. Application en tests immunologiques

La technologie de l'impression moléculaire a fait un grand bond en avant en 1993 lorsque le groupe de Mosbach [150] a montré que les polymères imprimés pouvaient être substitués aux anticorps dans des tests immunologiques. Des polymères imprimés avec la théophylline, un broncho-dilatateur, et avec le diazépam, un tranquillisant, présentaient une sélectivité comparable à celle des anticorps monoclonaux et des réactivités croisées quasi nulles pour des substances à structure similaire. De plus, une très bonne corrélation entre ce «molecularly imprinted sorbent assay» (MIA) et un test ELISA classique pour la théophylline

Chapitre II

était également observée. *Le tableau II.1* montre les sélectivités obtenues avec deux polymères imprimés par le cortisol et la corticostérone. Les réactions croisées obtenues avec différents anticorps mono et polyclonaux commerciaux sont également données à titre de comparaison [151]. Ces premiers systèmes et ceux qui les ont suivis sont analogues aux tests radio-immunologiques compétitifs en phase solide : une petite quantité d'analyte radiomarqué est ajoutée à l'échantillon et entre en compétition avec l'analyte présent dans celui-ci pour les sites spécifiques du polymère. Lorsque l'équilibre d'adsorption est atteint, la concentration en analyte peut être déterminée en quantifiant la molécule radiomarquée adsorbée, *via* une courbe étalon.

Tableau II. 1 : Réactions croisées de polymères imprimés (MIP) et de différents tests immunologiques commerciaux (ELISA et RIA) contre le cortisol et la corticostérone pour des substances de structure similaire (reproduit à partir de la référence [151]).

Ligand	Tests pour le cortisol Réactivité croisée (%) ^a				Tests pour la corticostérone Réactivité croisée (%) ^b		
	MIP ^c	ELISA ^d	RIA ^e	RIA ^f	MIP ^g	RIA ^h	RIA ⁱ
Cortisol	100	100	100	100	10	2,7	0,03
Corticostérone	8,6	10	0,6	3,0	100	100	100
21-Déoxycortisol	4,0	<0,1	0,3	-	0,54	-	-
11-Déoxycortisol	6,8	19	-	-	1,6	-	11
Prednisolone	36	13	46	-	5,7	-	-
Cortisone	0,89	-	-	16	0,38	-	<0,01

a) par rapport à la fixation du cortisol ; b) par rapport à la fixation de la corticostérone ; c) MIP anti-cortisol, d) anticorps monoclonal anti-cortisol de souris [152] ; e) Diagnostic Products Corporation , Los Angeles, CA, Etats-Unis ; f) antisérum polyclonal anti-cortisol de lapin [153] ; g) MIP anti- corticostérone ; h) antisérum polyclonal anti- corticostérone de rat [154] ; i) ICN Biomedicals , Inc., Costa Mesa, CA, Etats-Unis

II.5.3. Application dans les capteurs

En plus des applications comme tests immunologiques, les mimétiques d'anticorps ou de récepteurs peuvent être utilisés comme éléments de reconnaissance dans des capteurs [155]. Ici aussi, leur meilleure stabilité leur confère un avantage important sur les biomolécules. Un biocapteur est constitué d'un élément de reconnaissance (anticorps, enzyme, ADN....), qui adsorbe sélectivement l'analyte. L'élément de reconnaissance est en contact avec un transducteur qui traduit le signal chimique ou physique obtenu lors de l'adsorption de l'analyte en un signal facilement quantifiable. Cet élément de reconnaissance peut être remplacé par un polymère imprimé.

Il existe trois possibilités pour la génération du signal :

1. Le changement d'une propriété physico-chimique du système est détecté et quantifié, comme l'accumulation de matière (microgravimétrie piézoélectrique, résonance plasmonique de surface), la chaleur d'adsorption (microcalorimétrie) ou la capacité électrique.
2. L'analyte possède une propriété facilement détectable et quantifiable (fluorescence, activité électrochimique) ou peut être dosé par compétition avec un analyte marqué par un groupement fluorescent par exemple.
3. Le signal est généré par le polymère. Un groupement changeant de propriété lors de l'adsorption de l'analyte est incorporé dans les sites imprimés, par exemple, un monomère fonctionnel fluorescent.

La figure II.11 montre un exemple de capteur qui utilise le principe de la microbalance à quartz. Le capteur est un cristal de quartz mis en oscillation à haute fréquence et sur lequel est déposé un film sensible de polymère imprimé. Un changement de la masse de l'ensemble cristal-film lors de l'adsorption de l'analyte se traduit par un changement de la fréquence d'oscillation. L'adsorption de l'analyte sur la surface du capteur peut donc être quantifiée par cette technique appelée microgravimétrie piézoélectrique. Le film de polymère est ici un

Chapitre II

polymère imprimé avec l'énantiomère S du propranolol, un β -bloquant. Le propranolol peut être détecté et quantifié dans un échantillon de façon énantiosélective [156].

Le tableau II.2 donne des exemples de sensibilités obtenues avec des capteurs basés sur des MIPs et utilisant différents principes de transduction.

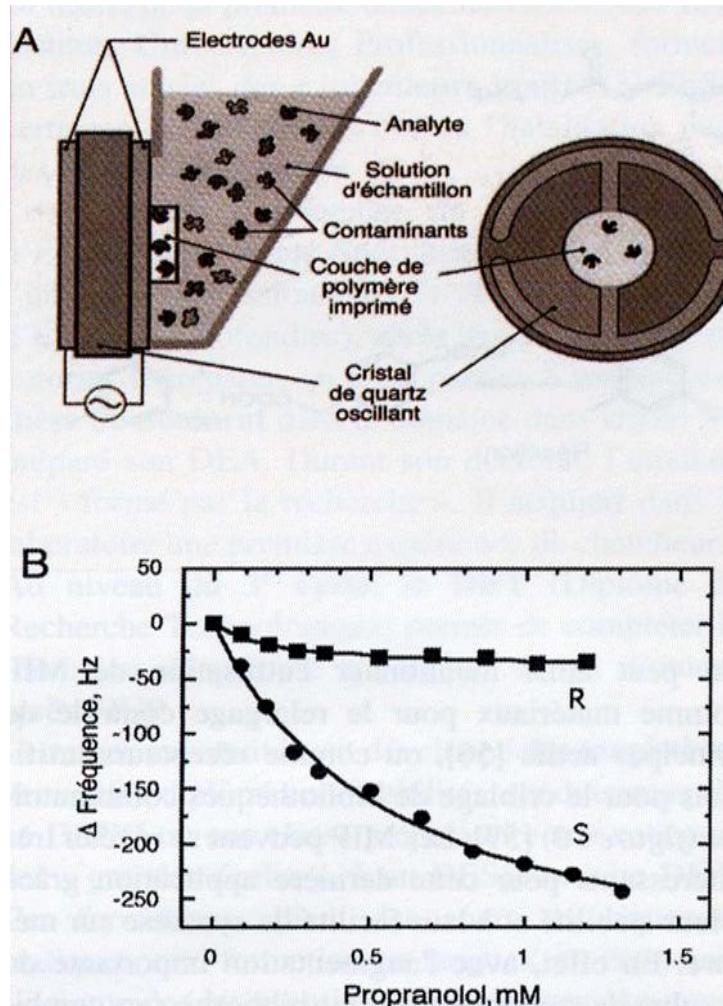


Figure II. 11: (A) Représentation schématique d'un capteur par microgravimétrie piézoélectrique contenant, comme élément de reconnaissance, un polymère imprimé avec le S-propranolol ; (B) signal obtenu dans une solution contenant différents concentrations de S- et de R- propranolol (reproduit à partir de la référence [155]).

Chapitre II

Tableau II. 2 : Sensibilité de capteurs basés sur des MIPs en utilisant différents principes de transduction

Transducteur	Analyte	Fenêtre de détection (μM)	Réf.
Ellipsométrie	Vitamine K1	Qualitative	157
Capacité électrique	Phénylalanine anilide	Qualitative	158
Conductimètre	Atrazine	0,005-0,05	159
Onde acoustique de surface	Vapeur de solvants	0,1-6	160
Microgravimétrie piézoélectrique	Vapeur de solvants	4-10	160
	Glucose	1000-2000	161
	S-propranolol	50-1300	162
IR à onde évanescante	2,4-D	4,5-1000	163
Fluorescence	PAH (pyrène)	0,00015-0,2	164
	cAMP	0,1-100	165
Ampérométrie	Morphine	3,5-35	166
Voltamétrie	2,4-D	0,1-100	167
pH	Glucose	1000-25000	168

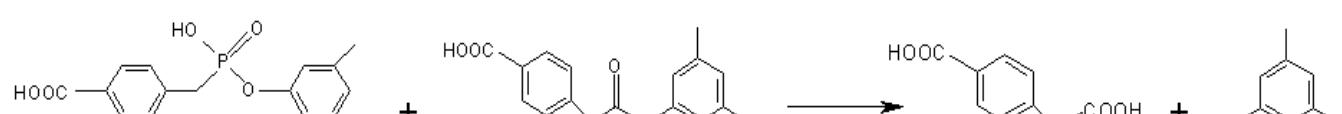
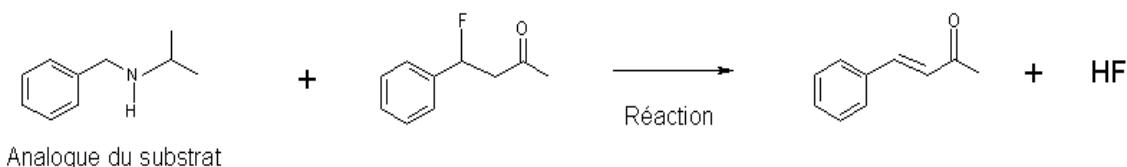
II.5.4. Application dans la synthèse et la catalyse

Les chercheurs se sont également inspirés du mode d'action des enzymes et des anticorps catalytiques pour obtenir des catalyseurs très spécifiques [169]. Des polymères catalytiques comparables à des enzymes ont été préparés par impression de polymères avec des substrats, des produits de réaction ou des analogues d'états de transition. Par exemple, un MIP capable de catalyser l'élimination de HF d'une β -fluorocétone a été obtenu par impression avec un analogue du substrat possédant une fonction amine secondaire. Lors de l'impression du polymère, un groupement carboxyle se fixe dans le site d'adsorption du substrat par interaction avec l'amine secondaire. Lors de la réaction, ce groupe carboxyle, placé en position favorable, catalyse la réaction d'une manière très efficace : la vitesse de la

Chapitre II

réaction est multipliée par 600 par rapport à la réaction en solution en présence des monomères fonctionnels précurseurs du MIP [170] (*réaction 1*).

Dans un autre exemple, l'impression d'un polymère avec l'analogue structural d'un état de transition permet d'obtenir un polymère ayant une activité catalytique de type estérase (*réaction 2*). La vitesse de réaction est augmentée d'un facteur 100 par rapport à la réaction sans catalyseur, et une cinétique du type Michaelis-Menten, ainsi qu'une inhibition par l'analogue de l'état de transition peuvent être observées [171]. Le MIP mime donc parfaitement le comportement catalytique d'une enzyme.



Réaction 2.

D'autres réactions catalysées par des MIPs ont été décrites, parmi lesquelles une réaction de type Diel-Alder [172], une condensation aldol [173], ainsi que l'isomérisation de benzisoxazoles [174]. Des métaux de transition peuvent être utilisés comme groupements prosthétiques dans ces enzymes mimétiques [175].

Chapitre II

Malgré des résultats encourageants, il faut admettre que les effets catalytiques obtenus sont modestes comparés à ceux des enzymes. Un gros effort de recherche est encore nécessaire pour optimiser les MIPs catalytiques et améliorer leurs performances.

En dehors de la catalyse proprement dite, les polymères imprimés peuvent améliorer le rendement de réactions chimiques ou enzymatiques grâce à leurs propriétés d'adsorption spécifique. C'est le cas de la synthèse enzymatique d'un précurseur de l'édulcorant aspartame. La condensation de Cbz-L-Asp-OH avec le L-Phe-OMe qui forme le Cbz- α -aspartame est catalysée par la chymotrypsine. L'équilibre thermodynamique de cette réaction est défavorable au produit de réaction, et son rendement est faible. La présence dans le milieu réactionnel d'un polymère imprimé par Cbz- α -aspartame permet une extraction continue du produit, ce qui déplace l'équilibre vers la formation de celui-ci et augmente ainsi le rendement de la synthèse [176].

Une application intéressante des MIPs en synthèse organique concerne la protection de groupes fonctionnels de molécules lors de leur dérivation régiosélective. Il a été montré qu'un stéroïde portant trois groupements hydroxyles libres pouvait être acétylé sélectivement sur l'un de ces hydroxyles si les autres étaient protégés par réaction avec un MIP (*Figure II.12*) [177].

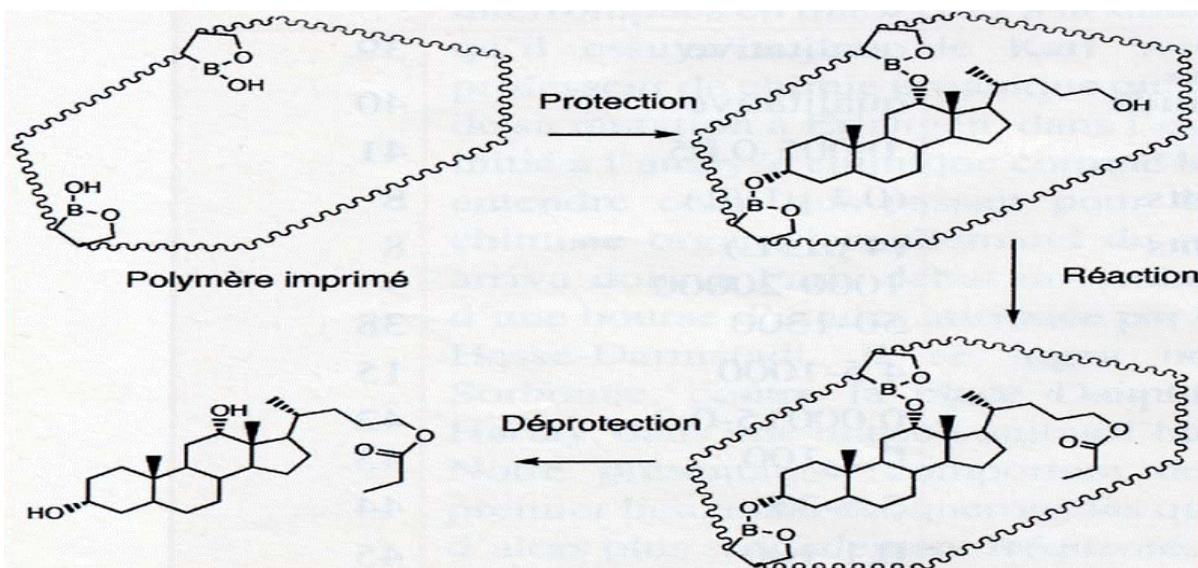


Figure II. 12 : Schémas représentant la manière dont un polymère imprimé dirige l’acétylation d’un stéroïde vers un groupement hydroxyle spécifique, en masquant les autres hydroxyles libres. (reproduit à partir de la référence [177]).

II.5.5. Autres applications

Suite aux développements en recherche chimique, biochimique et médicale, de nouvelles applications des MIPs sont apparues.

On peut ainsi mentionner l’utilisation de MIPs comme matériaux pour le relargage contrôlé de principes actifs [178], ou comme récepteurs artificiels pour le criblage de bibliothèque combinatoires (*Figure II.13*) [179]. Les MIPs peuvent se révéler très intéressants pour cette dernière application grâce à leur stabilité et à leur facilité de synthèse sur mesure. En effet, avec l’augmentation importante du nombre de composés dans les bibliothèques combinatoires, il devient indispensable de disposer de moyens performants de criblage et de précriblage.

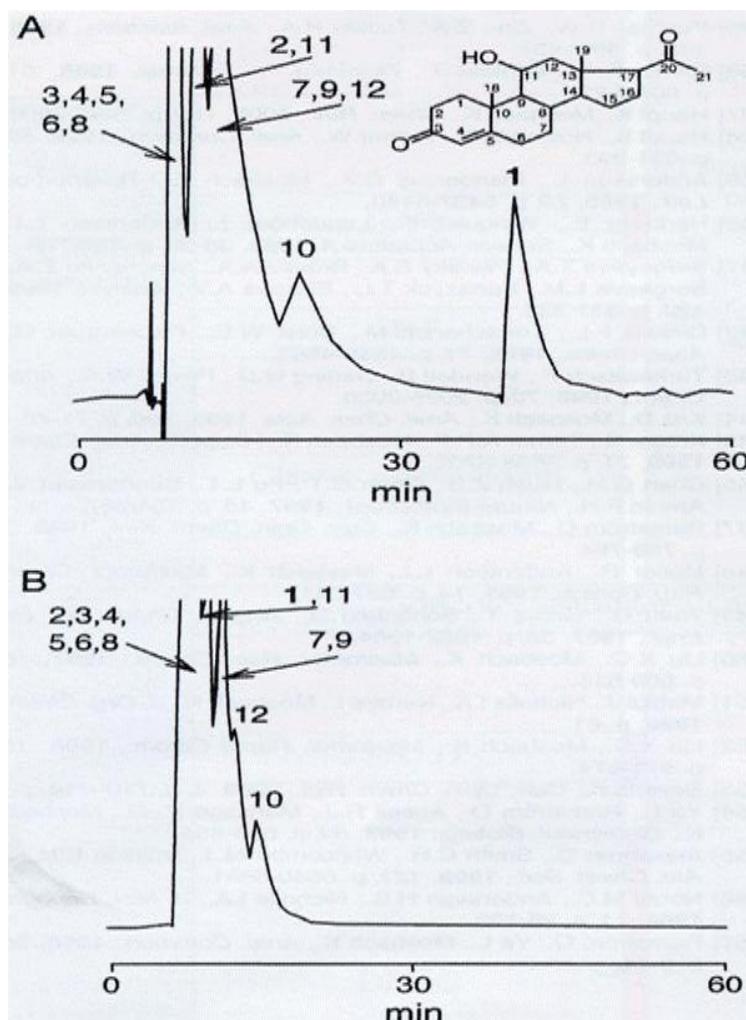


Figure II. 13: Criblage d'une petite bibliothèque combinatoire de stéroïdes en mode HPLC sur garnissage MIP imprimé par la 11- α -hydroxyprogesterone : (A) polymère imprimé, (B) polymère contrôle [129]. Bibliothèque : 11- α -hydroxyprogesterone (molécule cible, 1), 11- β -hydroxyprogesterone (2), 17- α -hydroxyprogesterone (3), progesterone (4), 4-androstene-3,17-dione (5), 1,4-androstadiene-3,17-dione (6), corticostérone (7), cortexzone (8), 11-déoxycortisol (9), cortisone (10), cortisone-21-acétate (11), cortisol-21-acétate (12)

(Reproduit à partir de la référence [85])

III. L'extraction sur phase solide (solide-liquide)

III.1. Introduction

Le développement d'une méthode analytique complète comprend de nombreuses étapes, depuis le prélèvement de l'échantillon jusqu'au traitement des données : la préparation de l'échantillon, la séparation des analytes, leur identification et enfin la quantification. De

Chapitre II

nombreux développements technologiques ont conduit à la mise à disposition d'instruments sophistiqués essentiellement dédiés à la séparation et la détection, laissant légèrement en retrait le traitement de l'échantillon. Pourtant, cette étape est considérée comme étant la plus longue, la plus fastidieuse et représentant la plus importante source d'erreurs de toute la méthode analytique. Les principaux objectifs de la préparation de l'échantillon, pour une analyse chromatographique, sont l'élimination d'un maximum de composés interférents ainsi que la concentration des analytes, surtout dans le cas d'analyses de traces. Cette étape peut aussi permettre le transfert des analytes dans un solvant plus adapté à l'analyse, ou même fractionner l'échantillon en plusieurs groupes de composés. L'extraction liquide-liquide (*Liquid-Liquid Extraction, LLE*), basée sur la distribution d'un soluté entre deux phases liquides en fonction de son affinité pour chacune d'elles, a longtemps été la méthode la plus couramment employée bien que présentant quelques inconvénients. En effet, même si elle est simple et efficace, c'est une technique longue et fastidieuse. Elle nécessite des quantités importantes de solvants organiques toxiques ou inflammables ; elle est sujette aux problèmes liés à la formation d'émulsions ; elle est peu efficace pour l'extraction de composés organiques polaires et est difficilement automatisable lorsqu'elle est appliquée à des échantillons de grand volume. Les réglementations sur la réduction de l'usage de solvants organiques ainsi que le développement de nouvelles phases stationnaires ont participé à l'émergence de l'extraction sur phase solide (*Solid-Phase Extraction, SPE*), technique d'extraction la plus répandue aujourd'hui.

III.2. Principe

L'extraction sur phase solide est fondée sur le transfert des composés à extraire d'une phase liquide (l'échantillon) vers une phase solide (l'adsorbant). Les analytes doivent présenter une forte affinité pour la phase solide afin d'être retenus pendant l'étape de

Chapitre II

percolation de l'échantillon. Ils pourront ensuite être désorbés par un solvant de forte force élante. A l'image de ceux mis en jeu en chromatographie en phase liquide, les mécanismes de rétention ou d'élution sont basés sur les différences d'interactions moléculaires entre l'analyte, le site actif de l'adsorbant et la phase liquide. Dans cette partie, les techniques d'extraction sur phase solide non exhaustives, comme la micro-extraction sur phase solide (SPME), l'extraction dynamique sur phase solide (SPDE) ou la micro-extraction sur barreau (SBSE) ne seront pas discutées. Ces techniques sont basées sur un partage des analytes entre l'adsorbant et l'échantillon entraînant donc une extraction non exhaustive des composés. Les fondements théoriques sont par conséquent différents de ceux présentés ici.

III.3. Méthode conventionnelle d'extraction sur phase solide

Le format le plus couramment rencontré consiste à placer l'adsorbant entre deux supports en verre fritté dans une cartouche. Les différentes solutions sont percolées par simple gravité, par pression positive à l'entrée de la cartouche, par vide en sortie de la cartouche, ou par centrifugation. Un protocole d'extraction sur phase solide est généralement constitué de quatre étapes, comme illustré sur *la figure II.14* .

Chapitre II

1- Conditionnement de la cartouche par percolation de solvants de forces éluantes décroissantes

2- Dépôt de l'échantillon avec rétention des molécules ciblées et de la matrice

3- Lavage(s): élution des espèces interférentes de la matrice et rétention des molécules ciblées

4- Elution des molécules ciblées

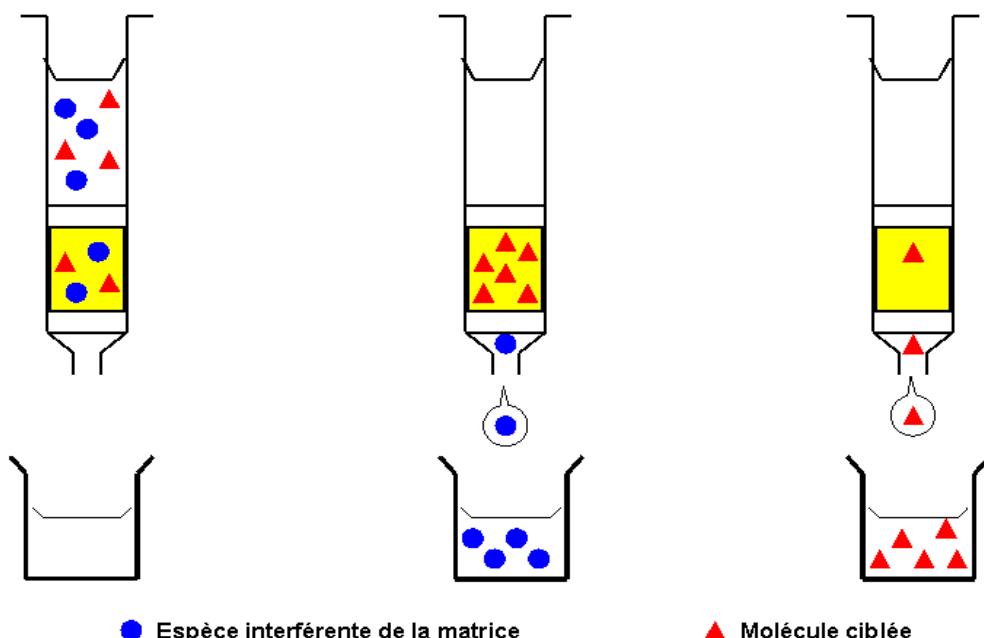


Figure II. 14 : Protocole général d'une extraction sur phase solide [180]

La première étape, appelée conditionnement, a pour objectif de mouiller et d'activer l'adsorbant afin de le préparer au passage de l'échantillon contenant les solutés à extraire. Elle doit idéalement s'achever par le passage d'une solution de composition, et donc de force éluante, très similaire à celle de l'échantillon pour éviter tout risque d'élution anticipée des analytes cibles. Lors de la seconde étape, on procède à la percolation de l'échantillon sur le support. Les analytes, ayant une grande affinité pour l'adsorbant choisi, sont fortement retenus contrairement à certains composés interférents pouvant déjà être éliminés lors de cette étape. Cependant, certaines substances interférentes peuvent également être adsorbées sur le support. Une étape de lavage est donc nécessaire. Elle consiste à utiliser une solution peu éluante vis-à-vis des analytes cibles afin de ne pas les perdre tout en éliminant un maximum des composés interférents plus faiblement retenus. Enfin, les analytes cibles sont désorbés

Chapitre II

avec un faible volume d'une solution de forte force éluante. Une grande partie des interférents ayant été éliminée lors des étapes de percolation et de lavage, la fraction ainsi obtenue a donc été purifiée. Le rendement d'extraction peut ensuite être déterminé en calculant le rapport entre la quantité de soluté retrouvée dans la fraction d'élution et la quantité percolée. En plus de la purification, cette étape d'extraction permet de concentrer les analytes d'un facteur (appelé facteur d'enrichissement).

III.4. Paramètres clés de l'extraction sur phase solide

L'adsorbant doit tout d'abord être choisi en fonction de la nature de l'échantillon, afin de permettre une forte rétention des analytes. La force éluante du solvant constituant l'échantillon, doit être faible vis-à-vis de l'adsorbant choisi. Un exemple très fréquent est l'utilisation d'adsorbants hydrophobes pour l'extraction de composés dans des échantillons aqueux. La totalité des composés cibles percolés doivent rester fixés sur le support durant les étapes de percolation et de lavage, ce qui implique de tenir compte du volume de fin de fixation et de la capacité du support.

III.4 .1. Le volume de fin de fixation

Si l'adsorbant retient suffisamment, la quantité d'analyte fixée augmentera proportionnellement au volume d'échantillon percolé, améliorant ainsi, pour un même volume d'élution, le facteur d'enrichissement. Cependant, à partir d'un certain volume, les solutés finiront par être élués par le solvant qui constitue l'échantillon. Ce volume est appelé volume de fin de fixation V_f (ou volume de fuite) et est généralement défini au moment où la concentration de l'analyte en sortie de cartouche représente 1% de la concentration percolée. Si les solutions de percolation et de lavage sont de même composition, la somme de ces deux volumes doit impérativement être inférieure au volume de fin de fixation pour obtenir un

Chapitre II

rendement d'extraction de 100%. Dans le cas d'utilisation d'une solution de lavage plus éluante que la solution de percolation, le volume de fin de fixation diminue. Il faudra alors s'assurer que les volumes choisis n'entraînent pas d'élution anticipée de l'analyte. Sa détermination s'effectue le plus souvent de façon expérimentale en augmentant progressivement les volumes des fractions, tout en maintenant la quantité percolée constante jusqu'à observer une élution de l'analyte.

Les choix respectifs des volumes de percolation et de lavage sont guidés par l'objectif de l'étape d'extraction sur phase solide. Si l'objectif premier est de préconcentrer l'analyte présent en quantité très faible dans l'échantillon, on privilégiera un volume de percolation élevé, et donc un volume de lavage faible. En revanche, si l'analyte est présent dans une matrice complexe, on favorisera sa purification en choisissant un volume et/ou une force éluante de lavage élevés.

III.4 .2. La capacité

Le deuxième paramètre important à prendre en compte pour le développement d'une procédure SPE est la capacité du support. Elle est dépassée lorsque la quantité d'analytes à extraire est supérieure au nombre de sites actifs à la surface de l'adsorbant. Ceci conduit à une élution anticipée de l'analyte, même pour des volumes inférieurs à V_f . Une solution simple pour contourner ce problème consiste à augmenter la quantité d'adsorbant. Ce dépassement de capacité reste cependant assez rare car dans la plupart des cas, la SPE s'applique à des composés présents à l'état de trace. La capacité d'une cartouche SPE conventionnelle (support à base de silice greffée, polymères...) est généralement comprise entre 1 et 5 % de la masse d'adsorbant [181,182]. Sa détermination peut s'effectuer après avoir optimisé une procédure d'extraction en mesurant les rendements d'extraction de solutions de concentrations croissantes. Ces rendements d'extraction seront constants puis chuteront, témoignant ainsi de

Chapitre II

la saturation du support. La capacité est donc identifiée comme étant la quantité maximale d'analyte percolée au-delà de laquelle le rendement d'extraction n'est plus constant.

III.5. Extraction en différé et extraction en ligne

III.5. 1. Extraction en différé

III.5. 1.1. Principe

On parle d'extraction en différé lorsque l'étape de SPE est totalement dissociée de l'analyse chromatographique. En effet, l'éluat de l'extraction est recueilli dans un flacon et peut éventuellement être évaporé à des fins de concentration ou de changement de solvant. Après reprise dans une solution appropriée, une fraction de l'éluat est injectée dans le système chromatographique. Le principal avantage de l'approche en différé est sa grande flexibilité. De nombreux paramètres peuvent être modifiés et optimisés : la quantité d'adsorbant, la nature et le volume de la solution d'élution ou le format du dispositif d'extraction. D'autre part, la simplicité de l'équipement requis en fait une méthode peu coûteuse. Des robots permettent l'automatisation de la procédure lorsque le nombre d'échantillons à manipuler est important. Cependant, les étapes manuelles d'évaporation, de reprise et d'injection peuvent constituer des sources de pertes, de pollutions et d'incertitudes.

III.5. 1.2. Matériel d'extraction

III.5. 1.2. 1. Les cartouches

La cartouche d'extraction en polypropylène avec ou sans réservoir (*Figure II.15*) correspond au matériel le plus utilisé. L'adsorbant est contenu entre deux supports en verre fritté et sa granulométrie est généralement comprise entre 40 et 60 µm afin de permettre un écoulement facile des échantillons et des différentes solutions de la procédure d'extraction sans perte de charge trop importante. Les cartouches de 3 et 6 mL, contenant 500 mg de

Chapitre II

phase, sont les plus utilisées. Cependant, l'amélioration de la sensibilité des systèmes analytiques permet de réduire les volumes d'échantillons nécessaires, donc les volumes d'adsorbant. Les cartouches de 1 mL, contenant moins de 100 mg d'adsorbant, sont donc de plus en plus répandues [183].



Figure II. 15 : Cartouches pour l'extraction sur phase solide. Adapté de [184,185]

III.5. 1.2. 2. Les disques

Les disques pour l'extraction sur phase solide sont constitués d'une membrane de PTFE d'environ 0,5 mm d'épaisseur dans laquelle des particules d'adsorbant sont incorporées. Ces particules représentent 90% de la masse du disque. L'importante surface de section permet l'emploi de particules de faible granulométrie (entre 8 et 12 µm) ainsi que l'utilisation de débits plus élevés que pour les cartouches (jusqu'à 200 mL/min). Ce format est particulièrement intéressant pour l'extraction de grands volumes d'échantillon en un temps court. Comme le montre la *Figure II.16*, ces disques sont utilisés de la même manière qu'un papier filtre lors d'une filtration sous vide. Pour l'extraction de plus faibles volumes, un format miniaturisé intégré dans une cartouche de polypropylène est disponible. Dans ce cas, le PTFE est souvent remplacé par de la fibre de verre [186].

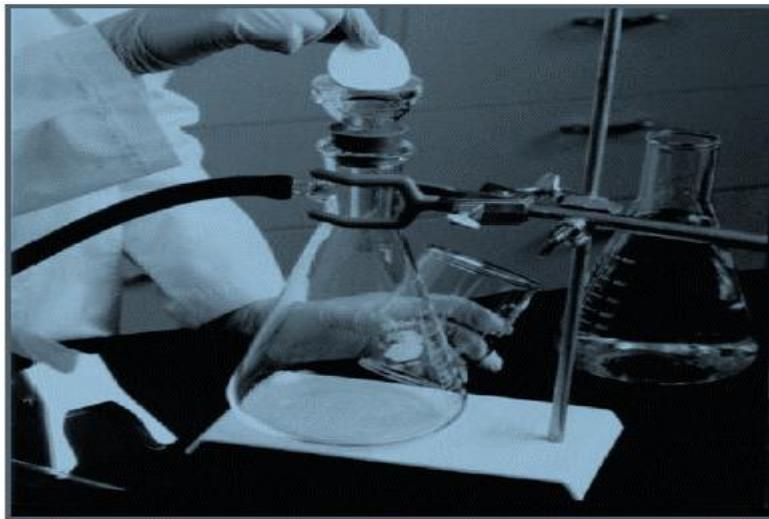


Figure II. 16: Disque pour l'extraction sur phase solide et son dispositif [187]

II.5. 1.2. 3. Les plaques SPE à 96 ou 384 puits

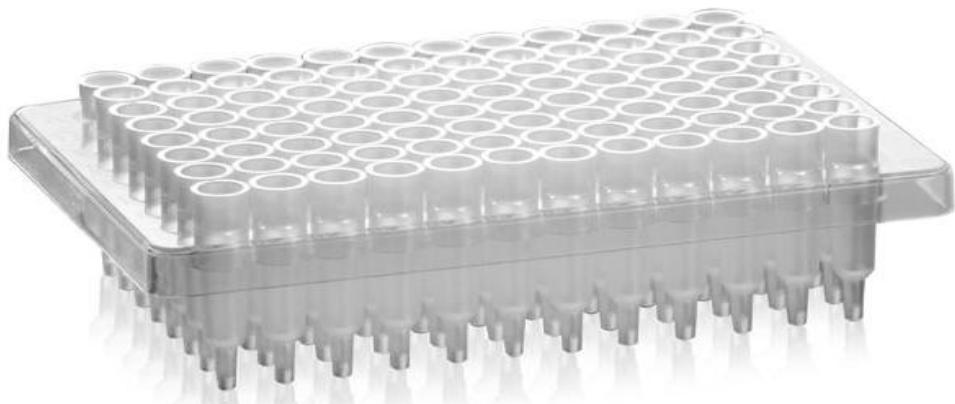


Figure II. 17: Plaque SPE de 96 cartouches [188]

Le format de plaques à 96 puits (Figure II .17) est apparu pour répondre au besoin du haut débit d'analyse d'échantillons par un processus automatisé. Sur chacun des 96 puits se trouve une cartouche SPE de 1 ou 2 mL contenant 5 à 100 mg d'adsorbant. Les plaques à 384 puits permettent aujourd'hui de traiter un plus grand nombre d'échantillons par unité de

temps, toutefois, des problèmes de contaminations de puit à puit ainsi que d'hétérogénéité de débit peuvent survenir [183].

III.5. 2.Extraction en ligne

III.5. 2.1. Principe

L'adsorbant peut aussi être placé dans une précolonne, installée sur une vanne de commutation à six voies, sur laquelle sont également connectées une pompe permettant la percolation de l'échantillon, une pompe analytique et la colonne analytique. La différence principale avec l'extraction en différé est que les analytes piégés lors de l'extraction sont transférés directement de l'adsorbant à la colonne analytique. Ce type de montage, dit d'extraction en ligne, est présenté en figure II.18.

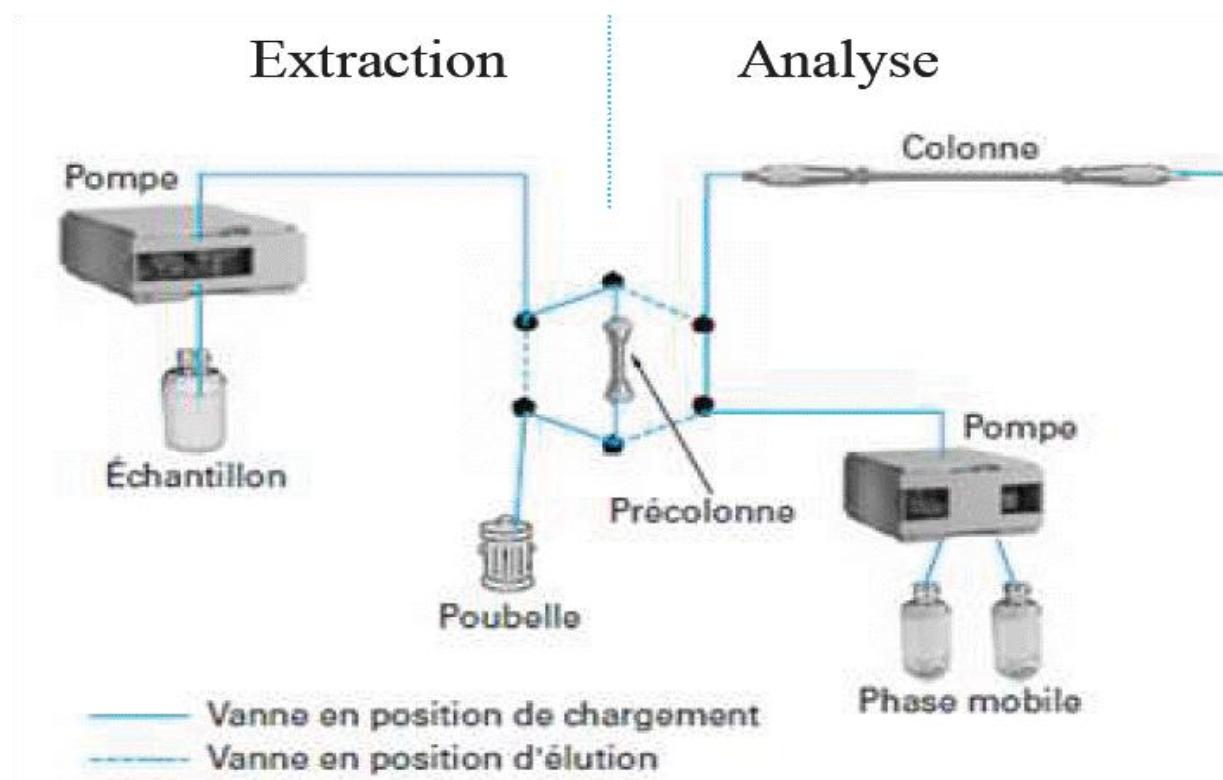


Figure II. 18: Couplage en ligne de l'extraction sur phase solide avec la chromatographie en phase liquide [181].

Chapitre II

Les solutions de conditionnement, de percolation et de lavage traversent la précolonne grâce à la pompe de préconcentration. L'étape d'élution est réalisée en commutant la vanne, ce qui provoque le passage de la phase mobile grâce à la pompe analytique, par la précolonne pour assurer la désorption des composés et leur transfert vers la colonne analytique. Généralement, on réalise le montage de sorte à effectuer une élution en mode rétro-balayage (back flush), c'est à- dire en procédant à l'élution en sens contraire du sens de percolation. Ceci permet de limiter les phénomènes d'élargissement de bande mais aussi de transférer simultanément des solutés vers la colonne analytique quelque soit leur facteur de rétention sur la précolonne, facilitant ainsi la comparaison des temps de rétention avec une injection directe. Cependant, dans le cas d'exactions d'échantillons environnementaux ou biologiques, ce type de montage engendre la concentration des matières en suspension en tête de précolonne et donc le transfert de ceux-ci vers la colonne analytique lors de l'élution, ce qui peut engendrer son colmatage.

Contrairement à la méthode en différé où seule une fraction de l'eluat est injectée, ici, la totalité des composés retenus par l'adsorbant est entraînée vers la colonne analytique. Ce gain en sensibilité permet de pouvoir réduire le volume percolé, surtout pour des échantillons pour lesquels de faibles volumes sont disponibles, tout en gardant une sensibilité suffisante. L'approche en ligne minimise le nombre d'interventions à effectuer pour préparer l'échantillon. Les risques de perte ou de contamination que l'on rencontre en mode différé sont donc largement réduits, faisant de l'approche en ligne une méthode plus juste et plus précise. De plus, cette méthode possède l'avantage de consommer moins de solvant organique, l'élution étant assurée par la phase mobile.

Le fait que la précolonne soit placée en série avec le système chromatographique implique quelques contraintes. Tout d'abord, la précolonne et l'adsorbant doivent pouvoir résister aux pressions générées par le système chromatographique. L'échantillon et la phase

Chapitre II

mobile doivent également être miscibles, alors qu'en mode différé, un changement de solvant est possible. De plus, à chaque extraction correspond une analyse, contrairement au mode en différé où plusieurs analyses sont possibles à partir d'un même éluat. En ce qui concerne les dimensions de la précolonne, il est recommandé d'utiliser un diamètre équivalent ou inférieur à celui de la colonne analytique afin d'éviter ou de limiter les phénomènes d'élargissement de pics. La nature de l'adsorbant utilisé pour une extraction en ligne et la phase stationnaire de la colonne analytique doivent également être judicieusement choisies de manière à permettre un couplage efficace. En effet, la colonne analytique doit idéalement avoir un pouvoir de rétention plus important que la précolonne, de sorte à concentrer les analytes en tête de colonne analytique après leur élution de la précolonne et ceci afin d'éviter de nouveau les élargissements ou des traînées de pics. Cette condition peut être difficile à respecter dans le cas de l'extraction de composés très polaires qui nécessitent des adsorbants très hydrophobes (comme on le verra par la suite), et des phases mobiles très riches en eau pour assurer leur rétention en chromatographie de partage à polarité de phase inversée, ce qui engendre un mauvais transfert des analytes. Toutefois, ces asymétries de pics peuvent parfois être corrigées. L'utilisation d'un gradient avec un taux en solvant organique initial et une pente relativement élevée peut entraîner une compression du pic. D'autre part, si la colonne analytique est d'un diamètre significativement plus important que celui de la précolonne, le débit plus élevé imposé par cette colonne rendra plus rapide le transfert des analytes de la précolonne vers la colonne analytique, et en conséquence des pics plus étroits seront obtenus. Le fait que le mode en ligne n'implique que peu d'interventions rend son automatisation intéressante, la contrainte la plus importante étant de maintenir l'étanchéité du système lors des changements de précolonne.

Enfin, les systèmes automatisés permettent de procéder à l'extraction d'un échantillon pendant l'analyse de l'échantillon précédent, ce qui diminue le temps total d'analyse.

Chapitre II

III.5. 2. 2. Les précolonnes

Alors que les cartouches ou les disques utilisés pour l'extraction en différé ne sont pas restreints en taille, les dimensions des précolonnes employées pour l'extraction en ligne sont limitées par celles de la colonne analytique (cf paragraphe précédent). Une longueur de précolonne inférieure à 15 millimètres est recommandée pour le couplage à des colonnes analytiques classiques de longueur comprise entre 15 et 25 cm [189]. Comme déjà évoqué, le diamètre interne de la précolonne doit être inférieur ou égal à celui de la colonne analytique.

Les dimensions des précolonnes utilisées par les automates sont comprises, selon les modèles, entre 5 et 10 mm de longueur pour 2 à 4 mm de diamètre interne [190]. Ces précolonnes sont généralement destinées à un usage unique, même si certaines d'entre elles peuvent être réutilisées.

III.6. Les différents adsorbants utilisés

Le choix de l'adsorbant à utiliser pour l'étape de SPE dépend en premier lieu de la nature de l'échantillon (aqueux ou organique), et ensuite de la nature du ou des analytes à extraire (polarité, propriétés acido-basiques, taille, groupes fonctionnels). En effet, une réflexion préalable doit être menée sur la nature des interactions impliquées dans le mécanisme de rétention des analytes cibles sur l'adsorbant afin de choisir l'adsorbant adéquat. Ainsi, les adsorbants peuvent être classés en fonction de la nature des interactions qu'ils développent avec les analytes.

III.6. 1. Les adsorbants polaires

Les principaux adsorbants polaires sont la silice vierge, la silice greffée par des groupements polaires (diols, amines ou nitriles), l'alumine ou le Florisil. Grâce à ce type

Chapitre II

d'adsorbants, les analytes sont extraits d'échantillons apolaires par le développement d'interactions polaires. L'élution est réalisée par percolation d'un solvant polaire pour rompre ces interactions. Les principales applications de ce type d'adsorbant concernent les échantillons non aqueux, comme les huiles ou les produits pétroliers. Ils peuvent également intervenir comme support de purification après une première étape d'extraction par un solvant d'un échantillon solide. A titre d'exemple, l'analyse des composés organophosphorés à partir des produits alimentaires peut être réalisée par une première étape d'extraction par un solvant suivie d'une purification par SPE avec de la silice vierge [191]. De la même manière, ces adsorbants peuvent être utilisés pour purifier les extraits apolaires lors de la recherche de cocaïne dans des tissus biologiques ou dans des organes [192].

III.6. 2. Les adsorbants apolaires

Les adsorbants à polarité de phase inversée sont les plus couramment utilisés pour les échantillons aqueux. Les analytes y sont retenus par interactions hydrophobes et élués par percolation d'un solvant organique. La silice greffée n-alkyle (C_8 ou C_{18}) et les polymères hydrophobes (polystyrène-divinylbenzène principalement) sont les adsorbants les plus utilisés. Ces deux types de supports présentent l'avantage de résister à la pression et d'être utilisés avec des solvants compatibles avec les phases mobiles de la chromatographie liquide de partage en phase inversée, ce qui permet leur utilisation dans un système en ligne. La silice C_{18} souffre cependant de quelques limitations. En effet, elle ne peut être utilisée qu'entre pH 2 et pH 8 alors que les polymères sont stables sur toute la gamme de pH (0-14). De plus, les polymères hydrophobes possèdent un plus grand pouvoir de rétention pour les composés polaires. Néanmoins, la silice C_{18} reste de loin l'adsorbant le plus utilisé [193]. Elle permet par exemple l'extraction des composés organophosphorés à partir des matrices biologique et des échantillons aqueux [194, 195].

Chapitre II

III.6. 3. Les échangeurs d'ions

Les échangeurs d'ions sont constitués de silice ou de polymères greffés par des groupements ionisés ou ionisables, comme les acides carboxyliques ou les acides sulfoniques pour les échangeurs de cations, ou les amines pour les échangeurs d'anions. Des mécanismes de rétention basés sur des interactions électrostatiques sont mis en jeu sur ce type de support. Les composés à extraire ainsi que les sites actifs du support doivent être ionisés au pH de la solution percolée pour qu'ils puissent interagir. L'élution peut être réalisée en percolant une solution dont le pH neutralise soit les analytes, soit les sites actifs du support. Si la gamme de pH utilisable ne permet pas cette neutralisation, une solution à forte force ionique peut permettre l'élution des analytes. L'inconvénient majeur de ce type d'adsorbant est qu'ils sont peu performants pour l'analyse de traces de composés organiques ionisables dans des échantillons à forte teneur en ions inorganiques, comme les échantillons environnementaux ou biologiques. En effet, les sites de rétention sont saturés par ces ions et deviennent incapables de retenir les analytes cibles.

III.6. 4. Les supports mixtes

Les adsorbants décrits précédemment retiennent les analytes grâce à un seul type d'interaction. Tous les composés présents dans l'échantillon pouvant également être retenus par ce type d'interaction seront coextraits. De plus, si la séparation chromatographique est basée sur un mécanisme de rétention proche de celui de l'étape de SPE, les composés co-extrats peuvent causer des co-élutions lors de la séparation. Les supports mixtes, basés sur la contribution de deux mécanismes de rétention différents, permettent d'obtenir une meilleure purification par l'étape d'extraction.

Les supports mixtes les plus courants associent une rétention hydrophobe, assurée par une silice greffée C₁₈ ou C₈ ou par un polymère hydrophobe, à une rétention par échange

Chapitre II

d’ions, assurée par des groupements acides ou basiques introduits par greffage ou polymérisation de co-monomères fonctionnalisés. Lors de la percolation de l’échantillon aqueux, les analytes sont retenus par interactions hydrophobes et par interactions électrostatiques si l’état d’ionisation de la molécule au pH de l’échantillon le permet. L’avantage de ces supports est que plusieurs lavages (chacun favorisant une interaction tout en rompant l’autre) peuvent être effectués. Ainsi, un lavage par une solution polaire permettra l’élimination de tous les sels et les composés faiblement retenus par interactions hydrophobes tout en conservant les analytes. Après avoir mis les analytes sous forme ionisée, un lavage avec une solution apolaire permettra l’élimination de tous les composés apolaires ne pouvant développer, comme les analytes, des liaisons électrostatiques avec l’adsorbant. Ceci réduit le nombre potentiel de composés interférents co-extrai ts, puisque seuls seront co-extrai ts ceux qui possèdent une polarité voisine et la même charge (positive ou négative) que l’analyte cible.

III.6. 5. Limitations des supports conventionnels

Pour l’extraction de composés à l’état de traces dans les matrices complexes, les supports présentés précédemment ne permettent pas toujours une purification suffisante de l’échantillon. Le risque d’extraction de composés interférents est élevé, ce qui peut engendrer des pics chromatographiques impurs, faussant ainsi la quantification des analytes cibles. Une purification efficace est également nécessaire pour les analyses en chromatographie liquide couplée à des détecteurs spécifiques, tels que la spectrométrie de masse. En effet, bien que ce détecteur soit spécifique et très sensible, il est parfois sujet à des effets de matrice, causés par des composés interférents co-élus, se manifestant par une diminution ou une amplification du signal [196]. Ils affectent alors la justesse et la précision de la méthode analytique, conduisant à des résultats moins fiables [197,198]. La présence et l’importance de ces effets de matrice sont mesurées en comparant les réponses obtenues lors de l’injection d’un standard

Chapitre II

et celle d'un échantillon dopé après traitement. Leur évaluation lors du développement d'une méthode analytique est indispensable au risque d'augmenter la probabilité d'obtenir des faux négatifs ou des faux positifs [199]. Un exemple de la manifestation de ce phénomène est présenté en *figure II.19*. Les auteurs ont dopé différents légumes par un pesticide, le triflumizol, à la même concentration et les réponses observées ont été comparées à celle obtenue en milieu pur.

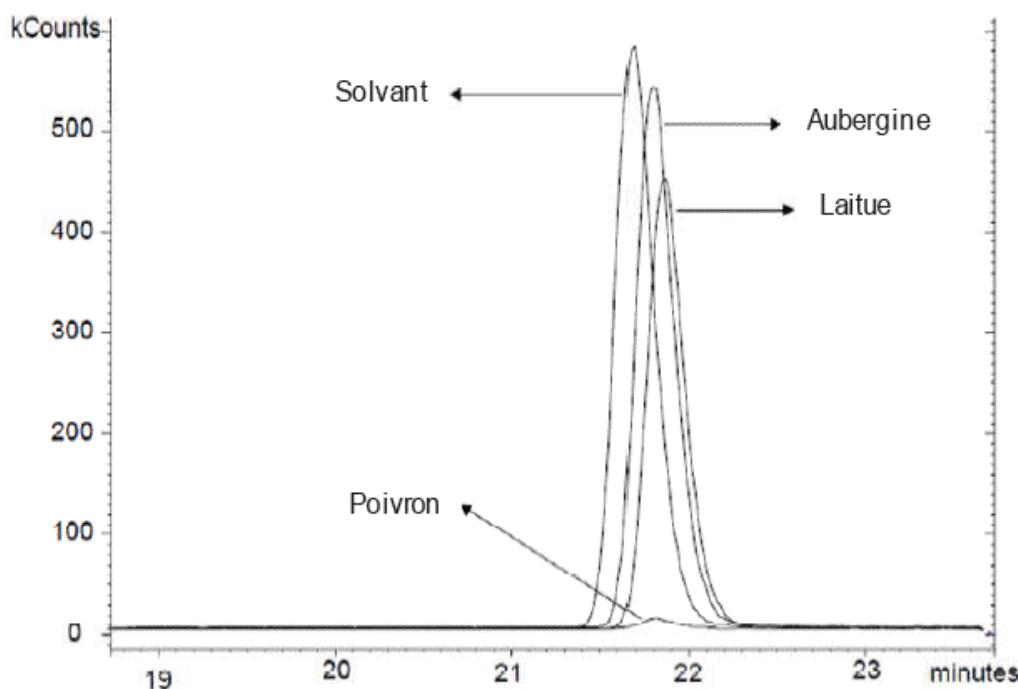


Figure II. 19: Exemple d'effet de matrice en HPLC-MS². Analyse du triflumizol dans différents légumes dopés à la même quantité. Adapté de [200]

Une grande différence de signal a été observée indiquant la présence d'effets de matrice, en particulier pour le poivron, pour lequel une suppression quasi-totale du signal est observée. Plusieurs solutions existent pour réduire ou éliminer des effets de matrices. Le recours à des standards isotopiques peut être efficace, à condition qu'ils se comportent de la même manière que l'analyte face aux effets de matrice [196]. Toutefois, le nombre d'isotopes disponibles est limité et ils restent relativement chers. Une autre approche consiste à éliminer

Chapitre II

les co-élutions responsables des effets de matrice en améliorant la séparation chromatographique, menant en contrepartie à un allongement du temps d'analyse. Ces co-élutions peuvent également être éliminées lors d'une étape de traitement de l'échantillon permettant sa purification, telle que l'extraction sélective sur phase solide.

L'extraction sélective sur phase solide a pour objectif d'extraire uniquement le ou les analytes cibles de l'échantillon complexe. Des supports plus sélectifs basés sur des mécanismes de reconnaissance moléculaire ont donc été développés. Il existe à l'heure actuelle deux types de supports dont la rétention est basée sur la reconnaissance moléculaire : les immunoadsorbants et les polymères à empreintes moléculaires.

III.7. Extraction solide liquide en utilisant les MIPs (MISPE)

Un polymère à empreintes moléculaires est un polymère qui « garde en mémoire » la forme et les groupements fonctionnels de la molécule cible. Ce matériau est conçu pour reconnaître sélectivement les molécules patron utilisées dans le procédé d'impression même en présence de composés de structures et de fonctionnalités similaires à ceux de la molécule cible. Les polymères à empreintes moléculaires (MIPs) agissent ensuite comme des systèmes biologiques (anticorps, enzymes, récepteurs...). Des propriétés de reconnaissance moléculaire importantes peuvent être obtenues avec ces MIPs pour une grande variété de molécules [201]. L'application des MIPs comme adsorbants en SPE a été jugée très utile pour l'extraction sélective, comme les MIPs offrent une sélectivité plus importante que celle des méthodes conventionnelles. Les MIPs réduisent aussi l'influence de la matrice sur le chromatogramme résultant, et permettent d'obtenir des taux de recouvrement très élevés à partir des échantillons réels. Le travail sur MISPE a été initié par Sellergen en 1994 qui a extrait avec succès le pentamidine, un médicament pour le traitement de la pneumonie due au SIDA, à partir d'échantillons d'urine humaine en utilisant un MIP comme adsorbant en SPE [202].

Chapitre II

Plusieurs applications de MISPE ont été également employées avec succès dans la détermination d'échantillons environnementaux et pharmaceutiques comme la nicotine dans le chewing-gum [203] et l'atrazine dans le foie de bœuf [204]. La technique MISPE a été utilisée pour la purification de l'extrait et pour la préconcentration de l'analyte cible avant sa quantification. Cette technique a permis d'éliminer les composants s'immisçant dans l'échantillon et par la suite elle a amélioré l'exactitude de l'analyse en HPLC ainsi que la limite de détection.

A la différence des autres adsorbants, la stabilité des MIPs leur permet de pouvoir être réutilisés aussitôt après le passage d'un solvant adapté afin de reconditionner le support. La synthèse des MIPs est rapide et peu onéreuse si la molécule cible est disponible à faible coût. Les valeurs de capacité obtenues sur ces supports sont généralement comprises entre 1 et 40 µmoles par gramme de support [205]. Ces valeurs sont plus de cent fois supérieures à celle observées sur les immunoadsorbants. Une étude, comparant les capacités d'un immunoadsorbant et d'un MIP destinés à la même molécule, a mis en avant une capacité trente fois supérieure pour le MIP [206]. Ceci souligne donc le potentiel des MIP, en particulier pour leur emploi dans des dispositifs miniaturisés.

Bien que la synthèse des polymères à empreintes moléculaires soit relativement rapide, l'optimisation de la procédure d'extraction est souvent plus complexe que pour les immunoadsorbants, en particulier pour le traitement d'échantillons aqueux. En effet, contrairement aux immunoadsorbants, les interactions développées lors de la percolation d'échantillons aqueux sont principalement hydrophobes, donc de nature non spécifique. Une ou plusieurs étapes de lavages sont ensuite nécessaires pour développer uniquement les interactions spécifiques et éliminer les composés non ciblés.

IV. Conclusion

Chapitre II

Les MIPs ont connu un très grand essor durant les dernières dix années, grâce à leur intérêt dans des domaines comme la synthèse ou l'analyse. La compréhension de leur mode d'action est désormais presque acquise ce qui devrait encore plus accroître leur utilisation dans les années futures. Le problème majeur réside dans leur fabrication. Le manque d'homogénéité au niveau de leur structure interne (voir même externe) pose de sérieux problèmes pour certaines utilisations. Il est donc important de développer les recherches à ce sujet afin d'obtenir un réseau polymérique homogène et donc une efficacité probablement optimale.

Notre travail s'est axé sur les MIPs en tant que phase stationnaire pour la SPE. De nouveaux polymères ont donc été synthétisés et étudiés en détail dans le but de concentrer et de purifier des échantillons naturels comme l'huile d'olive avant d'être analysés par HPLC-UV.

Une méthode basée sur la modélisation moléculaire a été aussi évaluée pour optimiser la recherche des monomères fonctionnels susceptibles de produire des MIPs d'une grande affinité et sélectivité.

CHAPITRE III

MODELISATION MOLECULAIRE ET

VALIDATION EXPERIMENTALE

I. Introduction

L'un des principaux problèmes de la conception des polymères à empreintes moléculaires, est le choix d'un protocole de polymérisation optimal pour le développement des MIPs utilisés soit en tant que capteurs ou soit en tant que phase stationnaire pour l'extraction en phase solide. Ceci est principalement dû au besoin de la sélection et de l'optimisation d'un nombre conséquent de paramètres, comme les types des monomères fonctionnels, les solvants de polymérisation, la température, les monomères réticulants etc... [207]. La formation d'un complexe de pré-polymérisation entre la molécule cible et les monomères fonctionnels est la première étape qui est la plus importante dans la synthèse des polymères à empreintes moléculaires (MIPs). Le monomère possédant une forte affinité et qui peut interagir facilement avec la molécule cible représente le matériau le plus prometteur pour donner un complexe de pré-polymérisation monomère /molécule cible le plus stable. Ceci facilite les étapes de préparation incluant la polymérisation et la formation des cavités rigides de structure complémentaire à celle de la molécule cible.

Les méthodes classiques utilisées pour la sélection de la nature et de la proportion des monomères fonctionnels pour la synthèse des MIPs, sont basées sur l'analyse des interactions monomère/molécule cible dans le complexe de pré-polymérisation en utilisant des techniques spectroscopiques (UV, RMN, IR) [208]. La complexité, le prix élevé des matériels utilisés, la forte consommation des produits et le temps nécessaire limitent l'application pratique de ces méthodes.

Une nouvelle approche de modélisation permet la sélection des monomères fonctionnels pour la synthèse de MIPs, en impliquant le criblage d'une bibliothèque virtuelle de monomères fonctionnalisés sur les molécules cibles. Cette technique développée par l'équipe de Piletsky [209] est devenue un outil très intéressant dans la production des réseaux polymériques (MIPs) qui possèdent une affinité et une sélectivité forte pour la

Chapitre III

molécule cible. Cette méthode est simple et ne demande aucun produit ou matériel coûteux.

De plus, elle permet une-recherche rapide des polymères potentiellement intéressants.

Le travail présenté dans ce chapitre vise principalement à faire une modélisation moléculaire en utilisant un logiciel SYBYL 7.0 (Tripos Inc., st. Louis, MO, les USA) pour sélectionner les monomères fonctionnels présentant une bonne affinité pour les insecticides organophosphorés, en particulier le méthidathion, le malathion, le diméthoate et le fenthion. Les résultats obtenus avec la modélisation sont validés en les comparants à ceux obtenus par l'adsorption de ces molécules organophosphorées, sur des polymères blancs correspondants aux monomères fonctionnels utilisés dans la modélisation. Une confirmation par extraction solide-liquide en utilisant les MIPs est également réalisée.

II. Partie expérimentale.

II.1. La modélisation moléculaire

II.1.1. Principe

La station de calcul utilisée pour générer les modèles moléculaires et exécuter les simulations est une Silicon Graphics Octane fonctionnant sous le système d'opération IRIS 6.5. La station de calcul est configurée avec deux processeurs 195 MHz, 1Gb de mémoire et un disque dur à 20 Gb. Ce système est en relation avec le logiciel SYBYL 6.9TM (Tripos Inc). La bibliothèque virtuelle contient 21 monomères fonctionnalisés les plus fréquemment utilisés capables de former des interactions non-covalentes avec les différentes molécules cibles (Annexe II). L'algorithme LeapfrogTM (Tripos Inc.) est employé pour tester les molécules avec la bibliothèque virtuelle et ainsi analyser les interactions entre monomères et insecticides. Les monomères donnant les valeurs de fixation virtuelles les plus fortes représentent les meilleurs candidats pour la préparation des polymères. Les structures des monomères sont sauvegardées dans la base de données SYBYL et référencées par un tableau moléculaire

Chapitre III

contenant les énergies de liaison données par Leapfrog™. Ces dernières servent de point de départ pour le lancement des évaluations complémentaires de structures dans l'analyse de la force et de la position du complexe entre le monomère et la molécule cible.

II.1.2. Minimisation de structure

II.1.2 .1. Méthode des champs de force

Le but de la mécanique moléculaire est d'associer une énergie à une conformation donnée d'une molécule. Cette dernière est considérée comme un ensemble de boules (atomes) connectés par des ressorts (liaisons) avec différentes élasticités (constantes de force). La méthode des champs de force est une technique empirique (c'est-à-dire avec de nombreuses approximations) de minimisation d'énergie qui est couramment utilisée pour prévoir la géométrie des structures. Pour trouver les structures, on doit d'abord examiner les valeurs d'énergie données pour déterminer où se situent les conformations de plus basse énergie. Le champ de force Tripos, accessible via SYBYL, est conçu spécialement pour les petites molécules et a été utilisé pour minimiser les structures présentées (Annexes I et II).

Un champ de force est caractérisé par un ensemble de fonctions d'énergie associées à une série de paramètres numériques obtenus expérimentalement ou évalués théoriquement. L'énergie E d'une molécule est donnée par la somme de toutes les contributions d'énergie. Dans le cas du champ de force Tripos, elle est représentée par l'équation suivante (Eq 6), où les calculs tiennent compte de toutes les liaisons, les angles de liaison, les angles de torsion, et les interactions non-liantes, comme indiqué dans *la figure III.1* :

$$E = \sum E_{\text{str}} + \sum E_{\text{bend}} + \sum E_{\text{oop}} + \sum E_{\text{tors}} + \sum E_{\text{vdw}} + [+ \sum E_{\text{ele}} + \sum E_{\text{dist_c}} + \sum E_{\text{ang_c}} + \sum E_{\text{tors_c}} + \sum E_{\text{range_c}} + \sum E_{\text{multi}} + \sum E_{\text{fieldfit}}] \quad (\text{Eq 6})$$

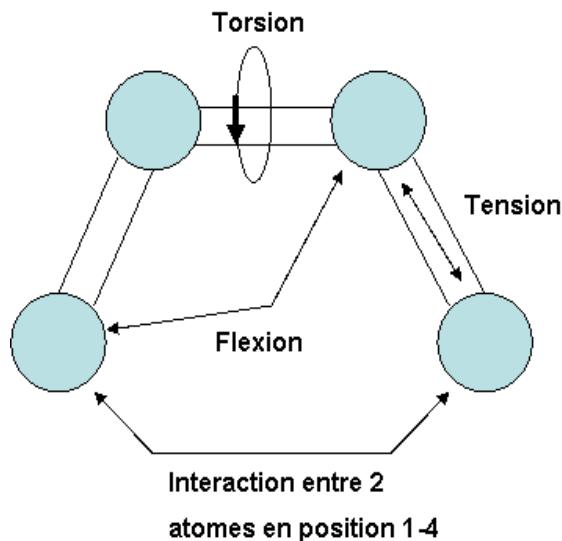


Figure III. 1: Schéma des principales déformations s'exerçant sur les liaisons d'une molécule.

Il est important de noter que la valeur numérique absolue de l'énergie E , issue du champ de force empirique, n'a aucune signification physique pour la molécule. Mais la différence d'énergie entre plusieurs conformations d'une même molécule a un sens physique puisque qu'elle permet par exemple de connaître la position exacte des atomes à un minimum local.

II.1.2 .2. Méthode de minimisation

La somme totale de toutes les interactions atomiques donnera une valeur numérique de l'énergie de système par la méthode du champ force. Néanmoins, des perturbations très légères de seulement quelques atomes dans des régions défavorisées par le champ de force, notamment dans le cas de macromolécules, peuvent entraîner un changement aberrant de cette énergie. C'est pourquoi une procédure de minimisation doit être utilisée pour empêcher ces inconvénients.

L'énergie étant fonction des coordonnées atomiques et des définitions des constantes de forces, le programme tente de générer une structure qui correspond à un minimum d'énergie.

Chapitre III

La procédure de minimisation est une méthode itérative dans laquelle tous les paramètres définissant la géométrie du système sont systématiquement modifiés par des petits incrément jusqu'à ce que l'énergie structurale moyenne atteigne un minimum local, donnant lieu à une structure minimisée avec une géométrie convenable et très peu de forces importantes sur chaque atome, ce qui est préférable pour la suite de la modélisation.

MAXIMIN2 est la méthode utilisée pour trouver le minimum en énergie d'une molécule. Elle est basée sur une approche de mécanique moléculaire et représente la combinaison de méthodes n'utilisant aucune dérivée et celles employant la dérivée première de la fonction d'énergie. En effet, durant le procédé de minimisation, la méthode des simplex, qui est une procédure basée sur aucune dérivée, est appliquée jusqu'à ce que la force maximale sur chaque atome soit en dessous d'une valeur spécifiée. Elle permet de réduire les contraintes internes d'une molécule à un niveau respectable, même pour des structures fortement distordues au départ. Ensuite, la méthode Powell [210], basée sur la dérivée première de l'équation d'énergie, ajuste les coordonnées atomiques de tous les atomes simultanément tout en respectant le degré de liberté. Les agrégats d'atome dans SYBYL n'ont pas de degrés tandis que les atomes qui ne sont pas dans des agrégats ont trois degrés de liberté chacun (les coordonnées de l'atome). L'idée est d'effectuer une descente directement le long de la ligne de plus grande pente, et non seulement des axes. Afin d'approcher cette direction, sans calculer le gradient de la fonction, Powell se base sur la conjuguée des précédentes optimisations. Après avoir paramétré la géométrie de départ du système, la méthode utilise une série de recherches linéaires de Wolfe pour trouver une position satisfaisant les conditions dudit Wolfe. Ces conditions garantissent un minimum convenable par rapport aux paramètres de tolérance donnés. La recherche de ligne de Wolfe est pratiquement trois fois plus rapide que d'autres types de recherche de ligne conventionnelle telles que celle du gradient conjugué et utilise des règles plus avancées pour déterminer la

Chapitre III

direction de la pente. La recherche se produit dans une direction dans un espace à n dimension. Les séquences de pas sont prises dans cette direction en affinant continuellement cette direction vers le minimum, jusqu'à ce qu'un minimum local ou global soit atteint. Enfin une interpolation quadratique est faite, isolant le minimum dans la précision souhaitée.

II.1.3. Les charges

SYBYL calcule les charges électrostatiques sur chaque atome d'une molécule. Ce calcul est basé sur le nombre d'électrons de valence de chaque type d'atome et du nombre de liaisons attribué à un atome considéré. La méthode Gasteiger-Hückel est la combinaison des méthodes de Gasteiger-Marsili [211] et de Hückel [212,213]. La première calcule la composante σ de la charge de l'atome tandis que la seconde intervient sur la composante π .

La méthode Hückel est une méthode quantique applicable aux systèmes comportant des électrons π . Les orbitales moléculaires de type π sont définies telles que :

$$\psi_j = \sum_{i=1}^{N_{pi}} c_{ij} \phi_i \quad (\text{Eq 7})$$

- ψ_j = Orbital Moléculaire (OM)
- ϕ_i = Orbital Atomique (OA)
- N_{pi} = Nombre de l'atome dans le système d'électron
- C_{ij} = Coefficient dans l'OMj pour l'OAi

La résolution de ce système d'équation permet de trouver le coefficient C_{is} et les énergies E_s des OM :

$$\sum_{i=1}^{N_{pi}} (H_{ij} - S_{ij} E_s) C_{is} = 0 \quad (\text{Eq 8})$$

Chapitre III

Pour $j = 1, 2, \dots, N_{pi}$ et $\sigma = 1, 2, \dots, N_{pi}$

- $H_{ij} = 0$ pour les atomes non liés, correspond aux paramètres d'intégrale coulombienne h_i quand $i=j$, où aux paramètres de résonance k_{ij} pour les atomes liés de type π
- $S_{ij} = 0$ si $i \neq j$ et 1 si $i=j$

La charge atomique nette Q_i due aux électrons π est alors calculée :

$$Q_i = m_i - \sum_{j=1}^{N_{pi}} n_j C_{ij}^2 \quad (\text{Eq 9})$$

- m_i = nombre d'électrons π donné par l'atome i
- n_i = nombre d'électrons dans l'orbitale moléculaire j

Comme la charge des atomes impliqués dans des systèmes π est supposée être délocalisée sur tout le système π , les charges de composante π sont évaluées en premier et utilisées comme base de calculs pour les charges de Gasteiger-Marsili.

La méthode de Gasteiger-Marsili s'appuie sur la relation existant entre l'électronégativité orbitalaire X_A d'un atome A et la charge atomique totale Q résidant dans cet atome :

$$X_A = a_A + b_A Q + c_A Q^2 \quad (\text{Eq 10})$$

Où a_A, b_A et c_A sont des constantes particulières pour chaque atome A.

Dans une liaison mettant en jeu deux atomes de types différents, la charge est déplacée pour repartir l'électronégativité. Cependant tout transfert de charge génère un champ électrostatique. Ce dernier agira alors sur les déplacements de charges ultérieurs. Pour tenir

Chapitre III

compte de ce phénomène, un schéma itératif de calcul de charge concernant les liaisons σ a été adopté :

$$Q^{<k>} = \frac{X_B^{<k>} - X_A^{<k>}}{X_A^+} \bullet \alpha^k \quad (\text{Eq 11})$$

- $Q^{<k>}$ est la charge électronique déplacée dans la k ième itération le long de la liaison entre l'atome le moins électronégatif A et l'atome le plus électronégatif B
- X_A^+ est l'électronégativité du cation de l'atome le moins électronégatif A
- α^k est le facteur d'amortissement de charge.

La charge totale σ d'un atome après k itérations est alors égale à la somme des incrément Q de toutes les liaisons impliquant cet atome et la valeur de la charge de précédentes itérations.

II.1.4. Le criblage de la molécule cible

De plus en plus souvent dans les recherches assistées par ordinateur, des modèles pratiques de sites récepteurs sont créés, que ce soit directement, dans le cas par exemple d'un modèle expérimental d'une cavité réceptrice, ou bien indirectement, quand un pharmacophore est construit à partir des données d'activité des molécules testées en laboratoire. Les sites récepteurs ainsi modélisés sont ensuite testés en présence d'une série de molécules virtuelles permettant alors de déterminer celles à recommander pour la synthèse et les études ultérieures.

Leapfrog est un outil informatique capable de générer automatiquement de telles séries de ligands. Pour cela, il effectue un criblage électrostatique en essayant plusieurs fois différents ligands -dans notre cas les monomères (un seul à chaque fois)- dans différentes positions par rapport à la molécule cible puis conserve ou abandonne les résultats de l'énergie d'interaction

Chapitre III

calculée (Tripos Inc.). Le programme détermine aussi les points de fixation possibles à la surface de la molécule cible.

L'opération centrale de Leapfrog est une boucle de traitement. A chaque passage de la boucle, un type de mouvement est sélectionné de façon aléatoire. Selon le type de mouvement, un ligand existant et un ou des atomes particuliers peuvent être choisis au hasard pour exécuter ce mouvement. Leapfrog tente ensuite de réaliser le mouvement. Si ce dernier réussit, les nouvelles structures de ligand sont évaluées principalement au regard de leur énergie de liaison relative à leur précurseur immédiat.

II.1.5. Conception des polymères par ordinateur

Les insecticides organophosphorés ont été choisis comme des molécules cibles dans la modélisation moléculaire qui a été développé par Piletsky *et al.*, [209]. Toutes les structures ont été minimisées par la méthode de minimisation de Powell. La terminaison utilisée était celle du gradient et la convergence était atteinte quand la différence en énergie entre deux étapes successives était inférieure à 0,001 kcal.mol, après un minimum de 20000 itérations. Les charges de tous les atomes ont été calculées par la méthode Gasteiger-Hückel et le Champ de Force Tripos a été employé considérant la constante diélectrique de l'heptane comme solvant à 1,9. Après minimisation, une base de données de monomères a été créée pour cribler les composés cibles en servant de l'option "Ajout de fragment" du programme Leapfrog. Pour le criblage, le mode DREAM, qui permet de gérer plusieurs molécules de monomères sur le même insecticide, a été sélectionné avec 100000 itérations pour chaque analyse. L'énergie initiale a été paramétrée pour inclure les énergies des liaisons hydrogène. Le tableau Variété/Qualité est coché sur Qualité ce qui favorise le complexe monomère-insecticide de plus forte interaction plutôt qu'un ensemble de plusieurs complexes possibles mais moins puissants.

Chapitre III

II.2. Les supports polymériques

II.2.1. Préparation des polymères non imprimés utilisés dans la microplaqué

L'intérêt principal de ce travail est d'évaluer la fiabilité de la modélisation à estimer les interactions réelles entre les monomères et les molécules cibles, non pas sur le plan de la valeur énergétique de l'interaction puisque, comme nous l'avons vu dans la partie II.1.2.a de ce chapitre, la modélisation fait intervenir de nombreuses approximations et attribue une valeur "virtuelle" à l'énergie d'une molécule, mais plutôt sur les interactions relatives entre une molécule cible et plusieurs monomères fonctionnalisés. Le moyen d'évaluation utilisé est donc un procédé d'adsorption sur des polymères préparés avec chacun des monomères. Un ensemble de polymères d'évaluation a été synthétisé par polymérisation radicalaire initiée thermiquement. Le monomère fonctionnalisé et le 1,1'-azobis (cyclohexanecarbonitrile) sont ajoutés à une solution de diméthylformamide contenant le monomère réticulant : l'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA). Un rapport massique EGDMA/monomères fonctionnalisés (80/20, w/w) est choisi pour donner une certaine solidité aux polymères tout en conservant leur flexibilité. Le mélange est placé dans un tube en verre de 50mL qui est désoxygéné par un flux d'azote pendant dix minutes et ensuite qui est fermé hermétiquement. Les flacons sont posés dans un thermostat et le mélange est polymérisé thermiquement à 80°C pendant 12 heures. Les polymères monolithiques sont ensuite broyés dans du méthanol, tamisés à sec de façon mécanique à travers des tamis de 38 microns de porosité et sédimentés dans le méthanol pour enlever les particules très fines. Les particules de polymères sont alors collectées, séchées par aspiration sous vide et distribuées dans les puits de microplaqué en verre.

Chapitre III

II.2.2. Préparation des polymères à empreintes moléculaires

Quelques polymères imprimés pour certains insecticides ont aussi été préparés en suivant les conditions supposées optimales [214]. Un rapport molaire molécule cible /monomère fonctionnalisé/monomère réticulant (1/4/20) a été utilisé pour tous les MIPs. La molécule cible, les différents monomères ainsi que l'initiateur de radicaux azobisisobutyronitrile (AIBN) sont placés dans des flacons et dissous dans un faible volume de solvant en suivant les compositions présentées (ANNEXE III). Les solutions sont alors dégazées quelques instants aux ultrasons puis 10 minute par un flux d'azote. Les flacons sont ensuite fermés hermétiquement, disposés dans un bain d'huile à 80°C pendant une nuit. Les polymères sont alors broyés et tamisés afin d'obtenir des particules entre 45 et 100 µm puis correctement lavés au Soxhlet avec du méthanol/acide acétique (90/10) pendant 8 heures. Les conditions de préparation sont quelques peu différents de celles des polymères non-imprimés cités ci-dessus car ils n'ont pas été faits dans le même laboratoire. Cela ne pose pas de problème puisque les donnés des MIPs et des NIPs ne sont pas comparés directement. Quoiqu'il en soit, des polymères de contrôle non-imprimés ont aussi été préparés dans les mêmes conditions que les MIPs mais en absence de la molécule cible

II.2.3. Extraction sur solide-liquide SPE

50 mg de polymères imprimés et non-imprimés (contrôle), sont pesés et empaquetés dans les cartouches de SPE de 3 mL en verre. Les cartouches sont alors lavées au méthanol puis à l'acétonitrile pour conditionner l'adsorbant. Un volume de 0,5 mL de solution insecticide dans l'acétonitrile à une concentration de 2 mg/L est chargé dans la cartouche. Les insecticides adsorbés sont ensuite récupérés avec 1mL de méthanol/TFA 2%, évaporés à sec puis dissous dans 0,5 mL de phase mobile avant l'analyse par HPLC-UV (ANNEXE V).

Chapitre III

Les sites d'interactions sont régénérés en utilisant 1mL d'une solution d'acide chlorhydrique HCL 50 mM, puis 2mL d'acétonitrile. Toutes les expériences ont été réalisées trois fois, donnant des résultats reproductibles.

II.2.4. Adsorption en utilisant les microplaques

L'approche expérimentale est basée sur les mesures d'absorbance des solutions de pesticides dans une solution organique (heptane) qui ont été distribuées dans des puits de microplaques de verre, contenant 20 polymères non imprimés. L'affinité d'adsorption de polymères avec des pesticides organophosphorés a été validée en se basant sur la mesure de l'absorption de la solution de pesticide avant et après 1 heure d'incubation dans les puits de la microplaques. Des mesures d'absorbance ont été réalisées par spectrophotométrie UV-VIS (Shimadzu, Tokyo, Japon) à 216 nm pour le méthidathion, 200 pour le diméthoate, 220 pour le malathion et 250 pour le fenthion.

La procédure de lavage et de régénération des polymères utilisés dans la microplaques est réalisée comme suit :

1. la solution de pesticide est enlevée de la microplaques. La plaque est ensuite rincée 6 fois tout en incubant le méthanol pendant 10 à 15 minutes. Puis elle est lavée 2 fois avec de l'heptane (le solvant du pesticide).
2. Après le lavage, la microplaques est séchée dans un four pendant 20 minutes à 80°C.
3. Avant chaque expérience, le contrôle des mesures d'absorbance est réalisé en déposant seulement de l'heptane dans la microplaques (sans pesticide) et en l'incubant pendant 1 heure à 20 °C. Si l'absorption de la solution (d'heptane) n'a pas changé après l'incubation, la plaque est propre et peut être utilisée pour la prochaine expérience.
4. Les mesures d'absorbance sont faites en distribuant 200 µL de la solution 0.1g/L pesticide/heptane dans la microplaques et après incubation pendant 1 heure à 20 °C.

III. Résultats et discussion

III.1. Sélection des monomères par modélisation

La sélection des monomères fonctionnels est l'une des étapes les plus importantes pour faciliter la synthèse des polymères à empreintes moléculaires. La modélisation moléculaire représente un outil de sélection rapide et efficace qui permet de tester une large gamme de monomères fonctionnels dans un temps très court sans consommation de produits et sans utilisation de matériel coûteux [209,215]. Dans cette approche informatique, une bibliothèque virtuelle de monomères fonctionnels est créée et examinée pour toutes les interactions possibles entre les monomères et la molécule cible. Les monomères avec une énergie de liaison le plus bas c'est-à-dire de meilleure affinité à la molécule cible, représentent les monomères les plus prometteurs pour créer des cavités avec les meilleures propriétés de reconnaissance. Dans ce travail, une bibliothèque virtuelle de 20 monomères fonctionnels est utilisée. Ces produits couramment employés et qui sont capables de favoriser des interactions électrostatiques, hydrophobes, des forces de Van der Waals ou des interactions dipôle-dipôle sont examinés avec les molécules cibles (méthidathion, malathion, diméthoate et fenthion). Les énergies d'interactions monomère fonctionnel/molécule cible obtenues sont représentées dans **les tableaux (III.1, III.2, III.3, III.4)**.

Chapitre III

Tableau III.1 : Classement des monomères fonctionnels suivant leurs interactions avec le méthidathion.

Numéro	Monomères fonctionnels	Energie d'interaction Ebind (kcal/mol)
1	N, N-Methylene Bis Acrylamide (MBAA)	-29,36
2	Itaconic Acid (IA)	-26,49
3	Acrylamide	-25,75
4	Acrylamido-2-Methyl-1-Propane Sulfonic Acid (AMPSA)	-18,22
5	Ethylene Glycol Methacrylate Phosphate (EGMP)	-18,18
6	Urocanic acid (UA)	-17,74
7	UA ethyl ester	-17,07
8	2-(Trifluoromethyl)-acryl acid (TFMAA)	-15,35
9	2-Hydroxyethyl Methacrylate (2-HEM)	-15,13
10	Methacrylic acid (MAA)	-14,78
11	<i>N, N</i> -Diethylamino Ethyl Methacrylate, (DEAEM)	-7,05
12	m-Divinylbenzéne (Mdvb)	-6,87
13	Acrylic acid (AA)	-6,74
14	p-Divinylbenzene (Pdvb)	-6,66
15	o-Divinylbenzene (Odvb)	-6,35
16	Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)	-6,23
17	4-vinyl pyridine (4 VP)	-5,99
18	2-vinyl pyridine (2 VP)	-5,89
19	Styrene	-5,47
20	1-Vinylimidazole (VI)	-5,31

Le tableau III.1 présente les énergies de liaison de chaque monomère avec l'insecticide méthidathion. Les résultats obtenus montrent que l'énergie d'interaction varie en fonction des monomères fonctionnels. Plus l'énergie d'interaction est faible, plus le monomère a une affinité importante pour la molécule. Dans le cas du méthidathion, le monomère MBAA est le monomère le plus prometteur pour former un complexe très stable avec la molécule (énergie d'interaction : -29.36 kcal mol⁻¹). Les autres monomères qui

Chapitre III

favorisent des interactions importantes avec le méthidathion sont : IA (énergie d'interaction : -26.49 kcal mol⁻¹), l'acrylamide (énergie d'interaction : -25.75 kcal mol⁻¹), l'AMPSA (énergie d'interaction : -18.22 kcal mol⁻¹), et l'EGMP (énergie d'interaction : -18.18 kcal mol⁻¹).

Un deuxième insecticide organophosphoré à savoir le diméthoate a été étudié. La modélisation moléculaire a été faite de la même façon que pour le méthidathion et les résultats obtenus sont représentés dans le tableau III.2

Tableau III. 2: Classement des monomères fonctionnels suivant leurs interactions avec le diméthoate.

Numéros	Monomères fonctionnels	Energie d'interaction Ebind (kcal/mol)
1	Ethylene Glycol Methacrylate Phosphate (EGMP)	-41.25
2	Itaconic Acid (IA)	-39.89
3	Methacrylic acid (MAA)	-38 .94
4	Acrylamido-2-Methyl-1-Propane Sulfonic Acid(AMPSA)	-37.68
5	2-(Trifluoromethyl)-acryl acid (TFMAA)	-36.56
6	N, N-Methylene Bis Acrylamide (MBAA)	-29.89
7	Acrylamide	-25.06
8	4-vinyl pyridine (4-VP)	-25,04
9	2-vinyl pyridine (2-VP)	-24,78
10	Acrylic acid (AA)	-23,73
11	Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)	-20,77
12	2-Hydroxyethyl Methacrylate (2-HEM)	-18,28
13	N, N-Diethylamino Ethyl Methacrylate (DEAEM)	-17,25
14	Urocanic acid (UA)	-17,21
15	1-Vinylimidazole (VI)	17,08
16	p-Divinylbenzene (Pdvb)	16,74
17	o-Divinylbenzene (Odvb)	15,42
18	m-Divinylbenzene (Mdcb)	14, 6
19	UA ethyl ester	12,78
20	Styrene	10, 23

Chapitre III

D'après les résultats du tableau III.2, le monomère EGMP (énergie d'interaction : -41.25 kcal mol⁻¹) ainsi que les monomères IA (énergie d'interaction : -39.89 kcal mol⁻¹), MAA (énergie d'interaction : -38.94 kcal mol⁻¹) et l'AMPSA (énergie d'interaction : -37.68kcal mol⁻¹) peuvent être sélectionnés comme des monomères de bonne affinité pour la molécule diméthoate.

Le 3ème essai de la modélisation a été réalisé en utilisant un autre insecticide organophosphoré : le malathion. Les résultats obtenus sont affichés dans le tableau III.3.

Tableau III.3: Classement des monomères fonctionnels suivant leurs interactions avec le malathion.

Numéros	Monomères fonctionnels	Energie d'interaction Ebind (kcal/mol)
1	N, N-Methylene Bis Acrylamide (MBAA)	-31,07
2	Acrylamide	-26,94
3	Ethylene Glycol Methacrylate Phosphate (EGMP)	-23,37
4	Methacrylic acid (MAA)	-22,43
5	UA ethyl ester	-17,25
6	Urocanic acid (UA)	-16,59
7	Itaconic Acid (IA)	-16,58
8	Acrylamido-2-Methyl-1-Propane Sulfonic Acid (AMPSA)	-16,31
9	2-Hydroxyethyl Methacrylate (2-HEM)	-15,19
10	Acrylic acid (AA)	-13,94
11	Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)	-7,45
12	N, N-Diethylamino Ethyl Methacrylate (DEAEM)	-7,14
13	p-Divinylbenzene (Pdvb)	-6,42
14	m-Divinylbenzene (Mdcb)	-6,31
15	1-Vinylimidazole (VI)	-6,08
16	4-vinyl pyridine (4-VP)	-5,7
17	o-Divinylbenzene (Odvb)	-5,44
18	Styrene	-4,86
19	2-vinyl pyridine (2-VP)	-4,73
20	2-(Trifluoromethyl)-acryl acid (TFMAA)	-4,72

Chapitre III

Ces résultats montrent que la molécule malathion a une forte affinité avec le même monomère que la première molécule utilisée dans la modélisation : le méthidathion. Ce monomère est le MBAA (énergie d'interaction : -31,07 kcal mol⁻¹). Les autres monomères qui peuvent interagir fortement avec le malathion sont l'acrylamide (énergie d'interaction : -26,94 kcal mol⁻¹), l'EGMP (énergie d'interaction : -23,37 kcal mol⁻¹) et le MAA (énergie d'interaction : -22,43 kcal mol⁻¹).

La dernière molécule modélisée est le fenthion. Le classement des monomères suivant leur énergie d'interaction montre (Tableau III.4) que le meilleur monomère pour la préparation d'un MIP avec le fenthion comme molécule cible est l'acrylamide (énergie d'interaction : -29,07 kcal mol⁻¹) suivi par d'autres monomères qui peuvent être classés comme des monomères de bonne affinité au fenthion à savoir le MBAA (énergie d'interaction : -26,91 kcal mol⁻¹), le MAA (énergie d'interaction : -24,37 kcal mol⁻¹), l'IA (énergie d'interaction : -22,43 kcal mol⁻¹), et le TFMAA (énergie d'interaction : -22,23 kcal mol⁻¹)

La conclusion qui peut être tirée en comparant les résultats de la modélisation de ces quatre molécules organophosphorées est que le monomère N, N-Methylene Bis Acrylamide, (MBAA) peut être considéré un monomère présentant de bonnes affinités pour les molécules étudiées. Avec ce monomère l'énergie d'interaction la plus faible et donc la meilleure affinité est obtenue pour les deux insecticides méthidathion et malathion. Le MBBA est en deuxième position après l'acrylamide pour le fenthion. En ce qui concerne le diméthoate, le MBAA ne se situe qu'en sixième position.

Chapitre III

Tableau III. 4: Classement des monomères fonctionnels suivant leurs interactions avec le fenthion.

Numéros	Monomères fonctionnels	Energie d'interaction Ebind (kcal/mol)
1	Acrylamide	-29,07
2	N, N-Methylene Bis Acrylamide (MBAA)	-26,91
3	Methacrylic acid (MAA)	-24,37
4	Itaconic Acid (IA)	-22,43
5	2-(Trifluoromethyl)-acryl acid (TFMAA)	-22,23
6	Ethylene Glycol Methacrylate Phosphate (EGMP)	-21,79
7	Acrylamido-2-Methyl-1-Propane Sulfonic Acid(AMPSA)	-18,8
8	Acrylic acid (AA)	-16,33
9	Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)	-15,4
10	2-Hydroxyethyl Methacrylate (2-HEM)	-14,24
11	Urocanic acid (UA)	-10,48
12	UA ethyl ester	-9,17
13	m-Divinylbenzene (Mdcb)	-7,76
14	p-Divinylbenzene (Pdvb)	-7,36
15	2-vinyl pyridine(2-VP)	-6,7
16	4-vinyl pyridine(4-VP)	-6,3
17	o-Divinylbenzene (Odvb)	-5,84
18	Styrene	-5,5
19	1-Vinylimidazole (VI)	-5,13
20	N, N-Diethylamino Ethyl Methacrylate, (DEAEM)	-4,98

III.2. Validation expérimentale

III.2.1. Corrélation polymères virtuels-polymères réels

Pour confirmer les résultats obtenus par les modélisations moléculaires, dans cette partie, nous avons essayé de comparer les résultats d'interactions des molécules organophosphorées avec les monomères de la bibliothèque virtuelle, avec ceux obtenus par

Chapitre III

adsorption de ces molécules sur les polymères blanc correspondants. L'intention est de vérifier la similitude des données obtenues dans des tests "virtuels" et "réels".

Les polymères d'évaluation sont synthétisés en polymérisant 20% (w/w) de monomère fonctionnalisé avec 80% de monomère réticulant dans le diméthylformamide après une initiation thermique. On peut supposer une certaine variation dans la performance à cause de la différence de la masse moléculaire des monomères. Cependant des expériences ont montré que les variations d'ionisation des monomères restent minimes pour cette concentration de monomère. Par exemple, pour le polymère à base d'acide acrylique, le pKa du groupement carboxylique demeure constant (6,07) quand la concentration en monomère réticulant (EGDMA) change de 40 à 80 % [216].

Les polymères synthétisés sont broyés, tamisés et distribués dans les puits de microplaques de verre comme décrit auparavant. Puisque les interactions hydrophobes ne sont pas prises en compte par le logiciel utilisé, nous avons dû restreindre notre étude aux solvants organiques avec lesquels la force de ces interactions est minime. De part sa polarité moyenne et son utilisation comme solution de dépôt dans l'extraction par les MIPs, l'heptane a été choisi pour les tests. Les solutions d'insecticides sont déposées dans les puits contenant les 20 polymères non imprimés et l'adsorption est calculée en se basant sur la mesure de l'absorption de la solution de pesticide avant et après 1 heure d'incubation dans les puits de la microplaqué. Les mesures d'absorbance sont obtenues en utilisant un spectrophotomètre UV-VIS.

Les figures *III.2 - III.5* permettent une comparaison entre les énergies d'interaction obtenues par la modélisation associant les différents polymères avec les insecticides organophosphorés (Tableaux *III.1 à III.4*) et les pourcentages d'adsorption des mêmes insecticides sur les polymères d'évaluation. Dans toutes les figures, les monomères sont

Chapitre III

classés en fonction de l'énergie d'interaction obtenue à savoir de la plus basse à la plus élevée.

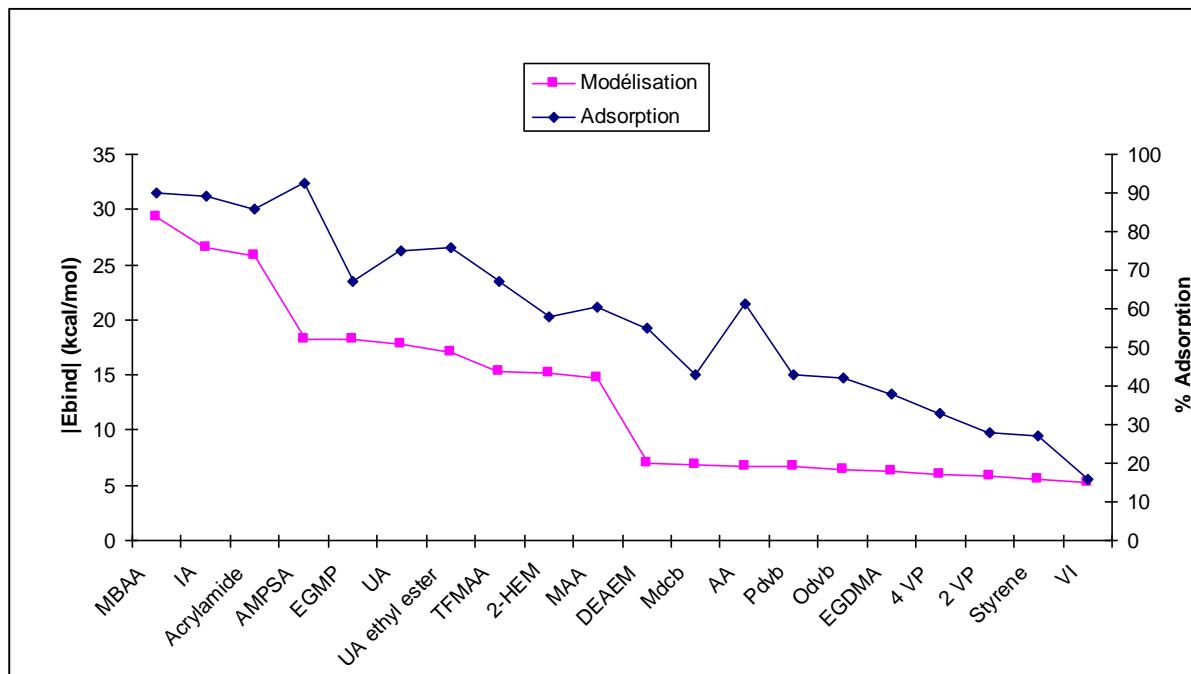


Figure III. 2: Corrélation entre l'énergie d'interaction monomère-méthidathion et le pourcentage d'adsorption du méthidathion sur les polymères blancs correspondants.

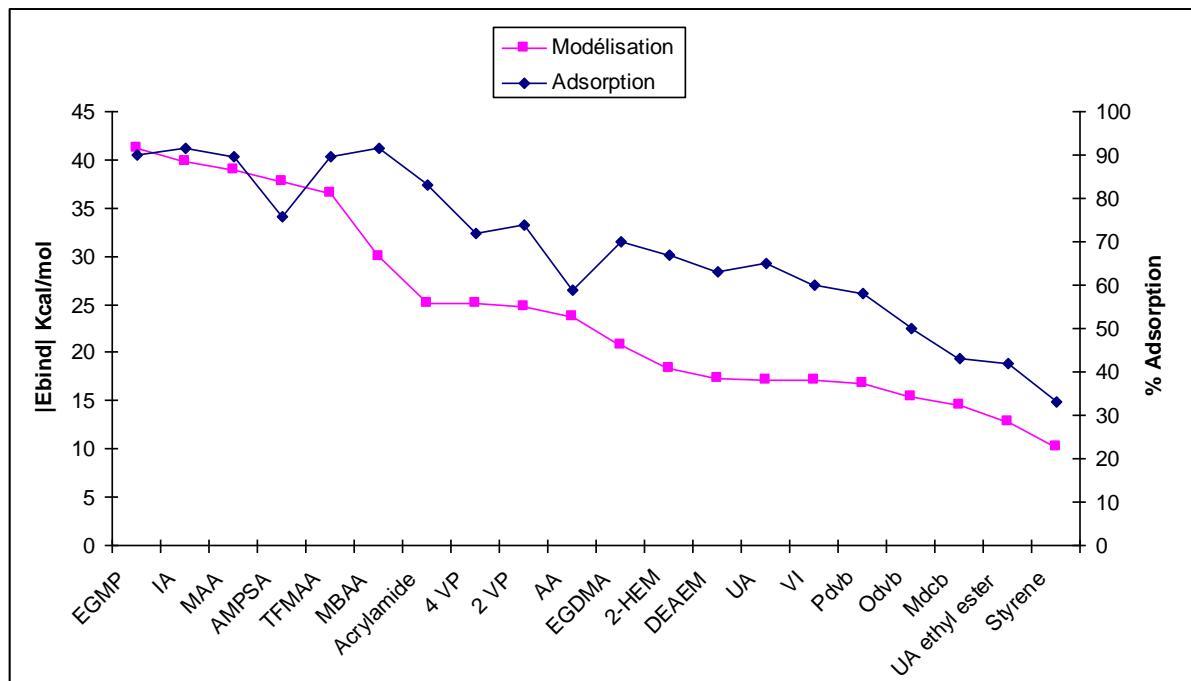


Figure III. 3: Corrélation entre l'énergie d'interaction monomère-diméthoate et le pourcentage d'adsorption du diméthoate sur les polymères blancs correspondants.

Chapitre III

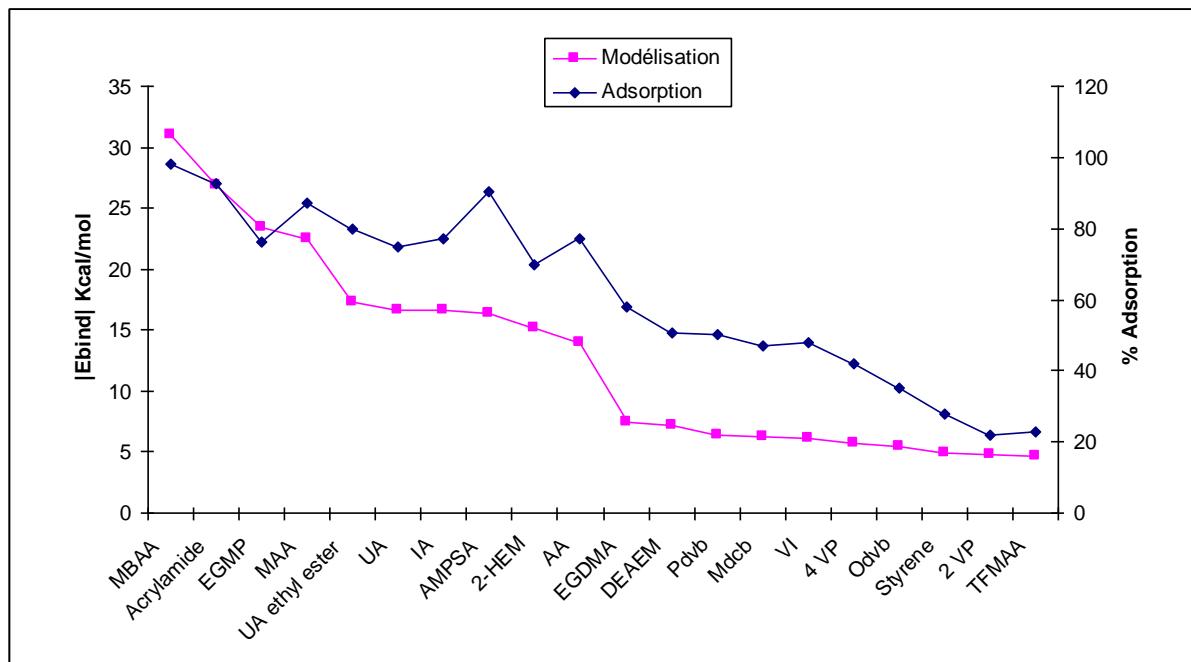


Figure III. 4: Corrélation entre l'énergie d'interaction monomère-malathion et le pourcentage d'adsorption du malathion sur les polymères blancs correspondants.

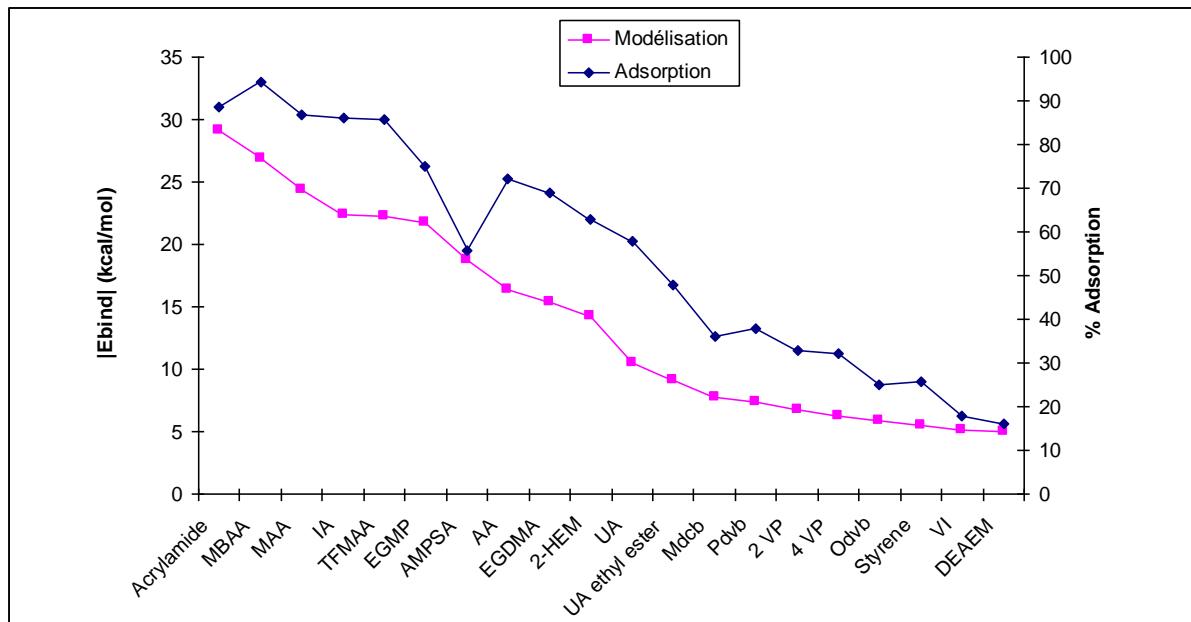


Figure III. 5: Corrélation entre l'énergie d'interaction monomère-fenthion et le pourcentage d'adsorption du fenthion sur les polymères blancs correspondants.

Comme présenté dans les figures, les résultats de l'adsorption des insecticides organophosphorés sont significativement variables pour les différents monomères, ce qui donne une indication sur les différentes forces d'interactions entre les molécules et les monomères fonctionnels.

Chapitre III

En générale, une bonne corrélation existe entre les valeurs données par la modélisation et la capacité de rétention du polymère. Les monomères qui présentent de bonnes affinités par modélisation, donnent des fortes valeurs de fixation avec les insecticides organophosphorés. Le MBAA montre une très bonne fixation, à la fois en modélisation et dans les résultats expérimentaux pour les quatre molécules étudiées, ce qui peut s'expliquer par sa taille relativement petite qui lui permet d'interagir avec des composés en réduisant les interactions répulsives de type van der Waals. De même, il est possible que cette molécule qui contient deux doubles liaisons, subisse d'importants changements de conformation pendant la polymérisation (*Figure III.6 et III.7*). En plus, la barrière stérique autour de cette molécule après la polymérisation sera trop grande pour permettre l'interaction avec les insecticides. Dans plusieurs cas, des monomères (AMPSA, AA et EGMP) donnent des pics positifs ou négatifs par rapport à ce que qu'on attend. La raison de ces pics positifs observés pour AMPSA peut s'expliquer par le fait qu'il possède une plus faible constante d'ionisation en comparaison aux autres monomères utilisés. Le pourcentage de molécules chargées interagissant avec les insecticides est alors plus important pour les polymères à base d'AMPSA que pour d'autres polymères. Evidemment cette différence n'est pas prise en compte lors la modélisation.

En moyenne, il est possible d'identifier 3 à 4 monomères intéressants. L'utilisation des deux méthodes associées permet d'améliorer le niveau de prédiction pour les insecticides organophosphorés. Il est à noter que pour ces composés, les polymères non imprimés ne peuvent pas fournir un niveau suffisant de fixation pour être utilisés dans des applications pratiques comme des extractions à partir de matrices complexes. On peut supposer que les résultats seront meilleurs avec les MIPs correspondants où la molécule cible est impliquée dans la formation de sites d'interactions spécifiques dans le polymère. Les résultats énoncés dans la partie suivante confirment cette hypothèse.

Chapitre III

Il est possible aussi que certaines différences entre la simulation par ordinateur et les performances des polymères réels aient pour origine la diminution substantielle des propriétés acide ou basique des monomères après polymérisation. En effet pour l'acide acrylique, le pKa du groupement carboxylique augmente de 4,25 à 6,3 après polymérisation et pour DEAEM, le pKa diminue de 9,4 à 6,4 : (ces résultats ont été obtenus par titration potentiométrique au laboratoire de l'université de Cranfield, Angleterre ([216]). A l'avenir, il semble important de paramétrier le logiciel afin de prendre en compte les changements des propriétés d'ionisation du monomère. Ceci pourrait améliorer le pouvoir de prévision de la simulation par ordinateur.

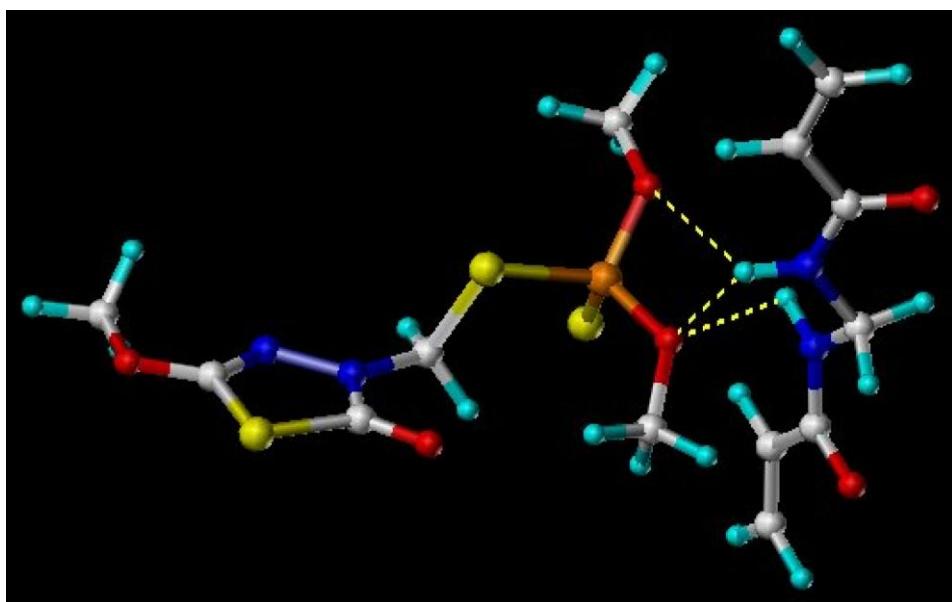


Figure III. 6 : Complexe moléculaire entre l'insecticide méthidathion et le MBAA. Les lignes pointillées jaunes montrent les liaisons hydrogène entre les molécules.

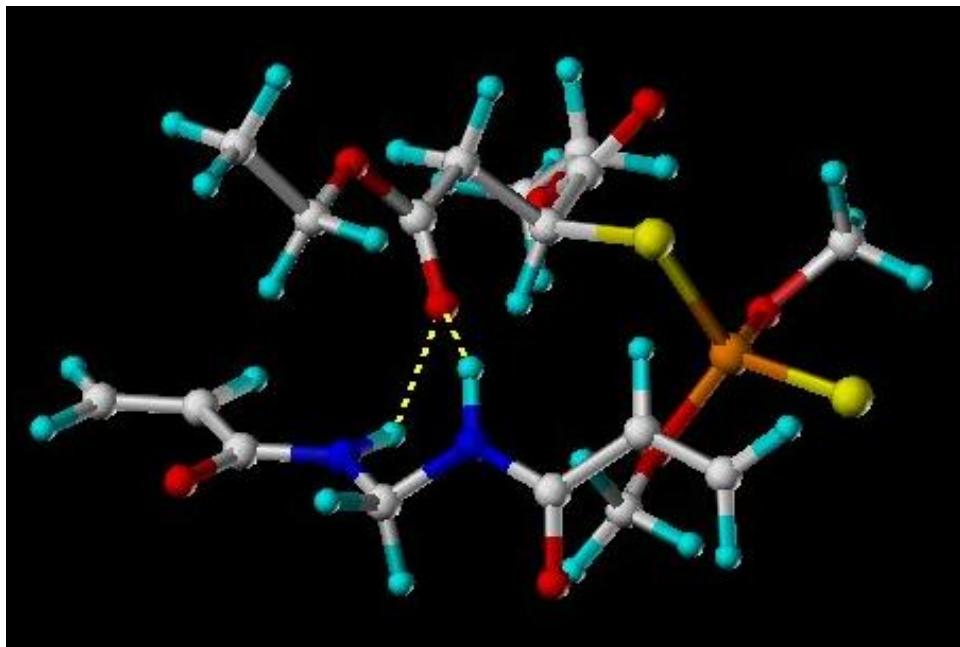


Figure III. 7: Complexe moléculaire entre l'insecticide malathion et le MBAA. Les lignes pointillées jaunes montrent les liaisons hydrogène entre les molécules.

III.2.2. Extraction solide-liquide en utilisant les MIPs

Afin de confirmer l'hypothèse que les meilleurs monomères fonctionnels donnent les meilleurs MIPs avec les molécules cibles, des polymères à empreintes moléculaires sont créés en utilisant les meilleurs monomères fonctionnels sélectionnés, pour étudier les améliorations que l'on peut obtenir. Des polymères à base de monomères fonctionnels pour lesquels l'interaction avec l'insecticide est moyenne ou faible sont aussi préparés pour servir de contrôle dans le but de comparer entre les bons et les mauvais couples monomère-insecticide. L'intérêt de cette expérience est de voir si le fait de préparer un MIP pour un insecticide améliore réellement l'affinité et la sélectivité du polymère pour l'insecticide. Mais afin de pouvoir mieux comparer les résultats, toutes les extractions sont réalisées dans l'acétonitrile. Avec ce solvant polaire, les interactions sont principalement spécifiques (type liaison hydrogène), mais des interactions dipolaires peuvent aussi intervenir. La polarité élevée de l'acétonitrile permet de mieux apprécier les écarts de rétention des insecticides sur les polymères à empreintes moléculaires et leurs correspondants non imprimés, et donc les

Chapitre III

forces relatives des interactions entre les polymères et les insecticides. Les extractions sont effectuées comme décrit dans la section II.2.3. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures ci-dessous.

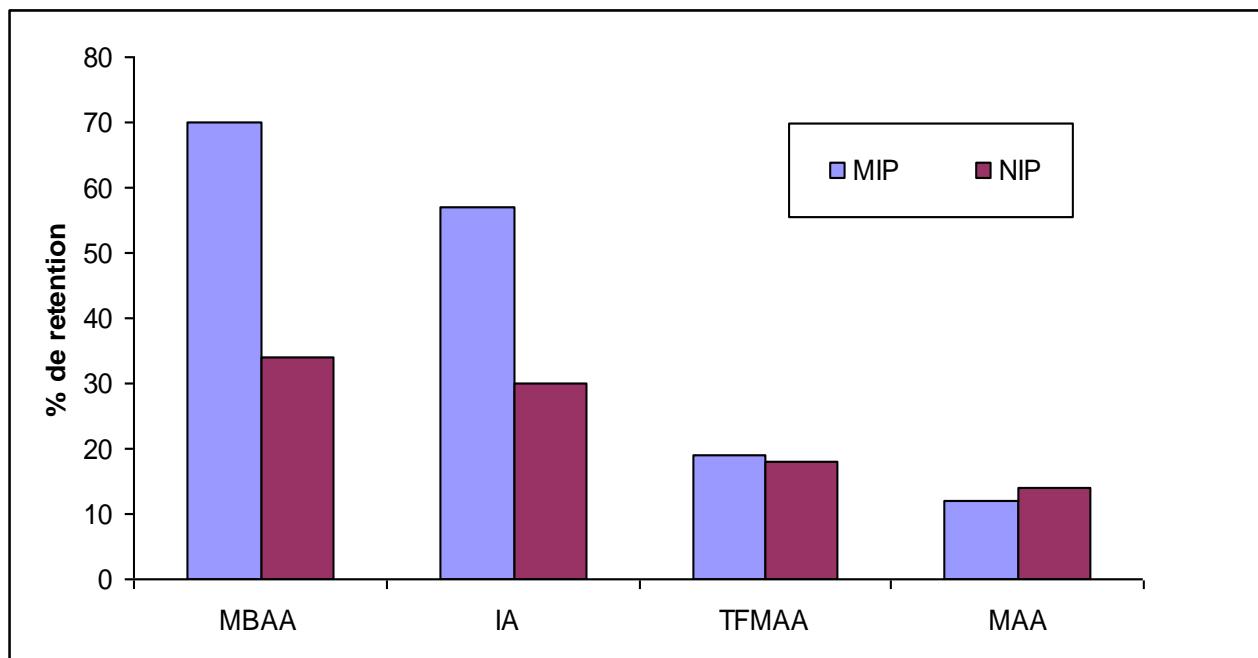


Figure III. 8 : Rendement d'extraction du méthidathion après percolation sur les polymères (MIP et NIP) de 0,5 ml d'une solution à 2mg/L dans l'acétonitrile.

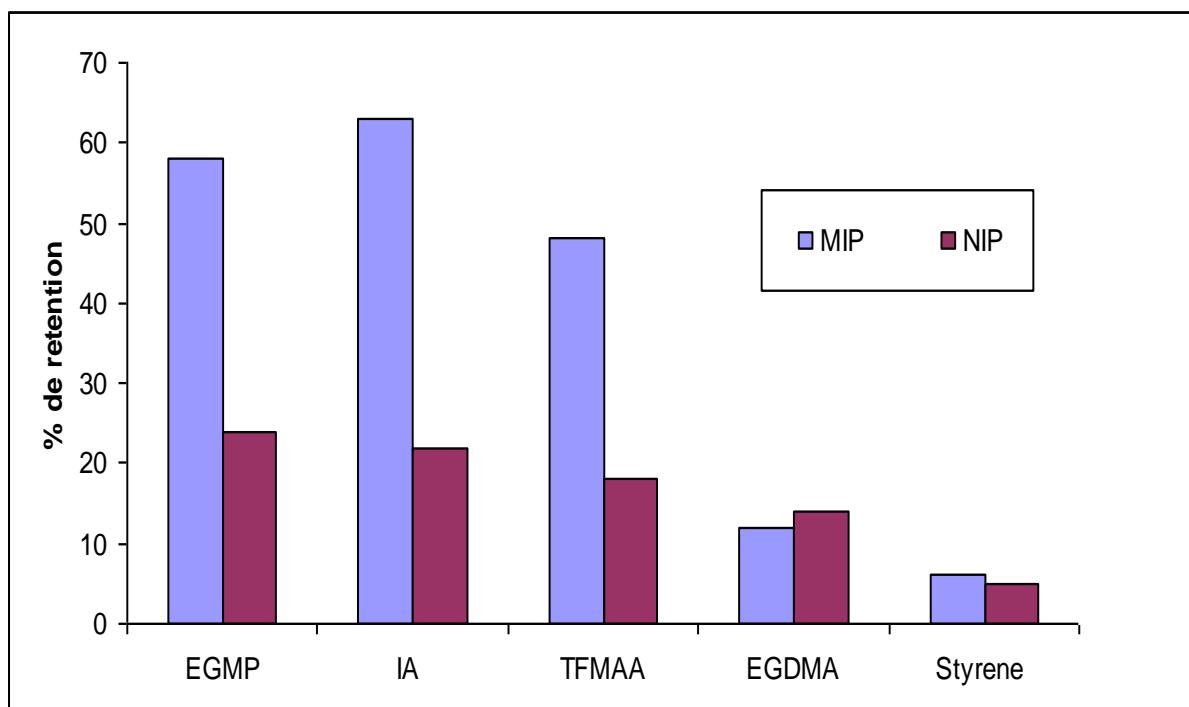


Figure III. 9 : Rendement d'extraction du diméthoate après percolation sur les polymères (MIP et NIP) de 0,5 ml d'une solution à 2mg/L dans l'acétonitrile.

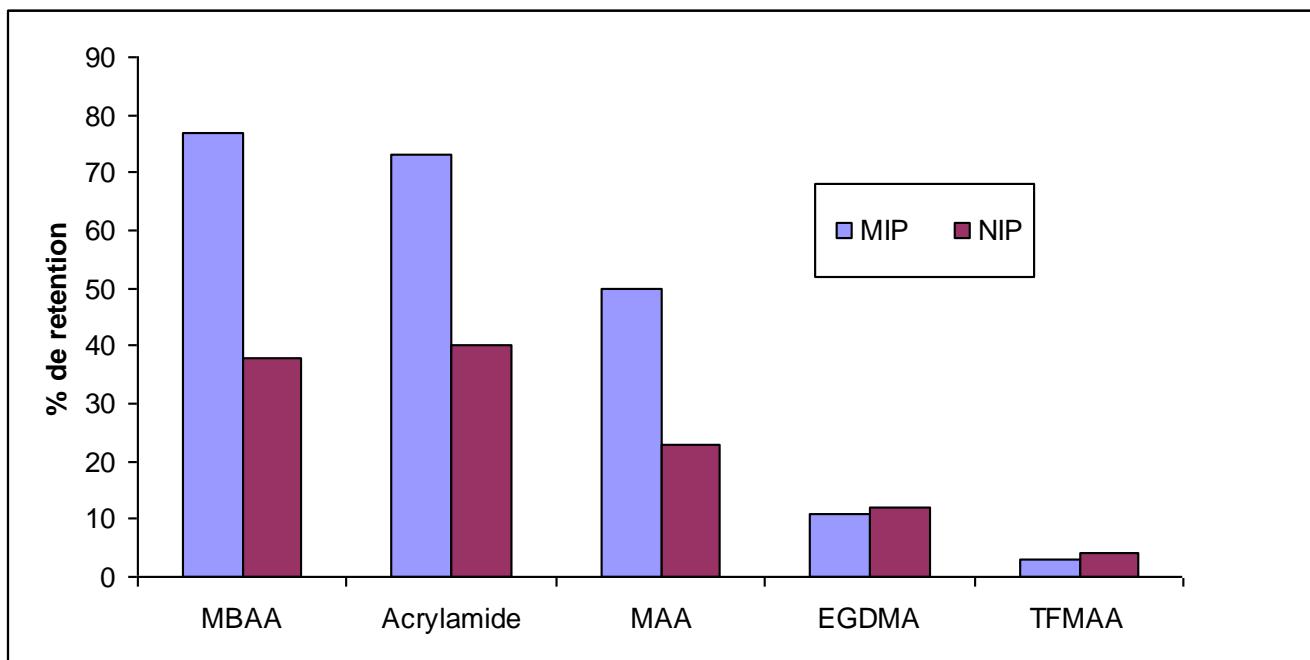


Figure III. 10 : Rendement d'extraction du malathion après percolation sur les polymères (MIP et NIP) de 0,5 ml d'une solution à 2mg/L dans l'acétonitrile.

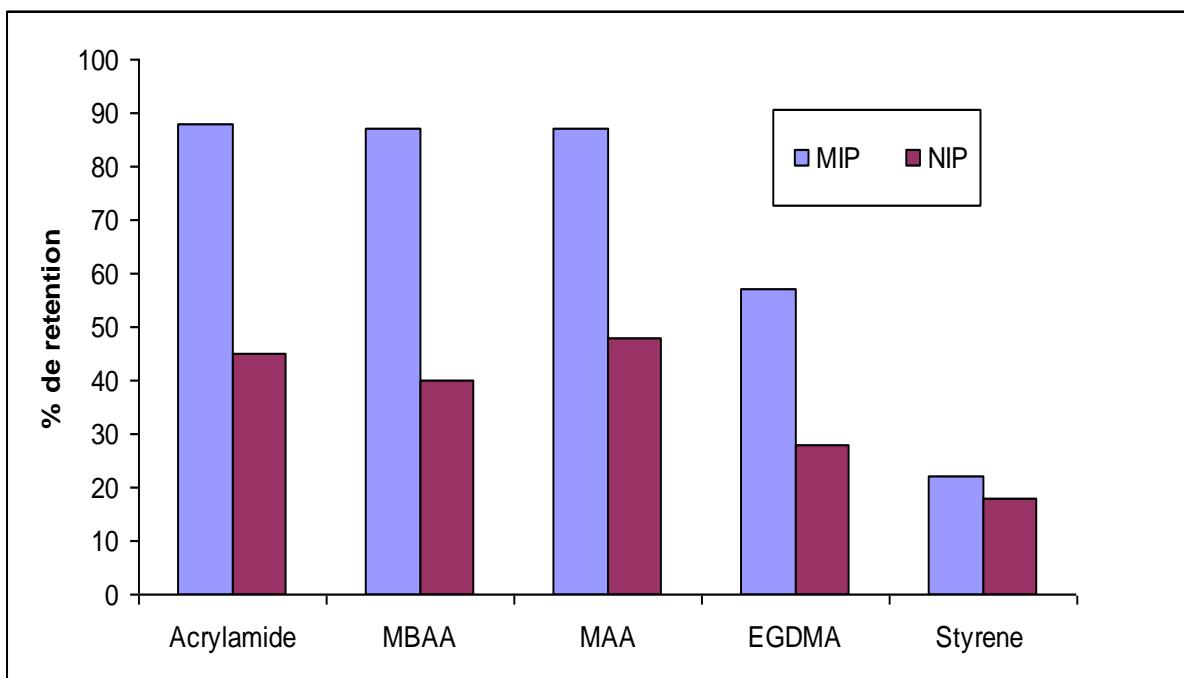


Figure III. 11 : Rendement d'extraction du fenthion après percolation sur les polymères (MIP et NIP) de 0,5 ml d'une solution à 2mg/L dans l'acétonitrile.

L'ensemble des résultats de récupération des insecticides après extraction sur les MIPs et NIPs correspondants est présenté dans *les figures III.8 - III.11*. Deux points importants

Chapitre III

ressortent de ces figures. Tout d'abord la synthèse des MIPs n'améliore pas automatiquement la fixation des insecticides lorsque la rétention sur le NIP est déjà faible. En effet, les rendements d'extraction sur les polymères non imprimés ou imprimés avec des insecticides sont généralement de même ordre de grandeur parce que des monomères engagés dans des sites non spécifiques peuvent former des liaisons de fortes affinités avec des molécules contaminantes. Avec cette expérience il est possible de confirmer que l'impression a été réellement faite dans les polymères synthétisés avec les monomères fonctionnels sélectionnés; la forte rétention des insecticides par les MIPs s'explique alors par l'accessibilité d'une grande quantité d'analyte dans les cavités spécifiques. Toutefois, lorsque l'interaction entre une molécule cible et un monomère est faible, les éventuelles cavités formées dans le MIP n'ont pas une affinité plus grande pour la molécule cible que les sites non spécifiques. Il arrive même parfois que le NIP retienne mieux la molécule cible que le MIP. Une explication à cela serait une surface d'interaction plus importante sur le polymère non imprimé.

L'autre point que l'on peut observer c'est que même si on utilise un petit volume d'acétonitrile comme solvant de dépôt, la rétention n'est pas complète à 100% ce qui montre que ces pesticides sont très solubles dans ce solvant. L'utilisation de ce solvant est justifiée par le fait que sa polarité permet de réduire les interactions non spécifiques sans aboutir à une étape de lavage qui peut prendre du temps pour son optimisation. Toutefois, tous ces résultats sont tirés d'expériences de SPE. Il est possible qu'ils soient quelques peu différents, quant à la différence MIP-NIP notamment, avec d'autres types d'expériences, comme celles se rapprochant des tests immunologiques, quand l'équilibre de formation du complexe insecticide-monomère polymérisé est atteint.

Dans les cas où l'interaction monomère-insecticide est suffisamment forte, la préparation d'un polymère imprimé permet d'améliorer à la fois la rétention sur le matériau polymérique ainsi

Chapitre III

que la sélectivité qui peut déjà exister naturellement avec le polymère imprimé. Nous avons vu que le MBAA et l'IA pour le méthidathion, l'EGMP, l'IA et le TFMAA pour le diméthoate, l'acrylamide et le MBAA pour le malathion, et enfin l'acrylamide, le MBAA et le MAA pour le fenthion, correspondent à des monomères sélectionnés par la modélisation moléculaire comme les meilleurs monomères. Leurs MIPs donnent des fortes rétentions pour les molécules cibles ainsi qu'une grande différence dans la capacité de rétention entre les MIPs et les NIPs correspondants.

On s'aperçoit que l'interaction entre un monomère et une molécule est étroitement liée à la rétention de cette molécule sur son polymère. En effet la fixation d'une molécule sur un polymère est due principalement à l'interaction de la molécule avec le monomère fonctionnalisé, et de façon quasi négligeable avec le monomère réticulant. Mais il est impossible de quantifier par une simple extraction la force de l'interaction pour plusieurs raisons. D'une part un monomère polymérisé ne se trouve pas nécessairement dans les conditions de stabilité optimale du complexe monomère-molécule cible, du fait de l'emprisonnement du monomère dans la matrice polymérique. D'autre part, l'état d'équilibre **MIP + analyte** \longleftrightarrow **MIP-analyte** n'est pas atteint pour tous les sites d'interaction, à cause d'une introduction partielle de l'analyte dans les particules. Enfin les réactivités des monomères fonctionnalisés étudiés étant différentes, les pourcentages des monomères liés au réseau polymérique varie pour tous les polymères et donc la quantité de sites d'interaction n'est pas la même dans tous les polymères. Toutefois les rendements d'extraction des insecticides sur les polymères semblent d'être une bonne appréciation de l'interaction relative des monomères pour les insecticides. Les quelques résultats préliminaire obtenus avec des polymères imprimés pour les insecticides ne donnant pas de bonnes fixations sur les NIPs montrent que l'interaction entre la molécule cible et le ou les monomères doit être suffisamment forte naturellement pour permettre une amélioration de fixation par un MIP.

Chapitre III

Pour des estimations plus précises, des techniques ont déjà été utilisées afin de montrer la formation des interactions non covalentes entre un monomère et une molécule cible. La RMN par exemple a permis de mettre en évidence qu'en solution, des molécules cibles peuvent complexer avec les monomères fonctionnels [217]. La détermination précise de la constante de dissociation du complexe monomère–molécule cible dans différents solvants ainsi que la composition exacte du complexe ont pu être calculées en étudiant les déplacements chimiques de certains protons spécifiques [218,219]. Dans des études réalisées par Breton *et al.*, [220], il a été montré que la complexation entre les molécules cibles et les monomères fonctionnels est très dépendante du solvant de polymérisation. Cependant, de la mise en contact du monomère et de la molécule cible jusqu'à la solidification du MIP, la complexation monomère-molécule cible a été observée, prouvant la formation de cavités dans le polymère même quand ce dernier se trouve sous forme d'un gel partiellement soluble. Cette expérience peut être très pratique pour confirmer l'idée de la prévision d'un MIP par un NIP. Pour une molécule cible donnée, l'étude des spectres RMN des protons mis en interaction prouvera la formation d'un complexe monomère–molécule cible en solution, et indiquera si ce complexe reste stable jusqu'à la précipitation du MIP. Une expérience similaire peut être effectuée avec l'infrarouge comme méthode de détection. Cette dernière technique s'applique à toutes les liaisons : il sera alors possible de déterminer précisément les atomes intervenant dans la complexation et d'évaluer la capacité de ce complexe à créer des cavités complémentaires dans la forme et la distribution des sites.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré la possibilité d'utiliser la simulation par ordinateur (modélisation moléculaire) pour prévoir les monomères susceptibles de former des

Chapitre III

polymères à empreintes moléculaires efficaces. Un des avantages de cette méthode tient au fait qu'elle nécessite un temps relativement court (environ 3-4 heures par insecticide). Les essais d'adsorption des molécules organophosphorées par les polymères non imprimés (blancs) ont prouvé une concordance entre les données modélisées et expérimentales. Nous croyons donc que la simulation par ordinateur basée sur une bibliothèque virtuelle de monomères fonctionnels, est un outil intéressant pour la sélection des monomères capables de former des polymères à empreintes moléculaires ayant une forte affinité avec la molécule cible, ce qui exclut le besoin de méthodes chères et compliquées pour la sélection.

Les polymères préparés pour vérifier les données informatiques ont fait ressortir quelques monomères ayant une affinité naturellement forte pour tel ou tel insecticide. La liaison monomère-molécule cible doit avoir une certaine stabilité pour que la préparation d'un MIP ait une utilité comparée au NIP. En utilisant l'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre, on pourrait estimer que pour une rétention d'un insecticide sur un polymère non imprimé inférieure à 20% (pour les conditions d'extraction énoncées ultérieurement et avec un NIP préparé dans le DMF), il sera très difficile d'en faire un MIP efficace. Quand la rétention est comprise entre 20 et 50 %, le monomère semble idéal pour la synthèse d'un MIP, mais il sera difficile de rompre les interactions non spécifiques. Ainsi, quand la modélisation moléculaire n'est pas applicable dans un laboratoire, des tests sur des polymères fortement réticulés et non imprimés permettraient de déterminer les monomères les mieux adaptés pour la synthèse de MIPs. Cette méthode combinatoire serait alors beaucoup plus simple et moins onéreuse que celles testées par les équipes de Mastsui et Sellergren [221,222] puisqu'elle ne nécessite pas la présence de la molécule cible dans le milieu de polymérisation, et que leurs polymères imprimés correspondants seront des polymères très efficaces, et pourraient d'ailleurs être utilisés directement pour séparer la molécule cible d'un mélange ou d'un échantillon naturel avec une forte affinité et sélectivité.

CHAPITRE IV

SYNTHESE ET CARACTERISATION DES POLYMERES A EMPREINTES MOLECULAIRES

I. Introduction

Les polymères à empreintes moléculaires sont des solides amorphes. Afin de mettre en évidence la formation d'empreintes, les MIPs et NIPs synthétisés sont caractérisés grâce à leurs isothermes d'adsorption qui mettent en évidence la formation d'empreintes au sein du MIP. Le tracé d'isothermes d'adsorption implique de mesurer la quantité de soluté capturée par une masse donnée de polymère. Le soluté choisi est la molécule empreinte ou une molécule de structure très voisine. Le polymère est introduit dans un flacon fermé contenant une solution de concentration connue en soluté. Une agitation de quelques heures à température ambiante est suffisante pour atteindre l'état d'équilibre du système ; une partie du soluté est alors adsorbée par le polymère. Des informations telles que la surface spécifique et la porosité ou encore la forme et la taille des particules peuvent être obtenues grâce aux isothermes d'adsorption d'azote avec une analyse BET (Brunauer, Emmett et Teller) ou par microscopie électronique à balayage (MEB). Ces données présentent un intérêt pour la comparaison des MIPs et leurs correspondants NIPs ou bien entre plusieurs MIPs.

Le but de ce chapitre est de caractériser les polymères à empreintes moléculaires et leurs correspondants NIPs synthétisés, en évaluant l'hétérogénéité, la capacité et l'affinité d'adsorption à l'aide des résultats expérimentaux d'adsorption. Pour ceci, on choisit de suivre l'adsorption des insecticides organophosphorés par ces polymères, puisque ces molécules et leurs métabolites constituent les composés recherchés, par la suite, dans l'huile d'olive. La surface et la porosité est étudiée en utilisant le microscope électronique à balayage (MEB).

II. Partie expérimentale

II.1. Synthèse

Chapitre IV

Les polymères ont été synthétisés de façon non covalente en suivant le protocole décrit dans le chapitre précédent et en considérant les compositions du tableau (ANNEXE IV). Le choix des monomères fonctionnalisés a été décidé aux vues des bons résultats de modélisation décrits dans le chapitre précédent. Chaque monomère fonctionnel a été polymérisé en présence de sa molécule empreinte, le N, N-Methylene Bis Acrylamide, (MBAA) avec le méthidathion et le malathion, l'acide itaconique (IA) avec le diméthoate et l'acrylamide avec le fenthion. Les MIPs sont préparés en utilisant un rapport molaire molécule cible/monomère fonctionnel/monomère réticulant de 1/4/20.

Au sein du polymère, l'empreinte se forme autour des molécules organophosphorées à partir de liaisons non covalentes telles que les liaisons hydrogène existant entre les monomères fonctionnels et les groupes polaires des molécules empreintes (amine tertiaire, éther-oxyde, atome de soufre). Les parties non fonctionnalisées des molécules empreintes interagissent avec le monomère fonctionnel et le co-polymère EGDMA- monomère réticulant par des liaisons de Van der Waals et des liaisons $\pi-\pi$, ces dernières étant particulièrement intenses au niveau des noyaux aromatiques (*Figure IV.1*).

Les MIP et NIP obtenus sont caractérisés grâce à leurs isothermes d'adsorption qui mettent en évidence la formation d'empreintes au sein du MIP. Les caractéristiques morphologiques du polymère sont également étudiées.

Chapitre IV

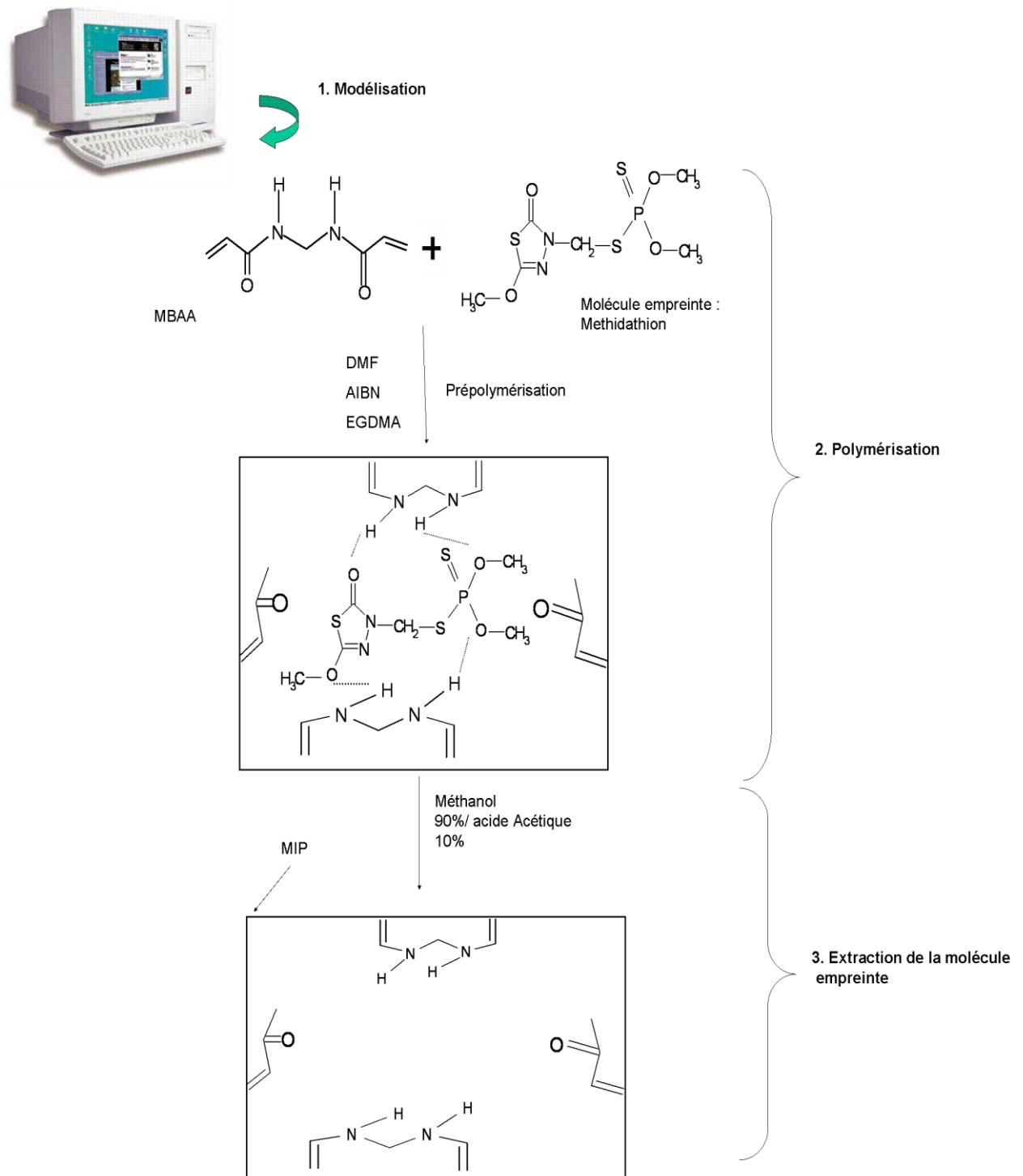


Figure IV. 1: Schéma de synthèse du MIP MBAA -Méthidathion

Chapitre IV

II.2. Conditions expérimentales

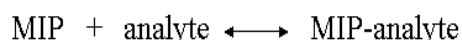
Des vials ambrés (volume 2 mL) sont remplis d'une masse connue de polymère (MIP ou NIP). Un volume (1 mL) d'acétonitrile contenant un insecticide organophosphoré est introduit dans chaque vial. Les vials sont agités pendant le temps d'équilibre de chaque molécule, à température ambiante. Lorsque l'équilibre est atteint, le contenu de chaque vial est centrifugé. Le surnageant est évaporé à sec à l'aide d'un rotavapor. Le résidu sec est dissous dans 1 mL de phase mobile puis analysé par chromatographie en phase liquide HPLC-UV. On obtient ainsi la concentration en soluté non adsorbé, notée F. Les conditions chromatographiques d'analyse des insecticides sont décrites dans l'annexe V.

Dans 1 mL de solution, T représente la quantité initiale de l'insecticide, et F celle de l'insecticide non adsorbée à l'équilibre. La quantité B de l'insecticide adsorbée, est calculée à partir de l'équation (1) .

$$\mathbf{B = T - F} \quad (\text{Eq 12})$$

II. 3. Isothermes d'adsorption

L'interaction entre la molécule cible (l'analyte) et le polymère peut se définir par :



Cette affinité s'effectue à la fois sur des sites d'interactions spécifique et non spécifiques.

Pour avoir plus d'informations sur les caractéristiques physiques des polymères, il est intéressant de pouvoir déterminer le nombre de sites d'interaction ainsi que leur affinité.

On définit la constante de dissociation K_d du système à l'équilibre

$$K_d = \frac{[\text{MIP}] * [\text{analyte}]}{[\text{MIP} - \text{analyte}]} \quad (\text{Eq13})$$

Chapitre IV

En considérant B la quantité de MIP lié à l'équilibre, donc $B = [\text{MIP-analyte}]$, B_{libre} la quantité de MIP non lié à l'équilibre, donc $B_{\text{libre}} = [\text{MIP}]$, et F la quantité d'analyte non fixée à l'équilibre, soit $F = [\text{analyte}]$, on détermine le nombre total de sites d'interaction (B_{max}) dans un MIP comme étant :

$$B_{\text{max}} = B + B_{\text{libre}}$$

Soit

$$B_{\text{libre}} = B_{\text{max}} - B$$

$$K_d = \frac{(B_{\text{max}} - B) * F}{B} \quad (\text{Eq 14})$$

En ajoutant F de part et d'autre de l'équation, on obtient :

$$K_d + F = \frac{(B_{\text{max}} - B) * F}{B} + \frac{F * B}{B} = \frac{B_{\text{max}} * F}{B}$$

D'où

$$B = \frac{B_{\text{max}} * F}{K_d + F} \quad (\text{Eq 15})$$

Dans la pratique la quantité B de la molécule cible fixée sur son MIP est évaluée en fonction de la quantité F non liée au polymère, pour une quantité de polymère constante. 5mg de polymères (MIPs ou NIPs) sont pesés dans un eppendorf et incubés dans les vials (2mL) contenant 1 mL de la molécule cible dans de l'acétonitrile à des concentrations variables (comprises entre 10^{-2} et 6 mM) pendant 2h. Après une centrifugation de 15 min suivie d'une filtration, 500 μL de la solution sont prélevés, évaporés à sec puis repris dans 1 mL de phase mobile avant analyse par HPLC-UV.

II. 4. Microscope Electronique à Balayage (MEB)

Le principe du MEB consiste en un faisceau d'électrons primaires balayant la surface d'un échantillon à analyser générant une interaction avec la matière constituant l'échantillon accompagné par différentes émissions (e- primaires rétrodiffusés, e- secondaires, photons X

Chapitre IV

caractéristiques de l'échantillon). Différents détecteurs analysent ces émissions afin de reproduire une image en trois dimensions. Cette technique est basée sur le principe des interactions électron-matière permettant de produire des images en haute résolution de la surface d'un matériau. Les échantillons à étudier sont préalablement métallisés sous un flux d'argon et d'argent afin de ne pas avoir de charges en surface. Le matériel utilisé est de la marque ELEXIENCE et le traitement des images obtenues au MEB a été réalisé à l'aide du logiciel Image Bruker. Nos échantillons ont été observés par MEB à l'aide d'un microscope S-4500 au service commun de microscopie électronique au Laboratoire PROMES-CNRS de l'université de Perpignan.

III). Résultats et discussion

III. 1. Cinétique d'adsorption

De la mise en contact d'une suspension du polymère (MIP ou NIP) avec les insecticides organophosphorés, résulte une interaction. A mesure que le temps s'écoule, la quantité adsorbée augmente. Les cinétiques d'adsorption des quatre insecticides organophosphorés ont été réalisées au pH initial de la solution pour une concentration initiale de 10 µg/mL, avec des masses des polymères de 6mg/mL. Chaque molécule a été utilisée avec des polymères formés à partir des monomères fonctionnels sélectionnés par la modélisation (*Figure IV.2*).

Chapitre IV

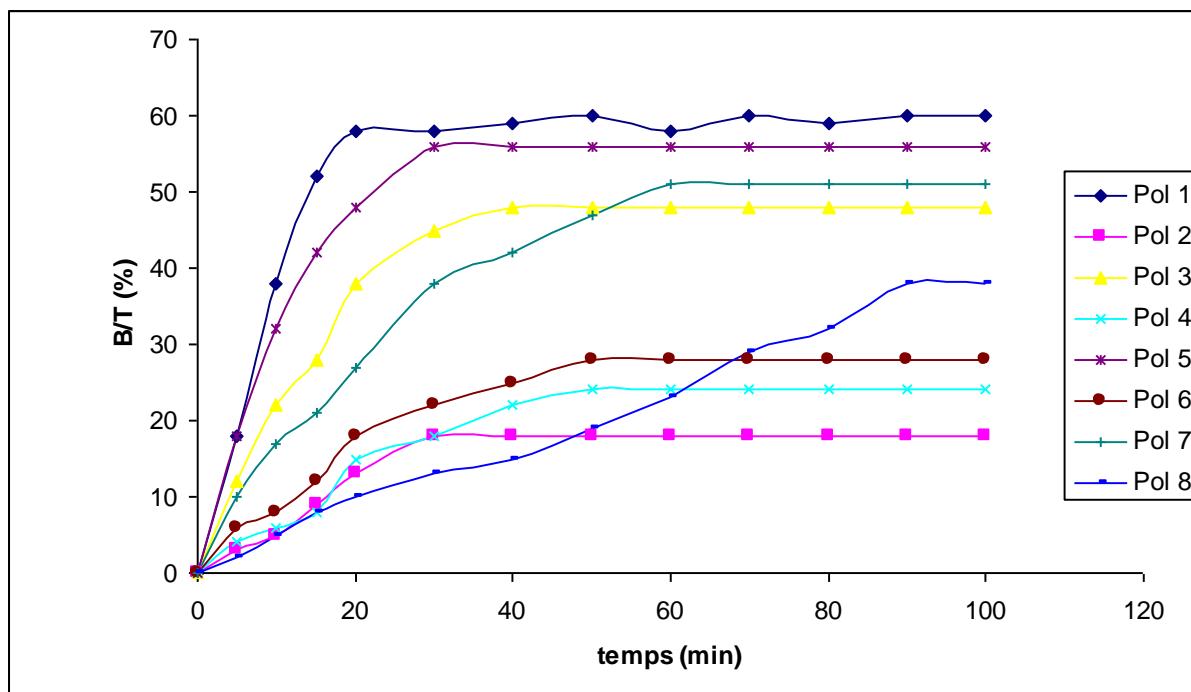


Figure IV. 2 : Cinétiques d'adsorption des insecticides organophosphorées sur les polymères MIPs et NIPs.

Les résultats de la *figure IV.2*, montre que la vitesse d'adsorption est rapide en début du processus et devient de plus en plus lente au cours du temps d'agitation avant d'atteindre l'équilibre. On peut noter également que la vitesse d'adsorption des insecticides organophosphorées sur les MIPs est plus rapide que sur les NIPs. Les temps d'équilibre d'adsorption de ces quatre insecticides sur les polymères (MIP et NIP) sont regroupés dans le tableau IV.I. Le temps nécessaire à l'établissement de l'équilibre pour le fenthion est le plus long par rapport aux autres molécules. Ceci peut être du à sa faible polarité qui peut le rendre moins soluble dans l'acétonitrile et induire une diffusion plus lente vers la surface de polymère. D'autre part, on remarque que les capacités d'adsorption de ces insecticides sur les MIPs sont plus grandes par rapport à celles sur les NIPs. Cette différence est due à la nature des interactions de chaque insecticide avec les MIPs et les NIPs, ce qui montre la présence des interactions spécifiques entre les MIPs et leurs molécules empreintes.

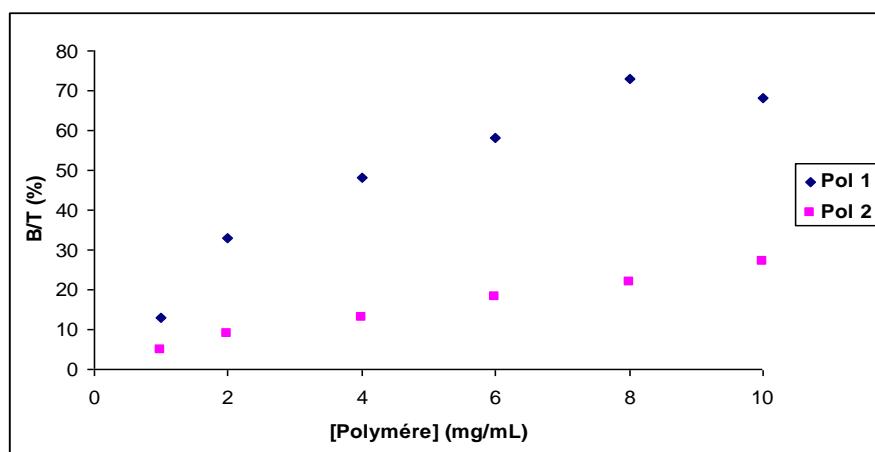
Chapitre IV

Tableau IV. 1: Temps d'équilibre d'adsorption des insecticides organophosphorés par les polymères MIP et NIP

Molécules cibles	MIPs	Temps d'équilibre (min)	NIPs	Temps d'équilibre (min)
Méthidathion	Pol 1	20	Pol 2	30
Diméthoate	Pol 3	40	Pol 4	50
Malathion	Pol 5	30	Pol 6	50
Fenthion	Pol 7	60	Pol 8	90

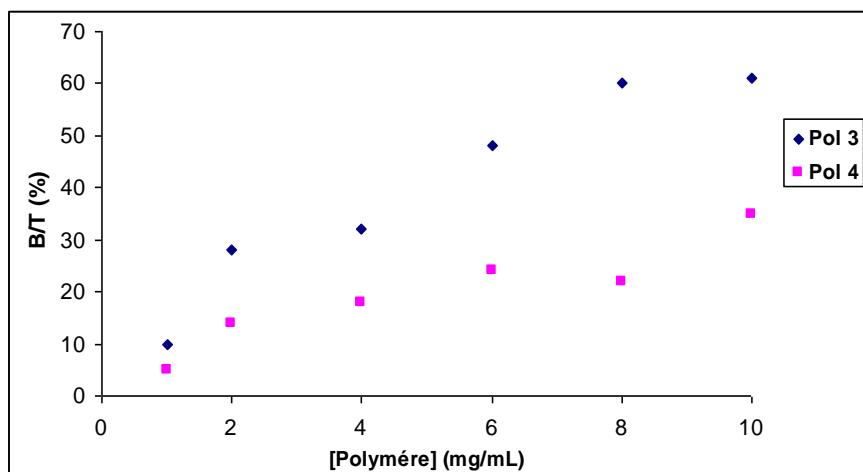
III. 2. Isothermes d'adsorption (concentration en insecticides constante et masse de polymère variable)

Pour mieux mettre en évidence l'efficacité des polymères synthétisés pour l'adsorption des insecticides organophosphorées, nous avons reporté sur la *figure IV.3*, l'évolution des pourcentages d'élimination des insecticides de la solution en fonction des masses des polymères MIP et NIP. La concentration initiale (notée T) des insecticides organophosphorés est fixée à 10µg/mL et les masses de MIP (ou NIP) introduites dans chaque vial sont égales respectivement à 1,2, 4, 6, 8, 10 mg. Les résultats sont représentés par un ensemble de points expérimentaux dont l'ordonnée correspond à la fraction des insecticides adsorbés par le polymère (B/T (%)), et l'abscisse à la concentration massique (mg/mL) de polymère en suspension dans la solution (*Figure IV.3*).

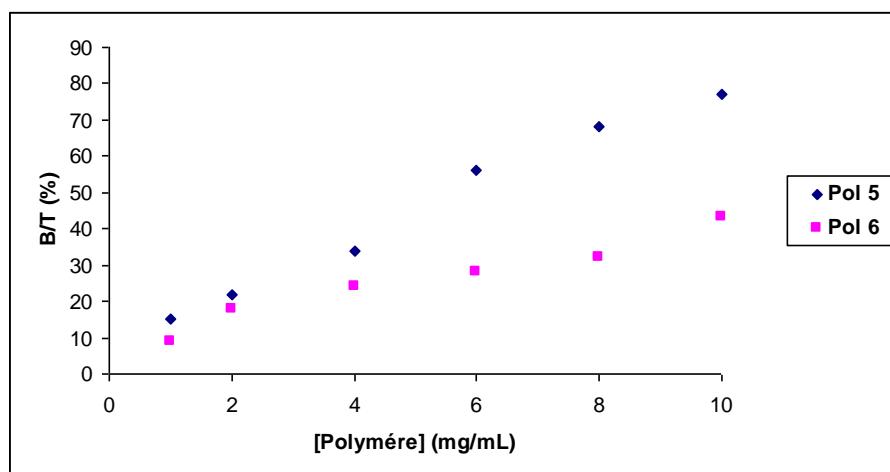


Chapitre IV

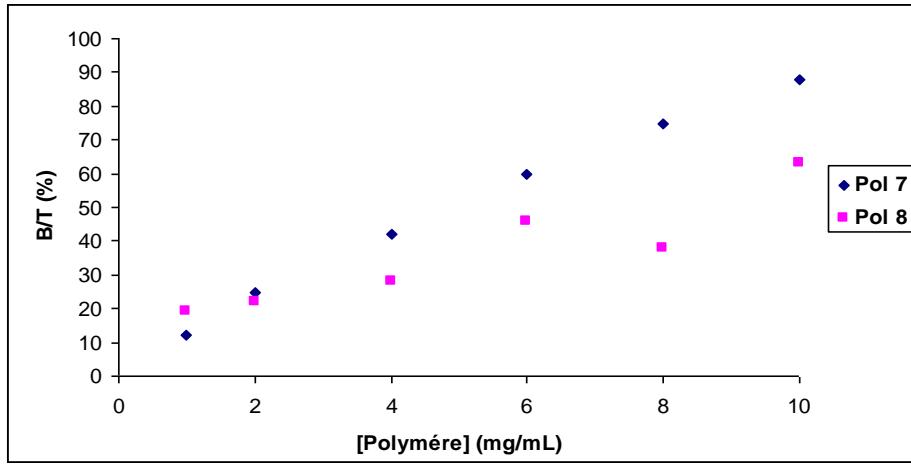
a : adsorption du méthidathion



b : adsorption du diméthoate



c : adsorption du malathion



d : adsorption du fenthion

Figure IV. 3: Profils d'adsorption des insecticides organophosphorées sur les polymères MIP et NIP. Concentration en molécule cible : 10 μ g/mL dans ACN ; température ambiante ; volume solution : 1 mL.

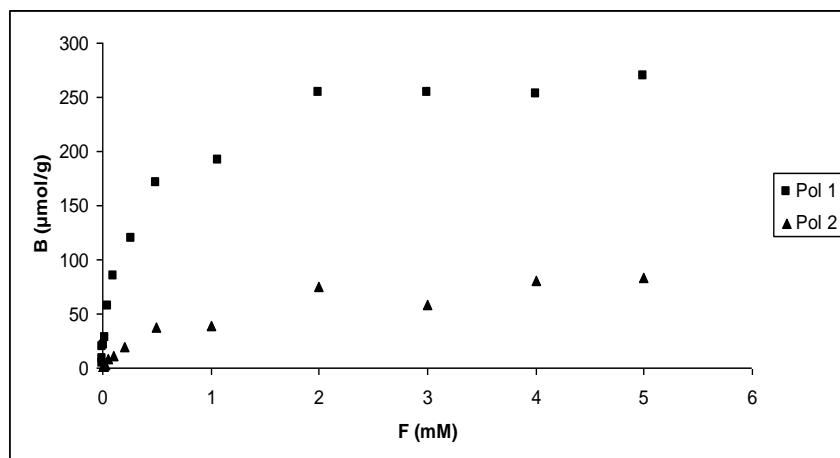
Chapitre IV

Nous constatons que les pourcentages d'élimination des insecticides dans les solutions augmentent en fonction de l'élévation de la masse de l'adsorbant. Lorsque la masse de polymère introduite dans 1 mL de la solution est inférieure à 4 mg, on constate que l'adsorption des insecticides organophosphorés est presque similaire sur les MIPs et les NIPs sauf pour le méthidathion où on note une grande différence d'adsorption entre les deux polymères même avec 4 mg de polymère. Lorsque la masse du polymère est supérieure à 4mg la quantité adsorbée par les MIPs est plus importante que celle adsorbé par les NIPs. Le MIP retient entre deux à trois fois plus les insecticides organophosphorés que le NIP. Cette différence résulte d'une meilleure accessibilité aux sites d'adsorption par des interactions spécifiques et non spécifiques. A l'opposé, la rétention des insecticides sur le NIP n'est due qu'à des interactions non spécifiques. De même, les différences existant entre les quantités adsorbées de quatre insecticides sont dues à la nature des interactions de chaque MIP avec sa molécule empreinte.

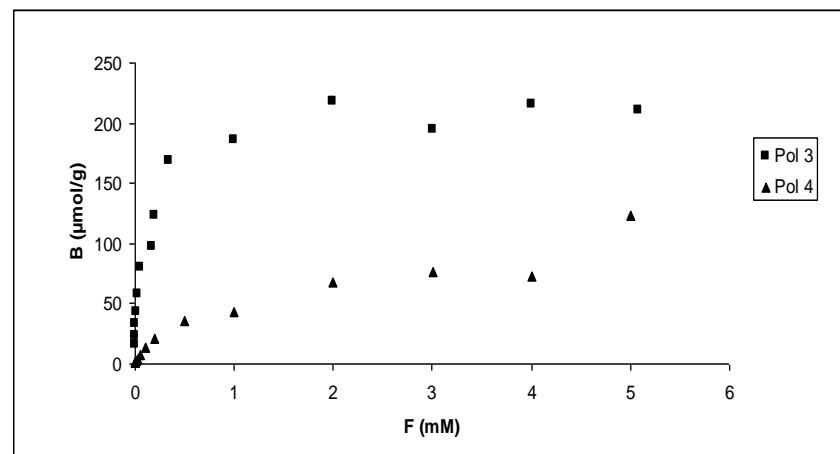
III. 3. Isothermes d'adsorption (concentration en insecticides variable et masse de polymère constante)

Comme l'impression sur les différents MIPs n'est pas clairement identifiable, des tests d'adsorption à l'équilibre sont réalisés. Ces isothermes décrivent la relation à l'équilibre entre les concentrations des composés libres et fixés sur le polymère. Les représentations graphiques des quantités retenues B (en $\mu\text{mol}/\text{g}$ de polymère) en fonction des quantités libres F (en mM de solution) sont présentés dans *la figure IV.4.*

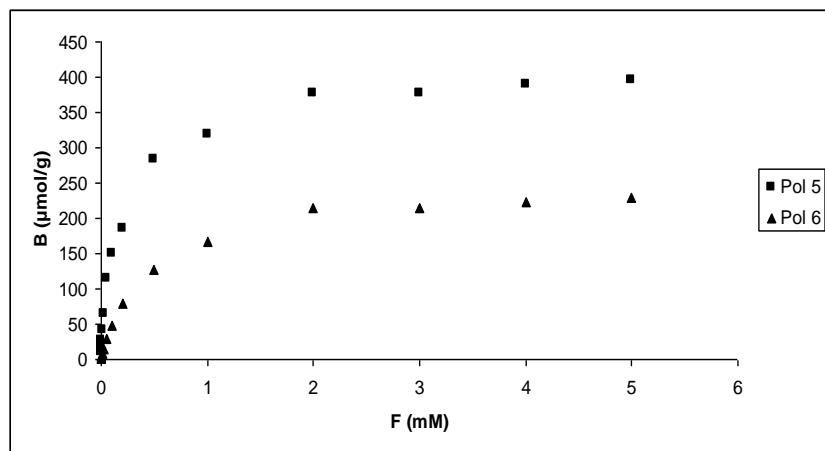
Chapitre IV



a : adsorption du méthidathion

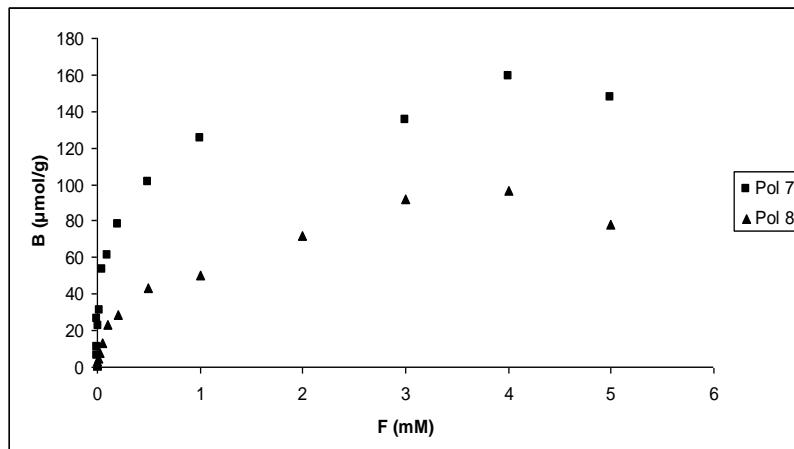


b : adsorption du diméthoate



c : adsorption du malathion

Chapitre IV



d : adsorption du fenthion

Figure IV. 4 : Isothermes d'affinité à l'équilibre des polymères incubés dans des solutions d'acétonitrile en présence de leurs insecticides respectifs.

Pour tous les polymères testés, les courbes représentant les quantités retenues B en fonction des quantités libres $B = f(F)$ (*Figure IV.4*), montrent que les quantités retenues sont minimes pour les concentrations faibles des insecticides en solution. Au fur et à mesure que la concentration en solution augmente, les quantités retenues augmentent rapidement. Les courbes représentant les MIPs sont toujours situées au-dessus de celles du NIPs. Cette différence s'explique par un nombre apparent de sites d'adsorption du MIP supérieur à celui du NIP et donc une capacité plus élevée du MIP par rapport au NIP dans la gamme des concentrations sélectionnées. En outre, cette différence est moins significative entre le MIP et le NIP dans le cas du fenthion par rapport aux cas des autres molécules organophosphorées. Ceci peut provenir de la réactivité plus forte avec des interactions non spécifiques de la molécule fenthion avec son monomère sélectionné

l'acrylamide

Comme nous l'avons vu précédemment, $B = \frac{B_{\max} * F}{K_d + F}$. Les graphes $B = f(F)$ donnent lieu à

des courbes hyperboliques difficilement exploitables pour définir les paramètres K_d et B_{\max} .

Une alternative simple consiste à utiliser les représentations de Scatchard. Ces dernières sont

définies par : $\frac{B}{F} = f(B)$

Chapitre IV

Ainsi

$$B * K_d + B * F = B_{\max} * F$$

$$B * K_d = B_{\max} * F - B * F$$

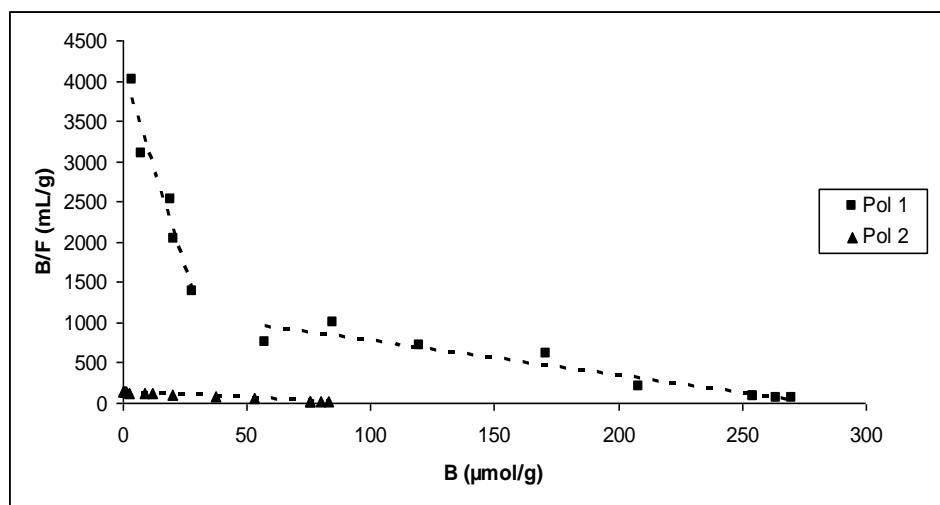
D'où

$$\frac{B}{F} = \frac{B_{\max} - B}{K_d} = \left(\frac{-1}{K_d} \right) * B + \left(\frac{B_{\max}}{K_d} \right) \quad (\text{Eq 16})$$

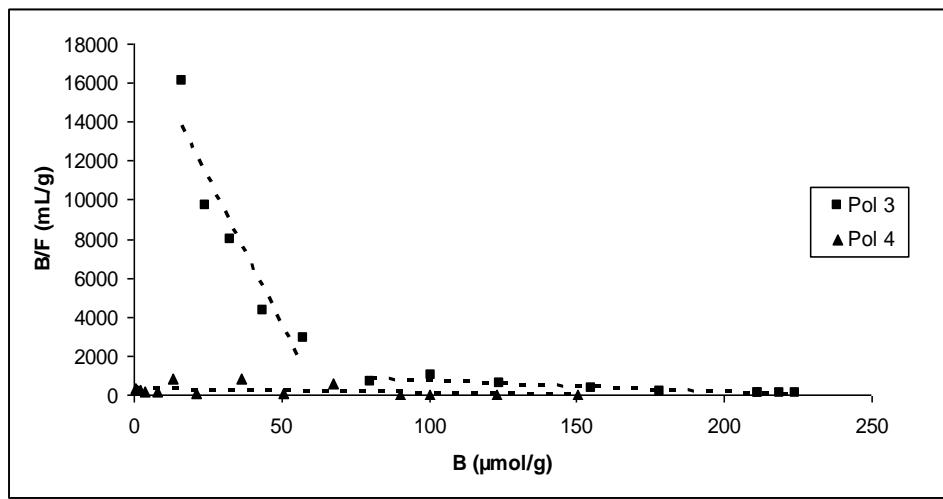
La représentation des isothermes selon Scatchard permet donc de déterminer K_d et B_{\max}

aisément puisque les courbes sont des droites de pente $\left(\frac{-1}{K_d} \right)$ et d'ordonnée à l'origine

$$\left(\frac{B_{\max}}{K_d} \right) \quad (\text{Figure IV.5})$$

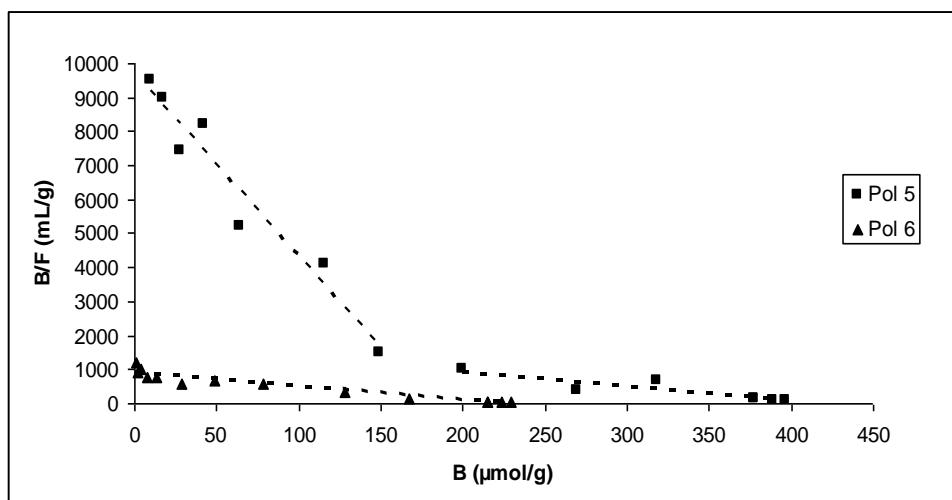


a : cas du méthidathion

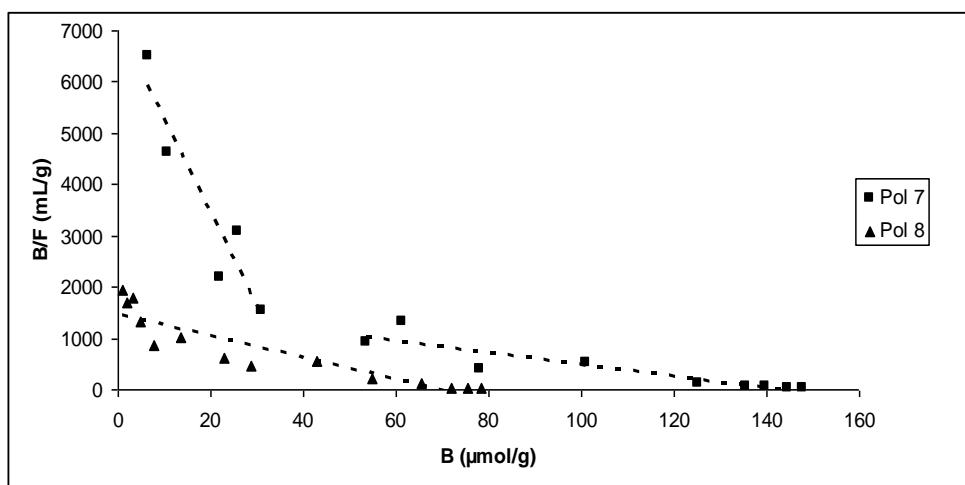


b : cas du diméthoate

Chapitre IV



c : cas du malathion



d : cas du fenthion

Figure IV. 5 : Représentation selon Scatchard de l'adsorption des insecticides organophosphorés sur les polymères.

D'après les résultats de la *figure IV.5*, on peut remarquer pour tous les polymères MIP (Pol 1, Pol 3, Pol 5 et Pol 7), que les courbes ne sont pas caractérisées par une seule droite mais par deux. En effet, avec les matériaux hétérogènes tels les MIPs, les isothermes d'adsorption sont schématisées par deux droites sécantes dont la pente détermine l'affinité des sites. La premier très pentue, indique la présence de cavités de forte affinité, et la seconde fait référence aux sites non spécifiques se trouvant dans le polymère. Dans le cas des NIPs, seuls les sites de faible interaction peuvent être observés.

Chapitre IV

Les isothermes d'adsorption peuvent fournir d'autres informations sur les polymères.

Dans le cas des MIPs, ils peuvent parfaitement être évalués selon le modèle de type Langumir-Freundlich [223]. Les isothermes Langumir-Freundlich décrivent la relation entre les concentrations de molécules libres (F) et liées (B) à l'équilibre dans un système hétérogène par l'équation suivant :

$$B = \frac{N_t a F^m}{1 + a F^m} \quad (\text{Eq 17})$$

Où N_t est le nombre total de sites de fixation, a est en relation avec l'affinité de fixation

moyenne K_0 par l'équation $K_0 = a^{\frac{1}{m}}$, et enfin m est l'index d'hétérogénéité.

Pour les solides hétérogènes, la théorie de Scatchard quant à elle se résume à l'équation : $B = \sum \left(\frac{B_{\max,i} * F}{K_{d,i} + F} \right)$ où $B_{\max,i}$ est la quantité de fixation maximale de sites de liaison de type i , et $K_{d,i}$ la constante de dissociation des sites de type i . Pour les MIPs contenant deux sortes de sites de fixation, l'équation se limite à :

$$B = \frac{B_{\max,high} + F}{K_{d,high} + F} + \frac{B_{\max,low} + F}{K_{d,low} + F} \text{ en considérant les sites de haute et faible affinité.}$$

Chapitre IV

Tableau IV. 2 : Paramètres des isothermes d'adsorption représentés par le modèle Langmuir-Freundlich (A) et Scatchard (B).

(A)

Polymère	Pol 1	Pol 2	Pol 3	Pol 4	Pol 5	Pol 6	Pol 7	Pol 8
N_t ($\mu\text{mol/g}$)	311	97	288	106	453	260	178	99
a (mM^{-1})	2,02	1,22	1,63	0,92	2,35	1,8	1,95	1,242
m	0,73	0,97	0,48	0,82	0,68	0,79	0,57	0,69
K_0 (mM^{-1})	2,619	1,227	2,767	0,903	3,513	1,935	3,227	1,369
R^2	0,97	0,99	0,98	0,96	0,97	0,98	0,97	0,95

Les paramètres sont déterminés à l'aide du logiciel DeltaGraph 5.0.

(B)

Polymère	Pol 1	Pol 3	Pol 5	Pol 7
$B_{\max,\text{high}}$ ($\mu\text{mol/g}$)	42,478	62,170	180,287	38,866
$K_{d,\text{high}}$ (mM)	0,0101	0,0033	0,018	0,0054
$B_{\max,\text{low}}$ ($\mu\text{mol/g}$)	280,352	223,801	413,384	143,042
$K_{d,\text{low}}$ (mM)	0,235	0,167	0,227	0,086

Les facteurs de corrélation du tableau IV.2 A prouvent que les isothermes d'adsorption des MIPs étudiés sont très bien représentées par le modèle de Langumir-Freundlich.

Les valeurs de m obtenues pour les NIPs sont systématiquement supérieures à celles du MIP correspondant, ce qui est en accord avec des résultats publiés portant sur la comparaison de polymères imprimés [224]. On en déduit que le MIP est plus hétérogène que le NIP, ce qui est de nouveau en accord avec le processus d'impression moléculaire qui regroupe un ou plusieurs monomères fonctionnalisés dans une même cavité donc une

Chapitre IV

répartition importante des sites sur la surface du MIP. Ceci conforte l'idée que l'impression a été vraiment réalisée, et que les molécules cibles se sont accrochées spécifiquement sur leurs polymères MIPs. Cependant, la valeur de m obtenue pour chaque NIP est suffisamment éloignée de l'unité pour ne pas négliger l'hétérogénéité des sites d'adsorption présents dans ce polymère. Au sein de cette diversité, on peut supposer que certains sites d'adsorption du NIP ont une affinité vis-à-vis de la molécule cible équivalente à celle de sites retrouvés dans le MIP. En effet, entre Pol 2 et Pol 6 qui sont exactement les mêmes polymères, l'index m est presque ≈ 1 en contact avec le méthidathion, indiquant un polymère totalement homogène, et uniquement 0,79 en présence de malathion. Cela signifierait que tous les sites de fixation de polymère non imprimé à base de MBAA, se lient de la même façon avec le méthidathion, mais n'ont pas tous le même comportement face au malathion.

Le tableau IV.2 B regroupe les valeurs de B_{max} et de K_d pour les sites de haute et de faible affinité. Les résultats obtenus concernant les valeurs de B_{max} montrent que le taux de conservation des cavités après les étapes de polymérisation, broyage, et lavage au soxhlet est : 18%, 28%, 44% et 28% pour les Pol 1, Pol 3, Pol 5 et Pol 7 respectivement. Pour s'en rendre compte, il suffit de déterminer les rapports entre les B_{max} pour les sites de forte affinité et ceux de faible affinité.

III. 4. Analyse morphologique

La diffusion des molécules vers les empreintes est liée à la porosité du polymère. L'accès aux empreintes est favorisé lorsque ces dernières se situent dans les macro- ou mésopores. Les tailles des macro- et mésopores sont généralement déterminées par intrusion de mercure dans le matériau poreux. Des observations par microscopie ont été pratiquées afin d'obtenir des informations sur la morphologie et l'état de surface des grains. L'étude de la

Chapitre IV

surface des polymères MIP et NIP par microscopie électronique à balayage (MEB) a permis d'apprécier les différences de morphologie du matériau (*Figure IV.6*)

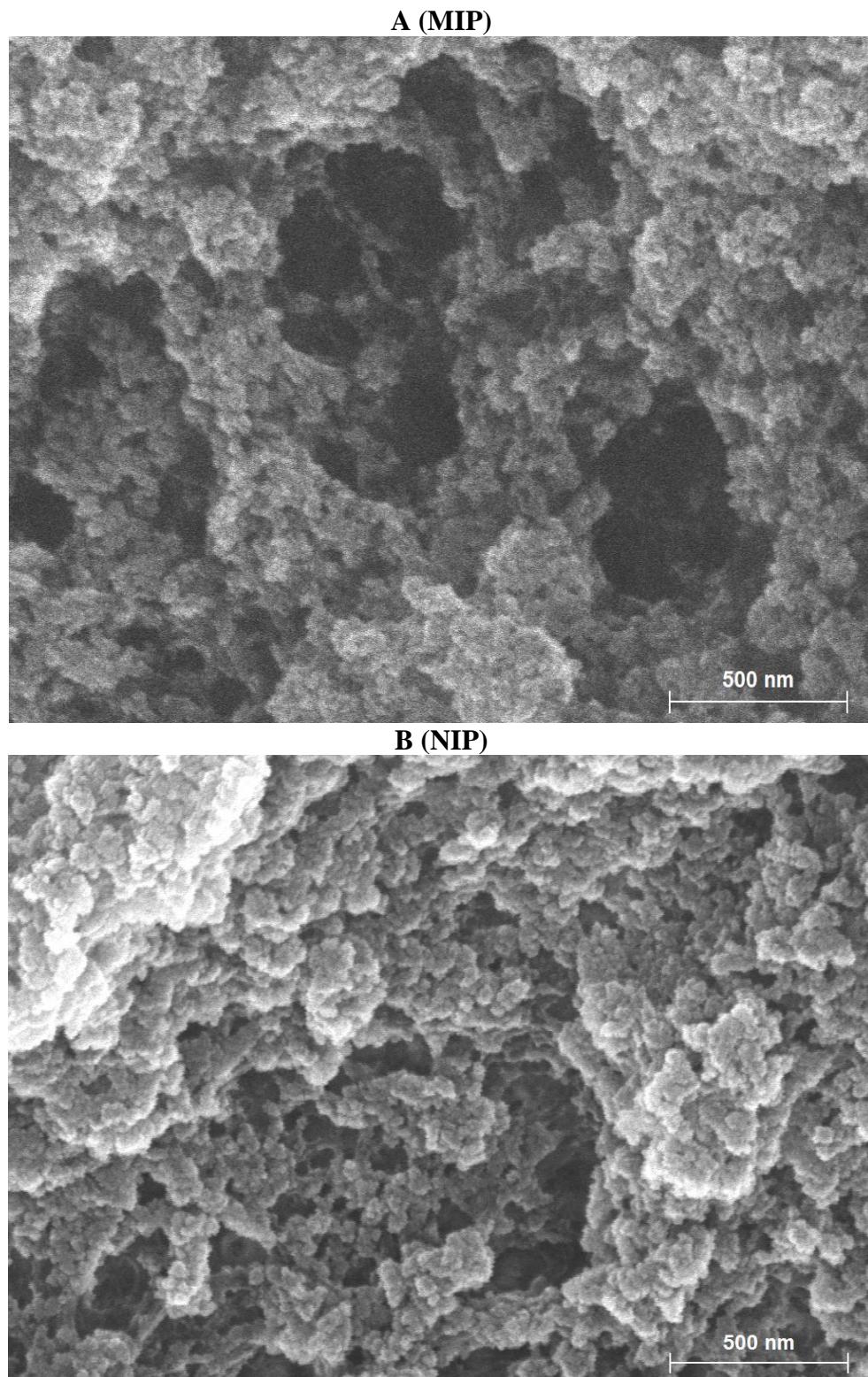


Figure IV. 6 : Clichés MEB de MIP et NIP après broyage (clichés réalisés par Monsieur GORAND Dimitri, service de microscopie électronique de laboratoire PROMES-CNRS Université de Perpignan).

Chapitre IV

Après l'analyse des structures des deux particules des polymères (MIP et NIP) par MEB, les résultats obtenus sont illustrés dans *la figure IV.6*. La figure IV.6 A représente l'image du polymère à empreinte moléculaire (MIP) synthétisé avec MBAA comme monomère fonctionnel et le méthidathion comme molécule empreinte ; l'image B est celle du polymère non imprimé (NIP). L'analyse de ces images MEB, montre une différence appréciable dans la morphologie des deux polymères. De plus, on remarque que le MIP a systématiquement une surface spécifique et un volume poreux supérieurs à ceux du NIP. La structure régulière du polymère non imprimé (NIP) est due au fait qu'aucun site d'interaction spécifique n'a été créé au sein de polymère. Les cavités dans le MIP ont été probablement causées par la structure de la molécule empreinte à savoir le méthidathion, présente au cours du processus de polymérisation. Le phénomène peut bien expliquer les résultats expérimentaux précédemment obtenus, qui montrent que le MIP à une plus forte capacité d'adsorption du méthidathion que le NIP.

IV. Conclusion

Les équilibres d'adsorption réalisés pour les polymères MIP et NIP ont montré la différence de capacité d'adsorption du MIP et du NIP vis-à-vis des insecticides organophosphorés utilisés comme molécules empreintes dans l'acétonitrile, et prouvé la formation de sites d'affinité élevée pour ces molécules cibles dans le MIP. Ces sites, encore appelés empreintes, ont des formes différentes et des énergies d'adsorption variables. Cette hétérogénéité des matériaux obtenus par voie non covalente a été montrée par le tracé des isothermes de Langmuir-Freundlich et celui des courbes de distribution d'affinité. Ces mêmes résultats ont prouvé que l'adsorption des insecticides organophosphorés par le NIP, due à des interactions non spécifiques, dépendait de la nature du polymère. Ces remarques ont été

Chapitre IV

approfondies lors de l'analyse de la surface des MIP et NIP par microscopie électronique à balayage (MEB) qui a montré la présence de cavités poreuses et volumineuses dans le MIP.

CHAPITRE V

OPTIMISATION DU PROTOCOLE D'EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE (SPE) EN UTILISANT LES POLYMERES A EMPREINTES MOLECULAIRES COMME PHASE STATIONNAIRE

I. Introduction

L'extraction solide-liquide est devenue une méthode largement utilisée dans de nombreux laboratoires pour concentrer les pesticides et faciliter leur détection. L'utilisation des polymères à empreintes moléculaires comme phase stationnaire représente une nouvelle solution pour la SPE. La rétention sélective sur ces supports imprimés dépend de la complémentarité structurale entre les cavités formées pendant l'étape de polymérisation et les molécules cibles, ainsi que de la nature et de la force des interactions formées entre les molécules empreintes et des résidus de monomères fonctionnels se trouvant au sein de la matrice polymérique. La plupart des MIPs utilisés en SPE ont été préparés avec des monomères polaires dans le but de former des liaisons hydrogène ou des interactions électrostatiques fortes avec les molécules empreintes grâce à leurs groupements polaires. La quantité de ces monomères fonctionnels ainsi que celle des monomères réticulants par rapport à la quantité des molécules empreintes sont des facteurs qui peuvent influencer la nature de ces interactions sur la formation des cavités spécifiques. Après la synthèse des MIPs, l'optimisation d'autres facteurs qui influencent la rétention des molécules empreintes comme la nature des solution à percoler, le volume, la solution de lavage et celle d'élution, fait l'objet principal de ce chapitre. La détermination des capacités des MIPs et leur application aux échantillons aqueux ont été également étudiées.

II. Partie expérimentale

II. 1. Présentation des différents MIPs synthétisés

Au cours de cette étude de nombreux MIPs ont été synthétisés en suivant une procédure de polymérisation par voie radicalaire. Cette approche consiste à introduire les différents réactifs dans un tube à sceller. La solution est dégazée sous flux d'azote pendant dix

Chapitre V

minutes avant de mettre le tube au bain marie à 80°C pendant 12 heures pour réaliser une initiation thermique. Ensuite, le polymère est broyé et tamisé pour avoir des particules dont la taille est comprise entre 45 et 100 µm. Afin, d'éliminer la molécule empreinte, une étape de lavage au Soxhlet est réalisée avec un mélange méthanol/acide acétique (90/10, v/v). Enfin, 50 mg de particules de polymère sec sont conditionnés entre deux frittés dans des cartouches d'extraction. Un polymère de référence, polymère non-imprimé (NIP) est synthétisé en parallèle dans les mêmes conditions sans introduire la molécule empreinte afin de contrôler la sélectivité du support imprimé. (Voir les tableaux ANNEXE VI et VII)

II. 2. SPE en milieu organique

Dans un premier temps, on va chercher à déterminer le ou les solvants favorisant la sélectivité sur les polymères, c'est-à-dire qui permettent à la fois une fixation importante sur les sites d'interactions spécifiques mais aussi des interactions non spécifiques négligeables. Ainsi toutes les cartouches sont d'abord conditionnées avec 1ml du solvant approprié. Ensuite un solvant contenant la molécule cible est percolé à travers les cartouches SPE. Finalement les cartouches sont lavées avec 1 mL de MeOH/ 2 % TFA pour éluer l'insecticide adsorbé puis par 5 mL d'eau distillée pour enlever les résidus d'acide et de méthanol, avant d'être séchées par un flux d'air. Les solutions sont collectées, évaporées à sec, reprises dans 1mL de phase mobile avant analyse en HPLC (ANNEXE V). Le taux de rétention des insecticides organophosphorés sur les polymères est calculé selon l'équation donnée en Annexe VIII.

II. 3. SPE en milieu aqueux

L'étape suivante de ce travail est de tester l'efficacité des MIPs synthétisés en milieux aqueux. Pour ce faire, différents volumes de solutions aqueuses contenant les molécules cibles sont percolés à travers les cartouches. Ces dernières sont ensuite séchées correctement puis

lavées avec des solutions de lavage optimisées, et enfin éluées au méthanol acidifié. Les solutions de lavage et d’élution sont évaporées puis reprises dans 1mL de phase mobile.

III. Résultats et discussion

III. 1. Effet des quantités des réactifs sur la sélectivité des MIPs

III. 1. 1. Effet du ratio molaire : molécule cible/monomère fonctionnel

Après la sélection des monomères fonctionnels de forte affinité à la molécule cible, le ratio molécule cible/monomère fonctionnel utilisé pour la synthèse des MIPs est un paramètre important qui détermine la qualité des empreintes formées sur les MIPs.

L’influence du ratio molaire, molécule cible (T) / monomère fonctionnel (M) sur la sélectivité des MIPs résultants est étudiée. Dans notre étude, on maintient tous les réactifs de mélange de pré polymérisation constants, et on fait varier les concentrations de la molécule cible dans le milieu de polymérisation de façon à obtenir les ratios molaires, molécule cible / monomère fonctionnel, suivants : 1/1,1/2,1/4,1/6, 1/8, 1/10 (ANNEXE VI).

50 mg des polymères synthétisés sont empaquetés dans les cartouches de SPE et 0,5 mL d’acétonitrile contenant 2mg/L de chaque molécule cible, est percolé à travers les cartouches du NIP et du MIP approprié. Les molécules retenues sont ensuite éluées avec 1mL de méthanol acidifié. Les résultats obtenus sont montrés dans *la figure V.1* sous forme de facteur d’impression en fonction des ratios molaires utilisés. Le facteur d’impression est calculé selon l’équation donnée en Annexe VIII

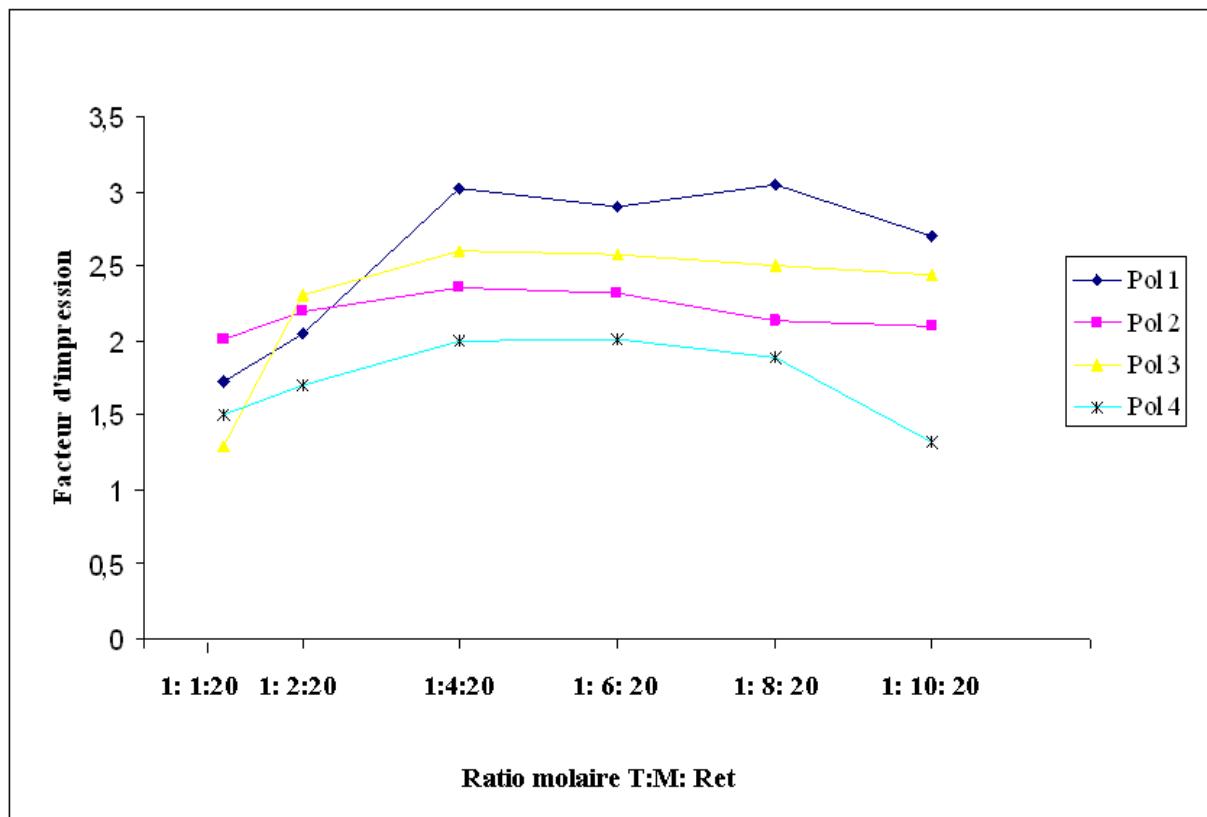


Figure V. 1: Effet de la variation de la concentration de la molécule cible dans le milieu de polymérisation, sur le facteur d'impression des insecticides organophosphorés dans leur MIP. (n=3, RSD < 3%). T = molécule cible, M= monomère fonctionnel, Ret = monomère réticulant

Comme illustré dans *la figure V.1*, les ratios molaires entre les molécules cibles et les monomères fonctionnels ont été évalués par comparaison des facteurs d'impression. D'après les résultats obtenus, la sélectivité des MIPs augmente au fur et à mesure que la concentration en monomère dans le mélange de polymérisation augmente. Pour les ratios molaires (1 :1 et 1 :2) le facteur d'impression est faible, ce qui montre que les capacités de rétention sur le MIP et sur le NIP sont presque similaires. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que la quantité de monomère est faible et que la molécule cible est présente en excès dans le mélange de polymérisation, ce qui favorise les interactions inter-molécules (entre les molécules cibles) et empêche l'interaction de ces molécules avec les monomères fonctionnels. Entre les ratios 1 :4 et 1 :8 le facteur d'impression est assez stable tout en notant une valeur maximale pour le ratios 1 :4 pour tous les insecticides organophosphorés avec leur

Chapitre V

MIP respectifs. L'augmentation du ratio molaire à 1 :10 entraîne de nouveau une diminution du facteur d'impression. Dans ce cas le ratio entre la molécule cible et le monomère fonctionnel n'est probablement pas idéal pour une complexation quantitative, ce qui diminue l'affinité du polymère.

III. 1. 2. Effet du monomère réticulant (crosslinker)

La quantité du monomère réticulant (crosslinker) est un paramètre très important dans la synthèse des polymères à empreintes moléculaires. Ce monomère contribue à la rigidité de la matrice polymérique [225]. Une matrice plus rigide empêche la déformation des cavités et préserve sa forme complémentaire, ce qui donne une forte affinité pour le polymère vers la molécule empreinte (molécule cible). La quantité de ce monomère dans le mélange de polymérisation a un effet important sur la reconnaissance moléculaire. D'après la littérature, des études ont démontré qu'une quantité importante de monomère réticulant dans le mélange de polymérisation donne une forte rigidité et sélectivité au polymère synthétisé [226-228]. Afin de mettre en évidence l'effet du monomère réticulant sur la sélectivité, des MIPs ont été synthétisés, en variant le ratio molaire molécule cible : monomère fonctionnel : monomère réticulant de 1 :4 :5 à 1 :4 :50 avec le ratio molaire molécule cible : monomère fonctionnel fixe (ANNEXE VII). Les résultats des extractions obtenues sont montrés dans *la figure V.2*.

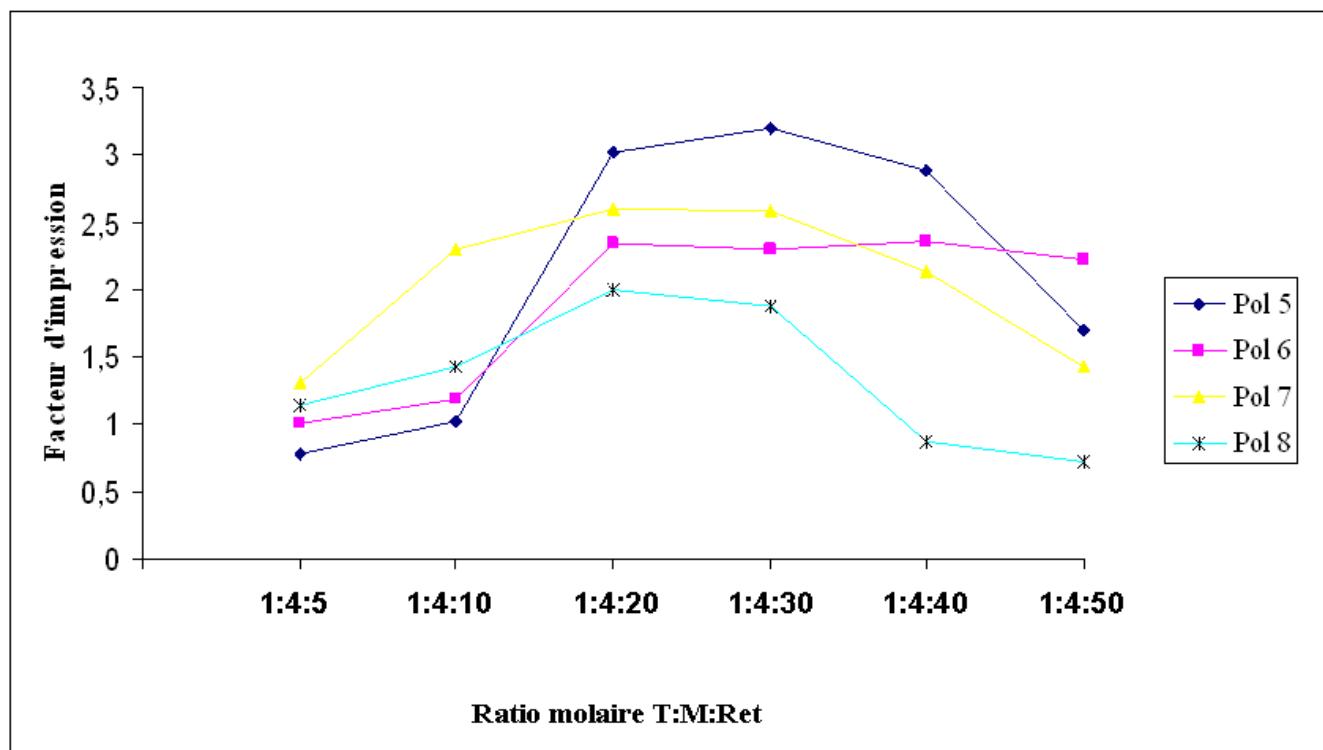


Figure V. 2 : Effet de la variation de la concentration en monomère réticulant dans le milieu de polymérisation, sur le facteur d'impression des insecticides organophosphorés dans leurs MIPs. ($n=3$, $RSD < 3, 6\%$). T = molécule cible, M= monomère fonctionnel, Ret = monomère réticulant

D'après les résultats de *la figure V.2*, on remarque que la capacité de rétention des MIPs vis-à-vis de leurs molécules empreintes augmente avec l'élévation de la quantité de monomère réticulant (EGDMA) dans le mélange de polymérisation. Pour les ratios molaires molécule cible/monomère fonctionnel / monomère réticulant, inférieurs à 1:4:20, les valeurs des facteurs d'impression obtenues sont basses ce qui montre que la capacité de rétention des MIPs est faible, cette observation peut être expliquée par l'insuffisance de la quantité en monomère réticulant (EGDMA) pour fixer la molécule empreinte sur le monomère fonctionnel et pour préserver les structures tridimensionnelles des cavités sélectives. Quand le ratio molaire se situe entre le rapport 1 :4 :20 et 1 :4 :40, le facteur d'impression est presque stable à sa valeur maximale pour les Pol 5, Pol 6 et Pol 7 avec les molécules cibles méthidathion, diméthoate et malathion respectivement. La capacité de rétention diminue dès que le ratio dépasse 1 :4 :40, ce que probablement est dû à l'excès de l'EGDMA dans le

Chapitre V

mélange de polymérisation, ce qui favorise des interactions de la molécule cible avec l'EGDMA plutôt qu'avec le monomère fonctionnel.

Résumé :

Les résultats obtenus concernant le ratio molaire molécule cible/monomère fonctionnel / monomère réticulant, confirme la validité du ratio 1 :4 :20 utilisés habituellement dans la littérature [229]. Le tableau ci-dessous résume les abréviations utilisées pour les MIPs synthétisés pour la suite de ce travail.

Polymère	Molécule empreinte	Monomère fonctionnel	Monomère réticulant	Ratio molaire
*Extraction du méthidathion				
Pol A	Méthidathion	MBAA	EGDMA	1 :4 :20
*Extraction du diméthoate				
Pol B	Diméthoate	IA	EGDMA	1 :4 :20
*Extraction du malathion				
Pol C	Malathion	MBAA	EGDMA	1 :4 :20
*Extraction du fenthion				
Pol D	Fenthion	Acrylamide	EGDMA	1 :4 :20

III. 2 .Optimisation des conditions SPE.

III. 2. 1. Quantité de polymère empaqueté dans les cartouches SPE.

Afin d'optimiser la quantité de polymère empaqueté dans les cartouches SPE, 0,5 mL de solutions d'acétonitrile dopées avec 2 mg/L de la molécule cible (méthidathion, diméthoate, malathion ou fenthion), sont percolées à travers les cartouches, contenant 20, 50, 80 et 100 mg des polymères MIPs synthétisés dans les conditions optimales. Les résultats des rétentions obtenus sont représentés dans le tableau V.I.

Chapitre V

Tableau V. 1 : Variation du pourcentage de rétention en fonction des quantités de polymère mis dans les cartouches SPE. (n= 3)

Quantité de polymère (mg)	% de rétention du méthidathion par le Pol A	% de rétention du diméthoate par le Pol B	% de rétention du malathion par le Pol C	% de rétention du fenthion par le Pol D
20	42±3.4	32±1.5	53±3.9	60±4.0
50	70±4.3	63±3.8	94±2.6	99±3.2
80	72±2.8	66±4.7	96±3.4	98±4.3
100	68±4.9	63±3.1	95±3.2	98±1.2

Les résultats du tableau montrent que pour tous les polymères (MIPs) testés, la capacité maximale de rétention est obtenue pour les cartouches contenant 50 à 100 mg de polymère. Une faible rétention (<60 %) est observée avec 20 mg de polymère pour tous les insecticides organophosphorés. Par conséquent, la quantité de polymère sélectionné pour la suite de notre travail est égale à 50mg.

III. 2. 2. Effet du débit de percolation

Afin de mettre en évidence l'effet du débit de percolation de la solution sur la rétention des insecticides (méthidathion, diméthoate, malathion et fenthion), les solutions d'acétonitrile (0,5mL) dopées avec 2mg/L de chaque insecticide sont percolées à travers les cartouches contenant 50 mg des MIPs correspondants, selon des débits variables de 0,1 à 1mL/min. Les résultats obtenus sont représentés dans *la figure V.3*.

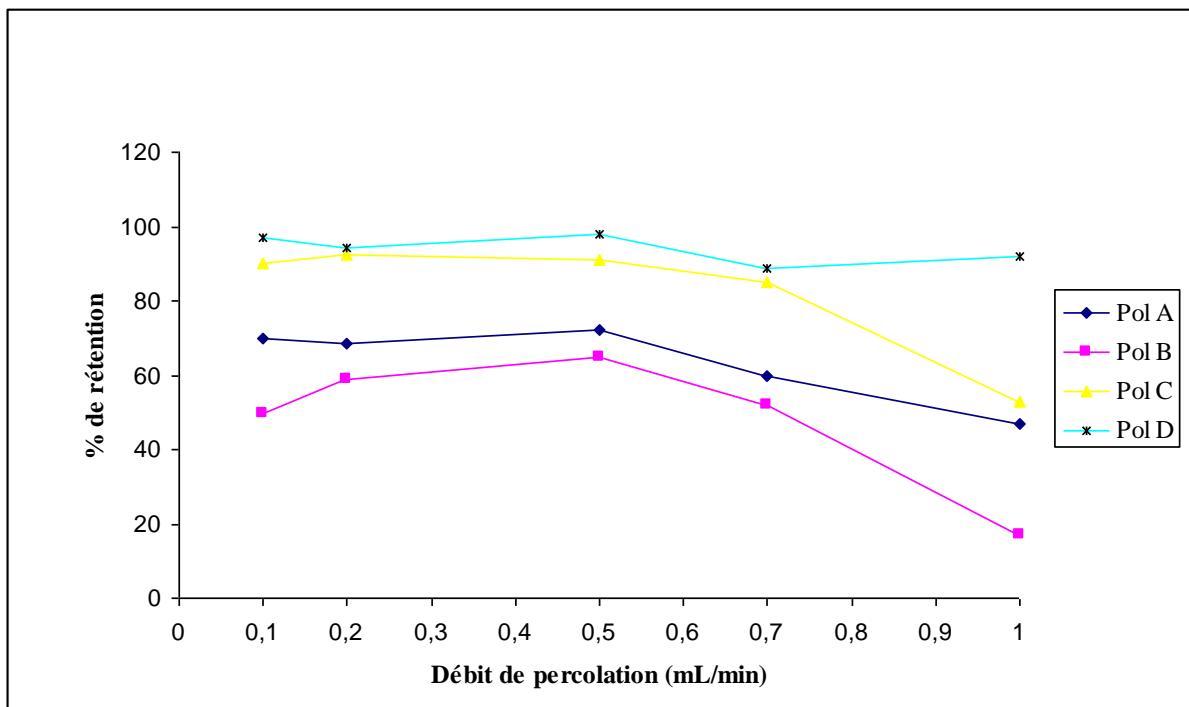


Figure V. 3 : Effet du débit de percolation sur les rétentions par leurs Mips des insecticides organophosphorés. ($n=3$, $RSD < 3, 9$)

Les résultats montrent que le débit de percolation a peu d'effet sur le pourcentage de rétention des différents insecticides jusqu'à 0,5 mL/min. Au-delà de ce débit, on note une diminution de la rétention des insecticides par leurs MIPs sauf dans le cas du fenthion qui a une rétention stable même si le débit est élevé. La baisse des pourcentages de rétention peut s'expliquer par une désorption des molécules retenues suite à un débit long et par un temps insuffisant pour la rétention si le débit est rapide. Pour obtenir une rétention maximale, le débit de percolation choisi pour la suite de nos expériences est égal à 0,5 mL /min.

III. 2. 3. Effet du solvant de percolation

Le but de cette partie est de déterminer l'effet de la nature du solvant percolé sur le pourcentage de rétention des insecticides par leurs MIPs et de connaître le solvant qui favorise les interactions spécifiques, tout en réduisant au maximum les interactions non spécifiques. Cinq solvants de polarités différentes sont étudiés : l'acétonitrile, le chloroforme, le dichlorométhane, le toluène et l'hexane. 1mL de chaque solvant dopé avec 1mg/L d'un

Chapitre V

insecticide est percolé à travers les cartouches contenant des MIPs bien que des NIPs, les molécules retenues sont éluées avec 1mL de méthanol acidifié. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau V.2.

Tableau V.2: Pourcentages de rétention sur MIPS et NIPs des insecticides étudiés en fonction de la nature du solvant percolé. (n =3)

Molécule cible	Méthidathion		Diméthoate		Malathion		Fenthion	
Solvant	MIP	NIP	MIP	NIP	MIP	NIP	MIP	NIP
Acétonitrile	42±1,8	7±3,3	26±4,2	nd	68 ±4, 3	18 ±2,8	83 ±2,4	39±4,1
Dichlorométhane	80±5,2	61±3,8	52±3,7	38±2,5	92 ±2,7	60 ±2,2	99 ±4,0	71 ±3,2
Chloroforme	85± 3,5	71± 2,9	70 ±3,4	58±2,6	98 ±3,6	69 ±5,0	97 ±3,0	78 ±2,5
Toluène	100±3,2	100±4,7	96±5,8	68±4, 3	101 ±4,9	100 ±3,0	99 ±2,6	99 ±4,6
Hexane	99±2,1	100±3,1	100±3,9	98±4.3	100 ±4,6	99 ±3,8	98 ±5,1	101 ± 3,4

nd : non détectable

Les résultats du tableau V.2. montrent que les extractions dans l'acétonitrile donnent des faibles rétentions sur les MIPs, tout en notant que le pourcentage de rétention varie d'une molécule à une autre; plus la molécule est polaire, plus la rétention est faible. L'insecticide le plus polaire à savoir le diméthoate qui a un coefficient de partage $\log P=0,704$ est le produit qui présente la rétention la plus faible (26%). Après le diméthoate, on trouve le méthidathion ($\log P=2,57$) avec une rétention égale à 42 %, puis le malathion ($\log P=2, 75$) avec une rétention de 68 %. En revanche, la molécule la plus hydrophobe des insecticides organophosphorés utilisés à savoir le fenthion ($\log P=4,84$), est une molécule qui est bien retenue sur son MIP (83%). Les rétentions de ces insecticides sur les polymères non imprimés correspondants (NIPs), sont très faibles par rapport aux rétentions par les MIPs, ce qui montre que la grande polarité de ce solvant supprime plus aisément les interactions non spécifiques, par lesquelles les molécules cibles peuvent être accrochées aux NIPs. Malgré les faibles

Chapitre V

rétentions de ces insecticides dans l'acétonitrile, la grande différence de rétention entre les MIPs et les NIPs nous permet de supposer que ce solvant présente une bonne sélectivité pour les MIPs.

Dans le dichlorométhane, les insecticides organophosphorés sont mieux retenus que dans l'acétonitrile, vu que la polarité du premier solvant est inférieure à celle de l'acétonitrile. Avec le dichlorométhane, la rétention n'est pas complète pour le méthidathion et le diméthoate qui ont des rétentions de 80% et 52% respectivement; par contre malgré la polarité de ce solvant on peut observer une importante rétention du fenthion (99%) et de malathion (92%) par leurs MIPs. Les extractions en utilisant les NIPs ont donné des rétentions plus faibles par rapport aux valeurs obtenues avec les MIPs, mais la différence de rétention entre ces deux polymères MIPs et NIPs est beaucoup moins importante que celle obtenue en utilisant l'acétonitrile.

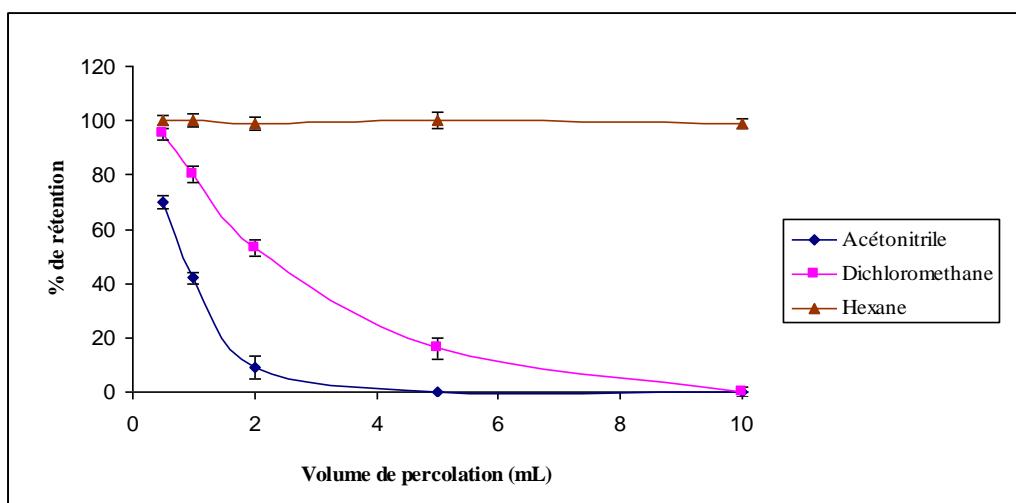
L'utilisation du chloroforme comme solvant de percolation donne des résultats proches de ceux obtenus avec le dichlorométhane, aussi bien avec les MIPs, qu'avec les NIPs. Cette similitude peut être expliquée par la polarité proche de ces deux solvants.

Les rétentions les plus élevées sur les polymères (MIP et NIP) sont observées en utilisant des solvants apolaires (hexane et toluène) pour la percolation. Les pourcentages de rétention arrivent à leurs valeurs maximales (100 %) pour tous les insecticides organophosphorés utilisés. Les quantités retenues par les MIPs sont les mêmes que celles retenues par les NIPs, ce qui montre que dans ces solvants, les insecticides sont accrochés sur les polymères par deux types d'interactions, spécifiques et non spécifiques.

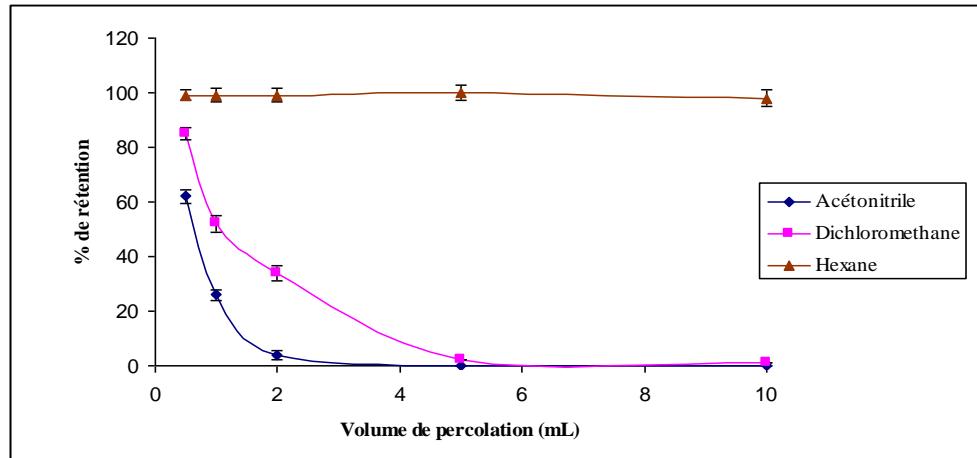
Les résultats obtenus dans cette partie sont en accord avec ceux de la littérature qui montrent que la force d'interaction entre la molécule cible et son MIP augmente avec la diminution de la polarité du solvant de percolation [230].

III. 2. 4. Effet du volume de percolation

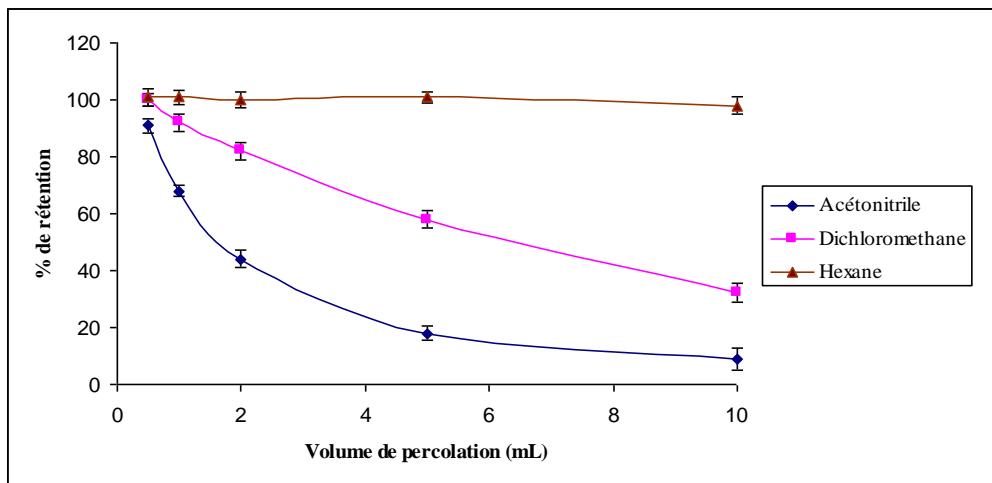
Pour tester l'effet du volume de percolation sur les performances de rétention des MIPs, différents volumes de trois solvants organiques de polarité différente (acétonitrile, dichlorométhane et hexane) sont dopés avec $1\mu\text{g}$ des insecticides organophosphorés (méthidathion, diméthoate, malathion et fenthion). Les solutions obtenues sont percolées à travers les cartouches SPE. Chaque insecticide est utilisé avec son propre MIP. Les molécules adsorbées sont éluées avec 1 mL methanol/2% TFA, évaporées à sec puis analysées par HPLC-UV. Les résultats obtenus sont représentés dans *la figure V.4*



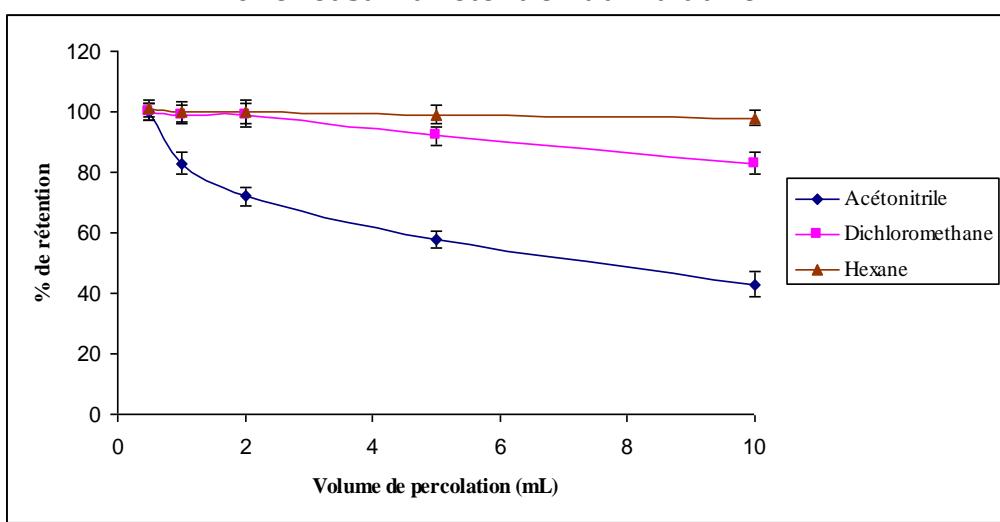
a : effet sur la rétention du méthidathion



b : effet sur la rétention de diméthoate



c : effet sur la rétention du malathion



d : effet sur la rétention du fenthion

Figure V. 4: Pourcentages de rétention sur MIPs des insecticides organophosphorés étudiés en fonction du volume de percolation de trois solvants. (n= 3)

Les résultats de *la figure V.4* montrent qu'en utilisant le solvant le plus polaire à savoir l'acétonitrile, la rétention de tous les insecticides organophosphorés testés diminue quand le volume de solvant augmente avec une diminution très rapide pour le méthidathion et le diméthoate qui ne s'accrochent plus au polymère à partir des volumes de percolation égaux à 4mL et 2mL respectivement. Ce phénomène peut être expliqué par la forte solubilité de ces deux insecticides polaires dans l'acétonitrile. Par contre la diminution de la rétention est plus lente avec les insecticides malathion et fenthion : la rétention est égale à 10% et 43% respectivement pour 10mL de solvant. L'extraction en utilisant le dichlorométhane, solvant

Chapitre V

ayant une polarité moyenne, donne également des rétentions fortes avec les petits volumes et faibles avec les grands, mais la différence est moins importante qu'avec l'acétonitrile. Avec 10 mL de dichlorométhane, la rétention est nulle pour le méthidathion et le diméthoate, et se situe à 32 % pour le malathion. Par contre avec le fenthion on n'observe qu'une faible diminution avec 10 ml de dichlorométhane. Les capacités des polymères en utilisant l'hexane comme solvant de percolation restent inchangées, quelque soit le volume de percolation utilisé : toutes les molécules percolées sont totalement adsorbées par les MIPs. Comme ce solvant assure une rétention complète des insecticides organophosphorés, et comme il est le seul solvant miscible avec l'huile d'olive, l'échantillon naturel de notre travail, l'hexane est sélectionné comme solvant de percolation pour l'optimisation du protocole d'extraction solide-liquide SPE.

III. 2. 5. Optimisation de la solution de lavage

Etant donné les fortes interactions des insecticides organophosphorés sur les polymères non imprimés dans l'hexane, la procédure de lavage est une étape cruciale qui peut diminuer la concentration des composés interférents dans la solution extraite et réduire au maximum les interactions non spécifiques entre les molécules cibles et le polymère imprimé (MIP). Il est important de s'assurer que le processus de lavage n'affecte pas l'attache spécifique des molécules cibles au polymère. Pour ceci des cartouches contenant 50 mg des polymères MIPs ou NIPs sont conditionnées avec 5 ml d'hexane puis chargées avec 1 ml des solutions de 1 mg /L molécule cible/hexane. Différents solvants sont testés pour optimiser la procédure de lavage à savoir le chloroforme, le toluène, le dichlorométhane, l'acétonitrile et le méthanol. Cette étape est suivie d'une élution avec 1 ml de méthanol/2% TFA. Les fractions de lavage et d'élution, sont évaporées à sec, collectées dans la phase mobile puis analysées par HPLC-UV.

Chapitre V

III. 2. 5. 1. Optimisation de la solution de lavage pour le méthidathion

Les résultats de *la figure V.5* montrent qu'après lavage des polymères MIP et NIP par les solvants chloroforme, toluène, et hexane, toutes les molécules de méthidathion restent accrochées aux polymères MIP et NIP et aucune molécule n'a été détectée dans les fractions de lavage ce qui signifie que la faible polarité de ces solvants est incapable de supprimer les interactions non spécifiques entre l'insecticide et les polymères. Par contre l'utilisation des solvants polaires méthanol et acétonitrile entraîne un décrochement total des molécules sur les NIPs, ce qui montre que les interactions non spécifiques sont facilement supprimées par ces solvants. Les mêmes résultats sont obtenus avec le MIP c'est à dire que même les interactions spécifiques sont fortement affectées en utilisant ces solvants. Le solvant le plus prometteur pour l'optimisation de l'étape de lavage est le dichlorométhane qui permet d'éluer toutes les molécules retenues sur le NIP, et qui assure en même temps le maintien d'environ 60 % des molécules sur le MIP après l'étape de lavage ce qui montre que ce solvant n'est pas capable de rompre complètement les interactions spécifiques.

Chapitre V

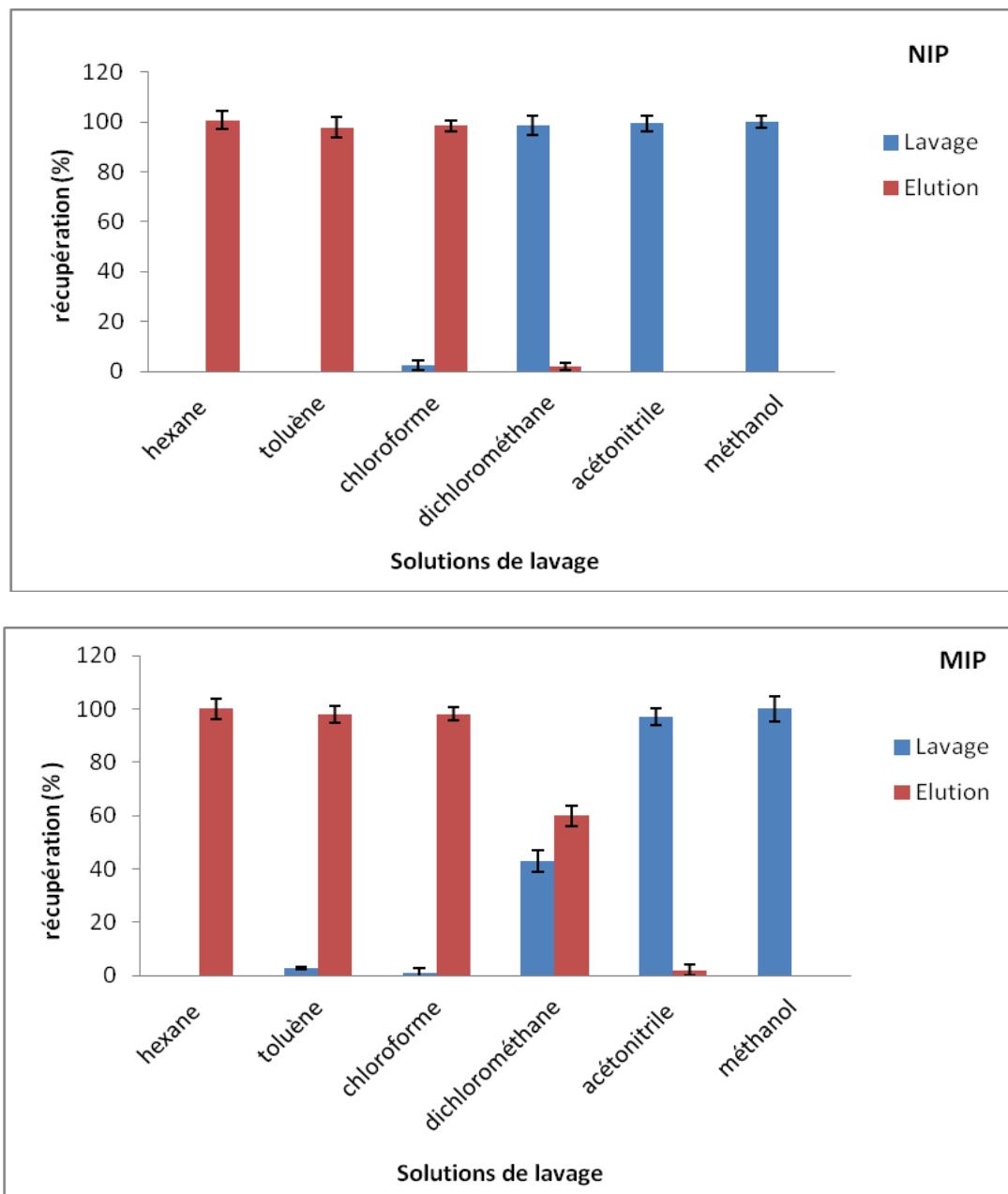


Figure V. 5: Pourcentages de méthidathion détectés dans les fractions de lavage et d'élution des polymères NIP et MIP. Lavage avec 2ml de différents solvants, et élution avec 1 ml de méthanol/2% TFA.

En se basant sur les résultats précédents, des expériences ont été réalisées pour analyser l'effet de différents ratios de dichlorométhane dans la solution de lavage, en utilisant un mélange hexane / dichlorométhane, tout en variant les pourcentages de dichlorométhane de 2 à 20% (*Figure V.6*).

Chapitre V

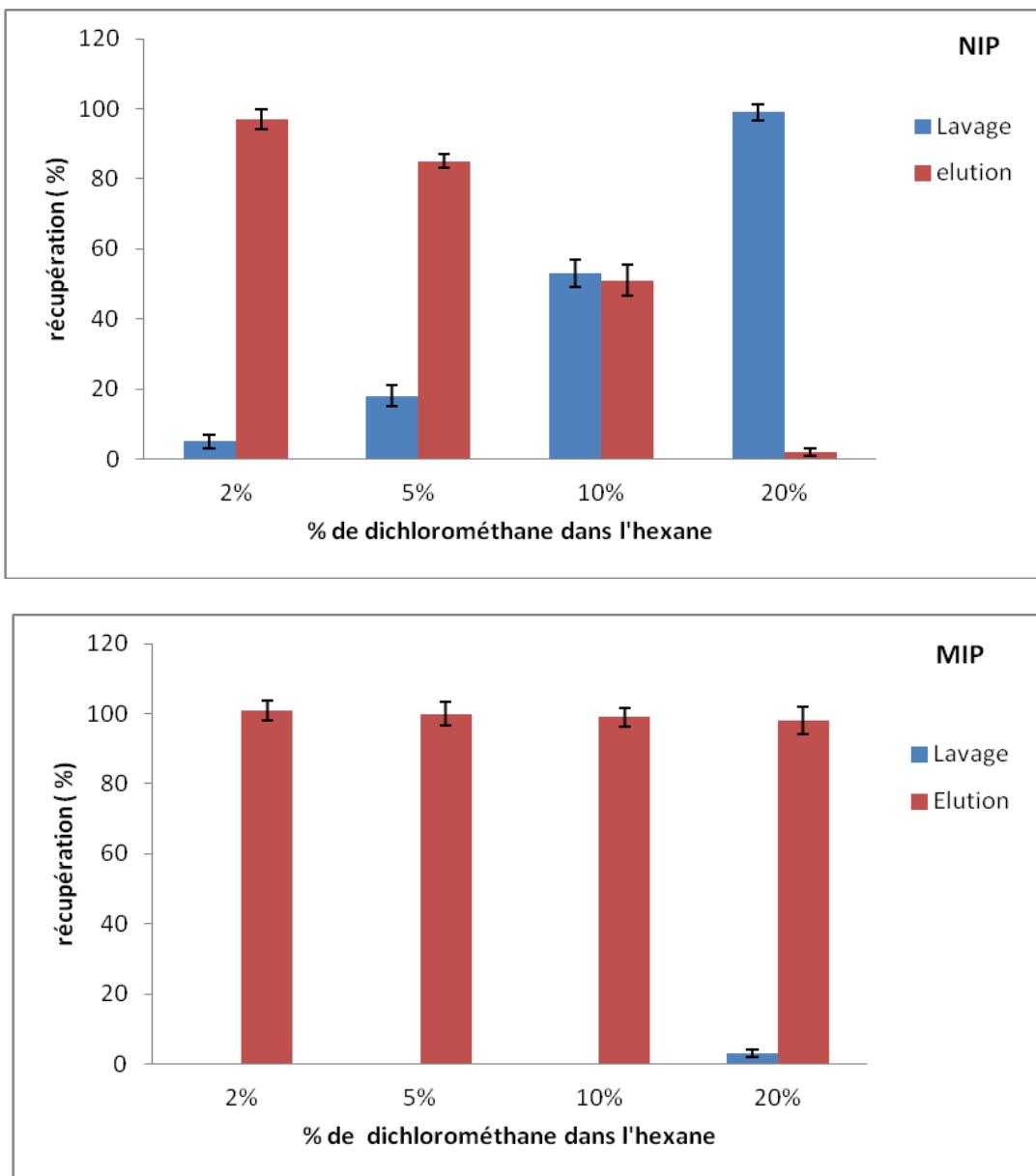


Figure V. 6 : Pourcentages de méthidathion détectés dans les fractions de lavage et d’élution des polymères NIP et MIP en fonction de la variation de la concentration de dichlorométhane dans la solution de lavage. Lavage avec 2ml de mélange hexane / dichlorométhane, et élution avec 1 ml de méthanol/2% TFA.

La figure V.6 (NIP), illustre clairement l’effet des ratios de dichlorométhane sur les interactions non spécifiques du méthidathion avec le NIP. Il est montré que les faibles pourcentages de dichlorométhane dans l’hexane (2 à 10 %) ne sont pas suffisants pour l’élimination totale des molécules non spécifiquement retenues par le NIP. Par contre, ces molécules sont complètement décrochées en utilisant une solution à 20% de dichlorométhane.

Chapitre V

L'effet des ratios de dichlorométhane dans l'hexane sur les molécules retenues par le MIP est illustré dans *la figure V.6* (MIP). Les résultats de cette figure montrent que quelque soit le pourcentage de dichlorométhane dans la solution de lavage, les molécules sont fortement accrochées au MIP et elles ne se détectent que dans les fractions d'élution. Par conséquent le mélange 2ml de solution hexane /20% dichlorométhane est sélectionné comme solution de lavage pour le méthidathion et 1ml de méthanol / 2% TFA comme solution d'élution.

III. 2. 5. 2. Optimisation de la solution de lavage pour le diméthoate

Pour le diméthoate les résultats de *la figure V.7* indiquent que les solvants hexane toluène, n'ont aucune influence sur la rétention par le NIP, tandis que le chloroforme élue 20 %, et le dichlorométhane, l'acetonitrile et le méthanol décrochent complètement les molécules retenues. Les résultats obtenus en utilisant le MIP sont semblables à ceux mis en évidence avec le méthidathion; la seule différence concerne le dichlorométhane qui seul décroche environ 70 % des molécules retenues.

Comme pour le méthidathion l'analyse de l'effet de différents ratios de dichlorométhane dans la solution de lavage (*Figure V.8*), montre que la solution permettant d'éliminer toutes les molécules sur le NIP tout en maintenant accrochées celles retenues par le MIP est une solution de 2ml d'hexane/15% dichlorométhane.

Chapitre V

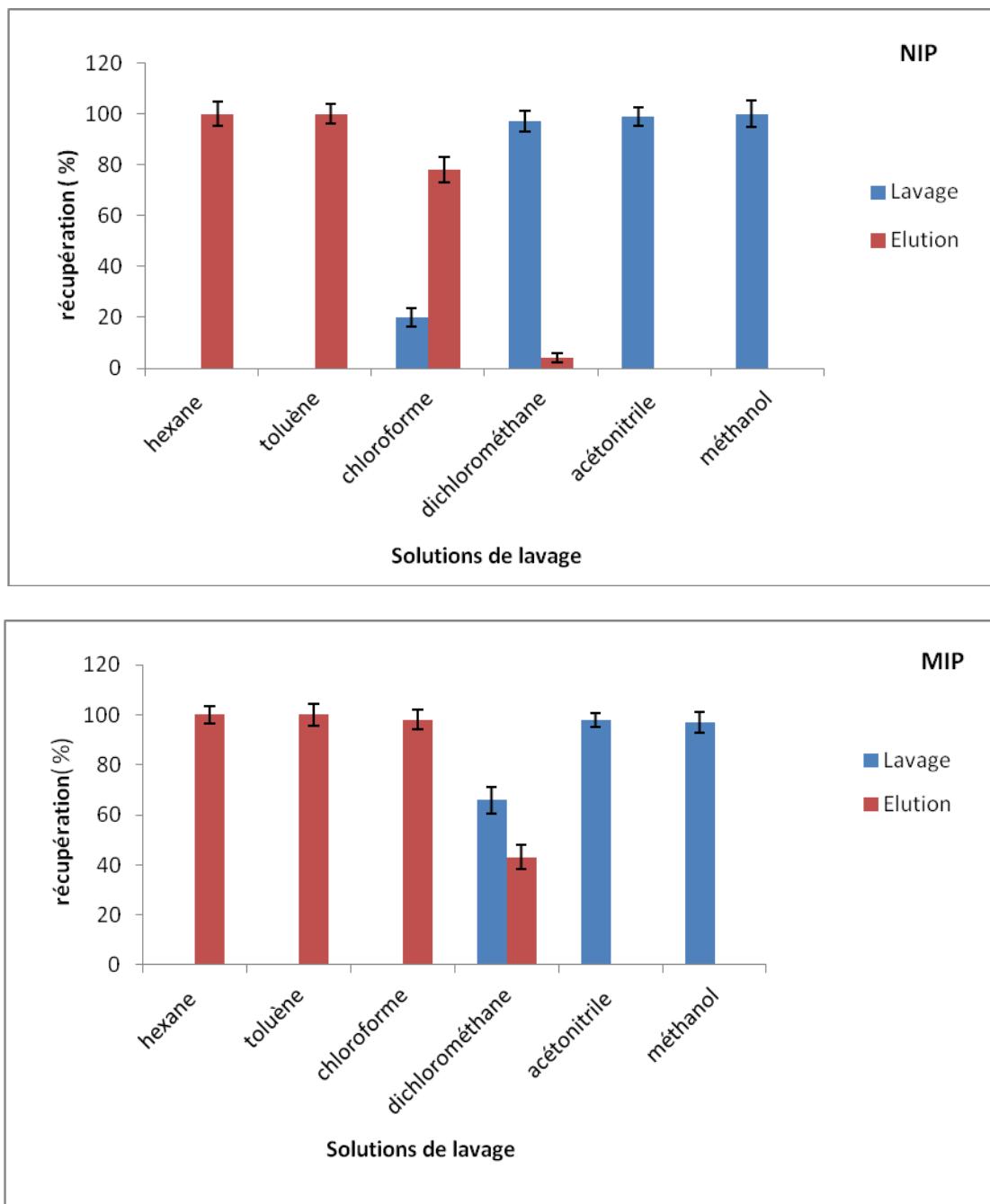


Figure V. 7: Pourcentages de diméthoate détectés dans les fractions de lavage et d'élution des polymères NIP et MIP. Lavage avec 2ml de différents solvants, et élution avec 1 ml de méthanol/2% TFA.

Chapitre V

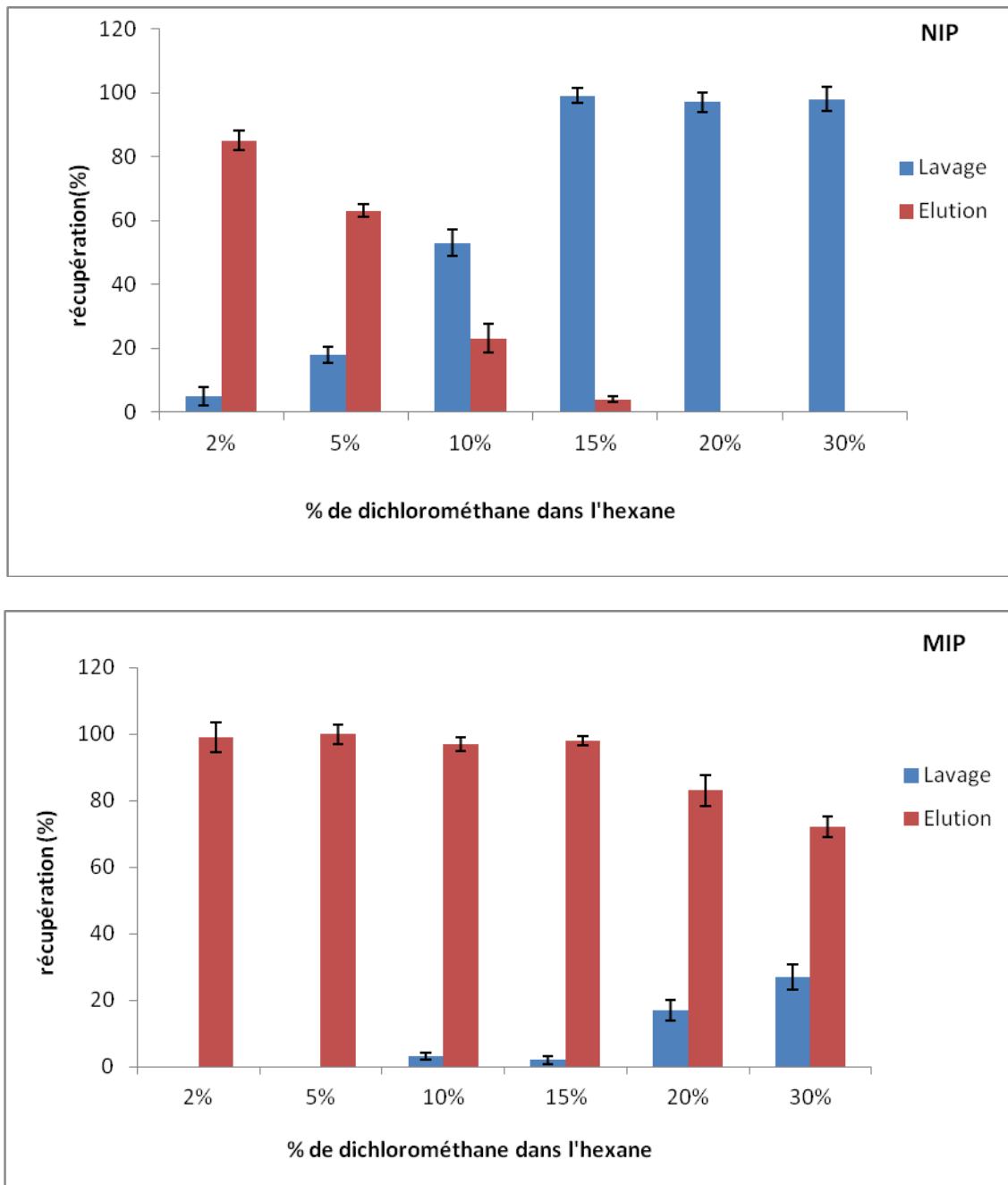


Figure V. 8 : Pourcentages de diméthoate détectés dans les fractions de lavage et d'élution des polymères NIP et MIP en fonction de la variation de la concentration de dichlorométhane dans la solution de lavage. Lavage avec 2ml de mélange hexane / dichlorométhane et élution avec 1 ml de méthanol/2% TFA.

III. 2. 5. 3. Optimisation de la solution de lavage pour le malathion

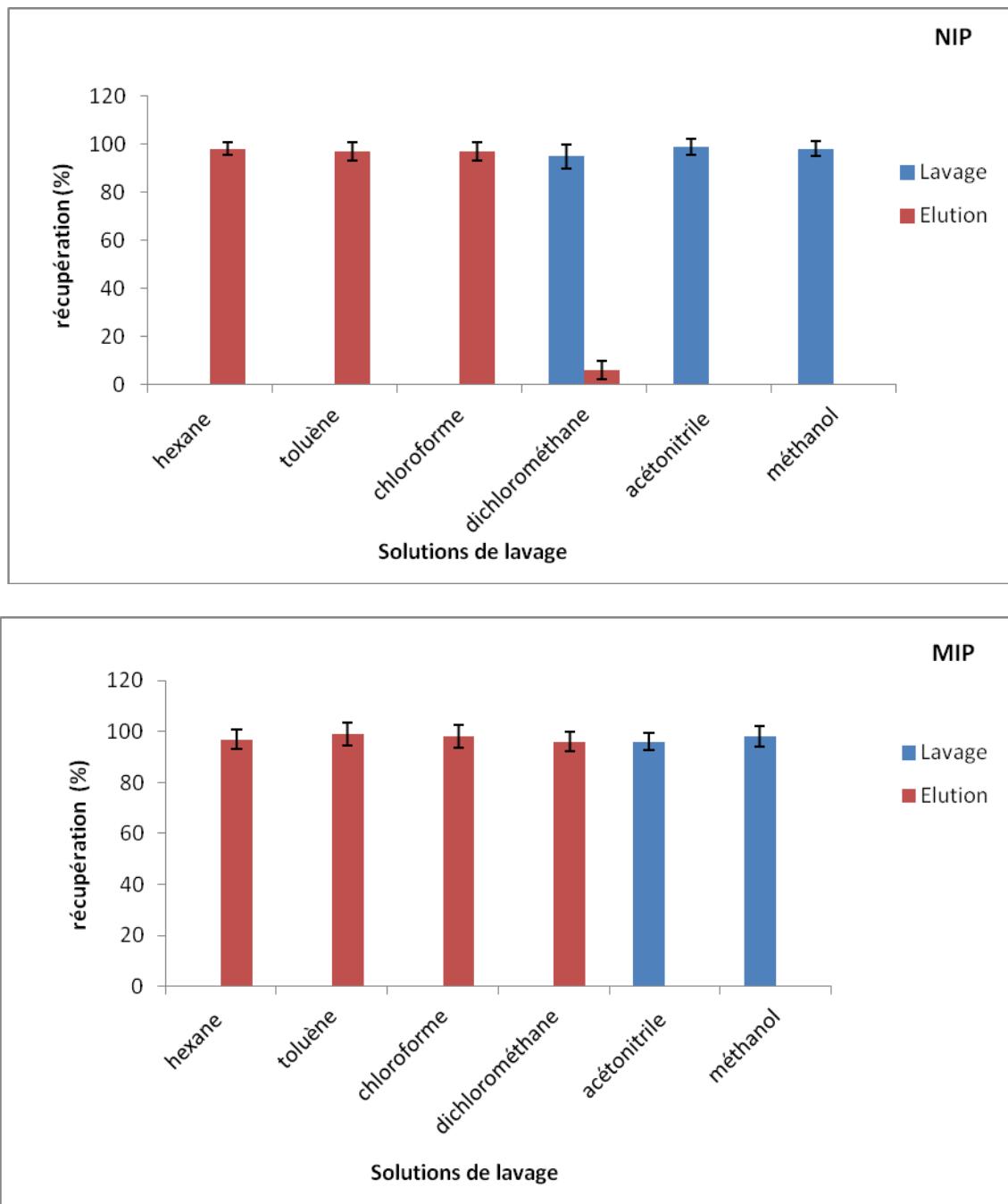


Figure V. 9: Pourcentages de malathion détectés dans les fractions de lavage et d'élution des polymères NIP et MIP. Lavage avec 2ml de différents solvants, et élution avec 1 ml de méthanol/2% TFA.

La figure V.9 montre qu'excepté avec le dichlorométhane, il n'y pas de différence entre les NIPs et les MIPs avec les différents solvants de lavage étudiés. Sur le NIP, le dichlorométhane décroche complètement les molécules accrochées. Par contre l'effet dichlorométhane sur le MIP est différent car ce solvant ne permet pas de décrocher les

molécules retenues par le MIP ce qui signifie que le dichlorométhane est le solvant le plus convenable pour le lavage du malathion.

III. 2. 5. 4. Optimisation de la solution de lavage pour le fenthion

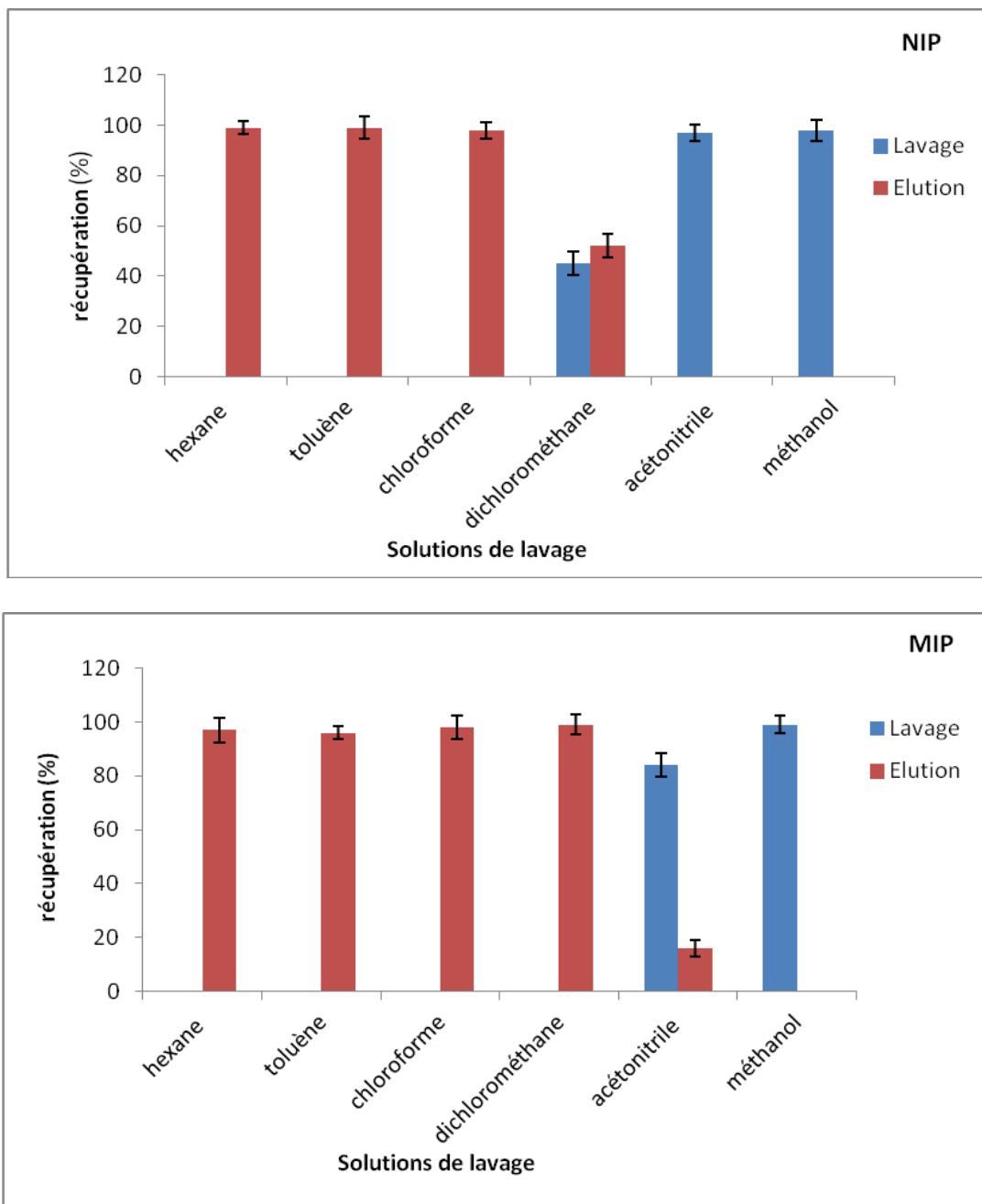


Figure V. 10 : Pourcentages de fenthion détectés dans les fractions de lavage et d'élution des polymères NIP et MIP. Lavage avec 2ml de différents solvants, et élution avec 1 ml de méthanol/2% TFA.

Chapitre V

Pour le fenthion (*Figure V.10*) l'hexane, le chloroforme et le toluène restent sans effet pour les deux polymères NIP et MIP, comme dans le cas des autres insecticides déjà étudiés tandis que l'utilisation de dichlorométhane décroche environ 45 % des molécules retenues par le NIP, et n'a aucun effet sur la rétention des molécules par le MIP.

Des mélanges de dichlorométhane avec différentes concentrations en acétonitrile ont été testés comme la solution de lavage. Le tableau V.3. montre les quantités de fenthion détectées dans les fractions de lavage et d'élution après percolation à travers le NIP et MIP. D'après les résultats obtenus, quand la concentration en acétonitrile dans le dichlorométhane varie de 5 à 6%, toutes les molécules qui sont retenues par des interactions non spécifiques sur le NIP sont totalement décrochées après l'étape de lavage, tandis que les molécules spécifiquement retenus sur le MIP restent accrochées. Pour cette raison 2ml du mélange dichlorométhane / 5% acétonitrile, est sélectionné comme solution de lavage pour le fenthion dans la suite de notre travail.

Tableau V. 3 : Pourcentages de fenthion détectés dans les fractions de lavage et d'élution des polymères NIP et MIP en fonction de la concentration en acétonitrile dans la solution de lavage. (n=3, RSD< 4,8)

Polymère	ACN%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NIP	Lavage	45,2	57,6	64,2	74,3	87,5	96,1	96,4	96,8	98,3	98,8	98
	Elution	52,7	42,0	34,7	22,8	12,3	5,3	5,7	4,9	nd	nd	nd
MIP	Lavage	nd	6,6	10,7	13,4	16,3						
	Elution	98,3	99,4	97,6	98,5	97,9	99,0	98,6	97,4	92,2	89 ,0	82,6

*Solution de lavage : 2ml de mélange (DCM /ACN) ; Elution : 1ml méthanol /2% TFA

*nd : non détectable

Chapitre V

III. 2. 6. Sélectivité des MIPs synthétisés

Les supports polymères à empreintes moléculaires (MIPs) sont connus en général par leur capacité à retenir des composés de structures analogues à la molécule empreinte. Afin de déterminer la réactivité des polymères MIPs synthétisés (Pol A, Pol B, Pol C et Pol D) vis-à-vis des différents insecticides organophosphorées utilisés dans notre travail, des solutions d'hexane dopés avec 1mg/L de chacun de ces insecticides ont été préparées puis percolées à travers tous les cartouches des polymères MIPs suivant les protocoles optimisés. Les profils de lavage et d'élution obtenus pour les différents composés testés, sont présentés dans le Tableau V.4.

Tableau V.4: Pourcentage des insecticides organophosphorés détectés dans les fractions de lavage et d'élution après l'extraction en utilisant différentes MIPs (n=3)

Polymères	Pol A		Pol B		Pol C		Pol D	
	Lavage	Elution	Lavage	Elution	Lavage	Elution	Lavage	Elution
Méthidathion	nd	98 ± 3,1	63±5,0	34±4,3	10±2,6	88±2,7	96± 3,5	6±3,6
Diméthoate	42 ±3,5	62 ± 4,9	nd	99±4,8	13 ± 3,5	85 ± 3,5	98 ± 3,7	nd
Malathion	97 ± 5,2	nd	98±2,4	nd	5±1,3	97 ± 4,8	97 ± 5	nd
Fenthion	99 ± 3,1	nd	96 ±3,3	nd	24 ± 3,2	73 ± 3,4	4 ± 3,2	97±4,1
Malaoxon	97 ± 5,4	nd	98±2,4	nd	13 ± 4,8	86 ± 2,9	97 ± 5,1	5±2,9
Omethoate	94 ± 3	5 ± 4,2	23± 3,3	74 ±4,5	18 ± 3,3	80 ± 3	99 ± 3,2	nd
Monocrotophos	78± 3	24 ± 3,8	36±1,8	66±3,7	47± 2,6	52± 2,3	96± 2,7	7±3,8
Methidathion-oxon	nd	99±4,4	58±2,7	42± 3,3	14± 3,1	83±4,1	95± 3,0	7±2,8

Les résultats illustrés dans le tableau V.4 montre que le Pol A est sélectif pour sa molécule empreinte : le méthidathion et sa forme oxon méthidathion-oxon. De plus il permet d'extraire d'autre molécules mais à des pourcentages faibles comme le diméthoate et le monocrotophos à 62 % et 24% respectivement. Le polymère B est aussi très sélectif pour sa

Chapitre V

molécules empreinte le diméthoate et sa forme oxon (omethoate). Il peut également extraire à environ 66%, le monocrotophos, qui est une molécule structuralement similaire au diméthoate. Le polymère D ne permet d'extraire sélectivement que sa molécule empreinte, le fenthion en raison de d'une différence entre la forme de cette molécule et celle des autres insecticides. Le polymère qui permet d'extraire la majorité des molécules organophosphorés est le Pol C qui s'est synthétisé avec le malathion comme molécule empreinte. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le malathion possède des groupements fonctionnels importants et que sa grande masse moléculaire permet de créer des empreintes très larges sur le MIP, ce qui facilite l'accès et la rétention d'autres molécules qui possèdent les mêmes groupements fonctionnels et des masses moléculaires faibles. Ces résultats montrent clairement que la forme des molécules empreintes joue un rôle très important dans la détermination de la sélectivité des MIPs.

Comme le diméthoate et le malathion se trouvent souvent sous leurs formes oxon (ométhoate et malaoxon), des polymères à empreintes moléculaires (MIP : Omethoate-IA) et (MIP : Malaoxon-MBAA) en utilisant ses métabolites comme molécules empreintes sont synthétisés, suivant les protocoles optimisés. Pour comparer leur sélectivité à celles obtenues pour les polymères synthétisés avec le diméthoate (Pol B) et le malathion (Pol C), les extractions ont été réalisées de façon identique à celles décrites précédemment. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau V.5.

Chapitre V

Tableau V. 5: Pourcentage des insecticides organophosphorés détectés dans les fractions de lavage et d'élution après l'extraction en utilisant les MIPs à base des formes oxon (métabolites) du diméthoate et du malathion.

insecticides	MIP Omethoate-IA		MIP Malaoxon-MBAA	
Méthidathion	Lavage 97±2,5	Elution nd	Lavage 6±2,6	Elution 95±3,6
Diméthoate	nd	98±4,8	10 ± 2,3	88 ± 3,7
Malathion	98±2,4	nd	nd	99 ± 4,1
Fenthion	98±3,4	nd	28 ± 2,1	70 ± 3,2
Malaoxon	96±5,1	nd	nd	98 ± 2,8
Omethoate	nd	99±4,5	8 ±1,9	92± 3,3
Monocrotophos	13 ±3,3	85±3,7	23± 2,5	78± 3,4
Methidathion-oxon	96±2,8	nd	15±4,0	83±3,8

En comparant les résultats des deux tableaux V.4 et V.5, on remarque que le MIP Ométhoate-IA peut extraire le diméthoate à 98% et l'ométhoate à 99% alors que le MIP Diméthoate-IA (Pol B) donne une extraction à 99% pour le diméthoate et 74% pour l'ométhoate. Les mêmes résultats sont obtenus avec le MIP Maloxon-MBAA, qui permet d'extraire 99% et 98% de malathion et de malaoxon respectivement. Par contre le MIP Malathion-MBAA (Pol C) ne donne que 86% d'extraction pour le malaoxon et 97% pour le malathion. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que le remplacement de l'atome de soufre par celui de l'oxygène dans les formes oxon (Voir figures dans l'ANNEXE I) forme des empreintes plus sélectives et de bonne affinité, car l'atome d'oxygène peut plus facilement faire des liaison hydrogène avec les groupements des molécules cibles que le soufre. Par conséquent, dans la suite de notre travail les MIPs Dimethoate-IA (Pol B) et Malathion-MBAA (Pol C) sont remplacés par les MIPs Omethoate-IA et Maloxon-MBAA respectivement.

Chapitre V

Donc pour la suite du travail on nomme le - *Pol B : MIP Omethoate-IA*

-*Pol C : MIP Maloxon-MBAA*

III. 3. Application aux solutions aqueuses

III. 3. 1. Effet du volume

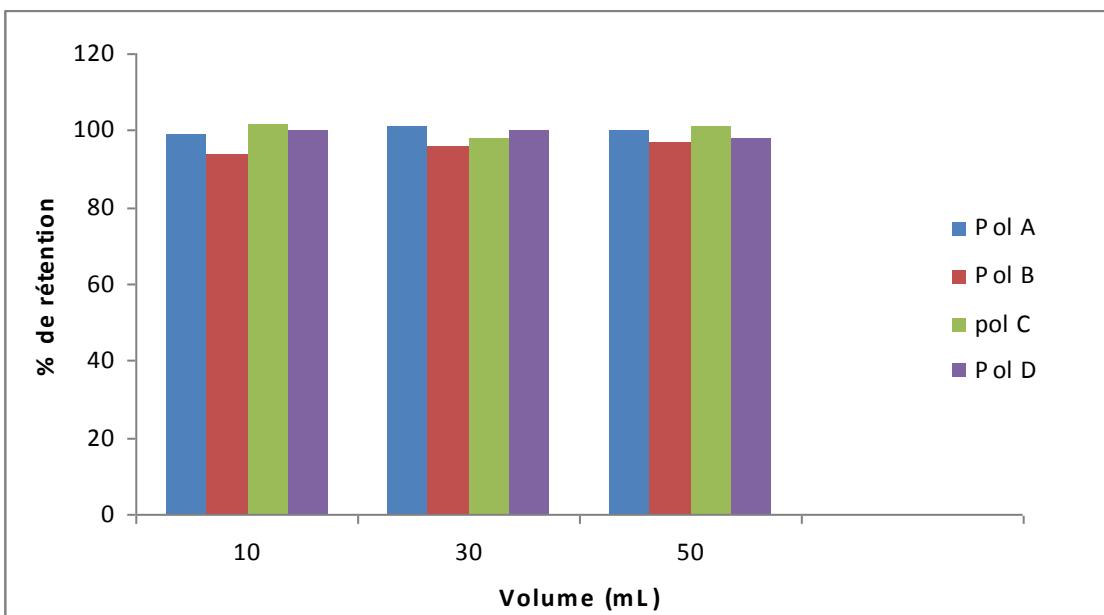
Dans le but d'évaluer la force des interactions entre les molécules empreintes et leurs polymères MIPs et NIPs dans un milieu réel, et afin de tester l'efficacité de ces polymères synthétisés dans une matrice moins complexe, un protocole d'extraction en milieu aqueux a été appliqué par percolation d'eau pure dopée avec des insecticides organophosphorés. A cet effet, des volumes de 10 à 50 mL (10, 30, 50) d'eau contenant 1 µg pour chaque insecticide sont percolés à travers les MIPs et les NIPs. Cette étape est suivie par un lavage en utilisant les solutions optimisées puis par une élution avec le méthanol acidifié. La solution de chaque insecticide est percolée à travers son propre MIP. Cette procédure effectuée en trois reprises a permis d'obtenir les profils présentés en *Figure V.11.*

On nomme -*Pol A' : NIP correspondant au Pol A*

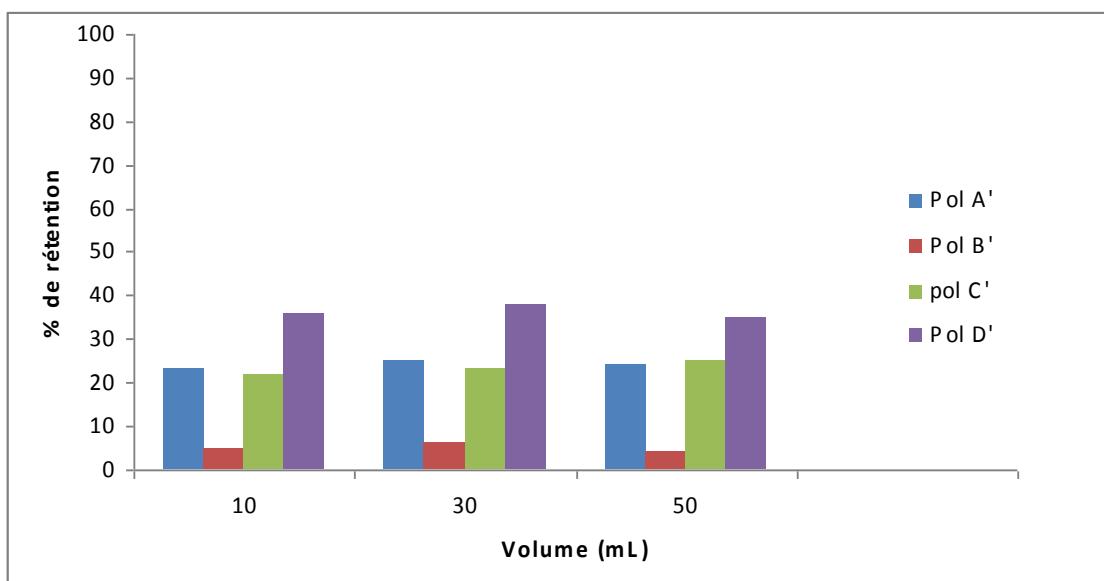
-*Pol B' : NIP correspondant au Pol B*

-*Pol C' : NIP correspondant au Pol C*

-*Pol D' : NIP correspondant au Pol D*



(A)



(B)

Figure V. 11 : Pourcentages d'insecticides organophosphorés retenues par leurs polymères (A : MIPs et B : NIPs) après lavage de chaque polymère en utilisant son protocole optimisé ($n=3$, RSD < 3,7%).

Les résultats de cette étude en milieu aqueux démontrent que cette matrice n'engendre aucun effet sur les rétentions obtenues par les MIPs (*Figure V.11 A*). En effet, ces résultats confirment que la percolation d'un volume important n'entraîne pas une chute des rendements d'extraction qui sont constants et qui correspondent à une moyenne de 98 %. De plus, ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors de la percolation d'un solvant organique

Chapitre V

apolaire (hexane). Par contre de fortes rétentions des insecticides organophosphorés par les polymères non imprimés (NIPs) par rapport à ceux obtenus en milieu organique, sont observées (*Figure V.11 B*). Ceci peut être expliqué par la rétention de ces insecticides par des interactions hydrophobiques en plus d'autres interactions non spécifiques. Le résultat qui confirme cette hypothèse est que la molécule la plus hydrophobe, le fenthion ($\log P=4,84$), est la plus retenue, alors que la polarité forte de la molécule diméthoate ($\log P=0,704$) induit une rétention moins forte par interactions hydrophobiques. Afin d'assurer une rupture complet de ces interactions hydrophobiques, une optimisation d'une procédure de lavage est nécessaire de nouveau.

III. 3. 2. Effet du pH

Le pH est l'un des facteurs les plus importants dans toutes les études d'adsorption. Ce paramètre peut influencer à la fois sur la surface de l'adsorbant ainsi que sur la structure de la molécule à retenir. Cette grandeur caractérise les eaux et sa valeur dépendra de l'origine de l'effluent. La technique de traitement à adopter dépendra fortement de la valeur du pH. C'est la raison pour laquelle, dans toute étude relative à la rétention, l'optimisation de la capacité de rétention en fonction du pH est indispensable.

Dans notre étude nous allons essayer de mettre en évidence l'effet du pH de la solution aqueuse sur la rétention sélective des insecticides organophosphorées par leurs MIPs. Pour ceci, nous avons suivi l'effet du pH sur la rétention de chaque insecticide dans 10ml d'eau dopée avec 1 μ g par 50 mg des MIPs contenus dans les cartouches SPE. L'acidification du milieu est réalisée en y additionnant quelques gouttes d'acide nitrique concentré. De la soude concentrée a été utilisée pour avoir des pH basiques. Les résultats obtenus sont représentés sur *la figure V.12*.

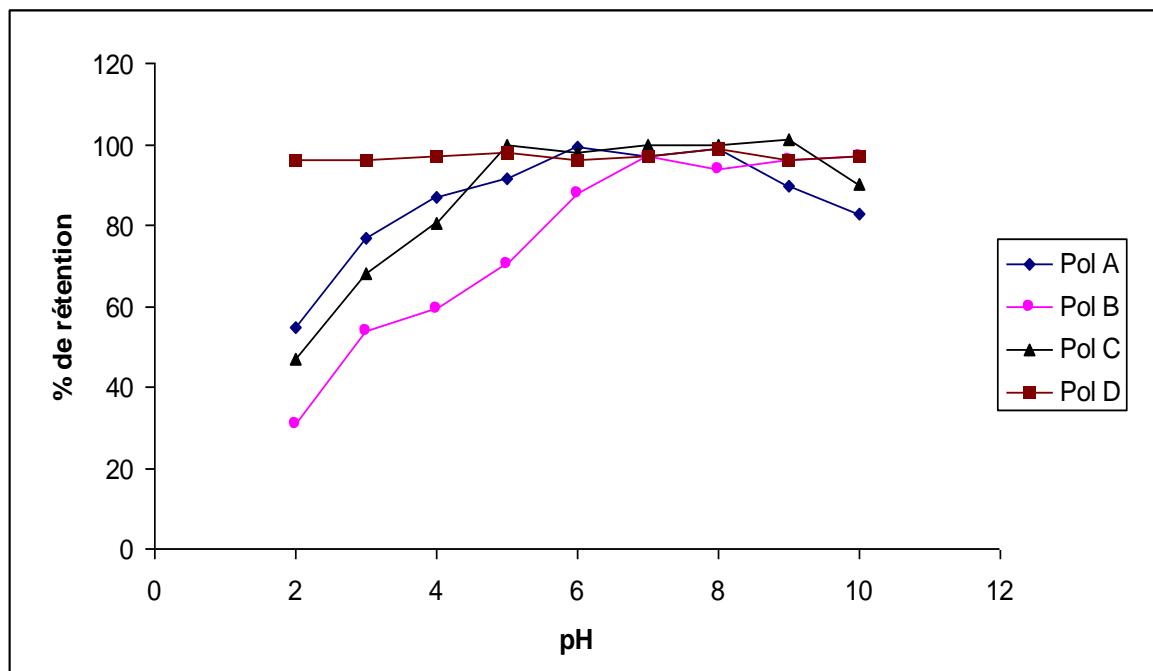


Figure V. 12 : Effet du pH sur la rétention des insecticides organophosphorées par leurs MIPs à partir d'un échantillon aqueux de 10 mL ($n=3$ et RSD <4,0)

L'effet du pH sur l'affinité des MIPs vers leurs molécules empreintes (insecticides organophosphorés) a été étudié en variant la valeur du pH de la solution à percoler de 2 à 10. Les résultats obtenus montrent que l'extraction du méthidathion, du diméthoate et du malathion sur les polymères MIPs Pol A, Pol B et Pol C respectivement, est faible pour les pH faibles ($\text{pH} < 6$). Ceci peut être expliqué par la compétition des molécules H_3O^+ avec ces insecticides pour se lier à des groupements fonctionnels des polymères MIPs par des liaisons hydrogène, ce qui fait diminuer l'accès de ces molécules dans leurs cavités spécifiques. Les meilleurs rendements d'extraction sont obtenus lorsque la valeur du pH se situe entre 6 et 8. La rétention des molécules méthidathion et malathion diminue de nouveau pour les $\text{pH} > 8$: ce résultat est du probablement à l'ionisation de ces molécules, ce qui entraîne une répulsion avec les polymères qui ont à ces valeurs de pH les mêmes charges que les molécules. Pour le fenthion le rendement d'extraction reste le même pour tous les valeurs de pH.

III. 3. 3. Effet de la force ionique

Des études ont montré que l'augmentation de la force ionique peut causer une augmentation ou une diminution de l'adsorption des composés organiques [231,232]. L'adsorption peut également être insensible aux variations de la force ionique [233]. Généralement, l'effet de la force ionique dépend de la nature de l'adsorbant, et de la molécule à adsorber [234,235].

Pour étudier l'effet de la force ionique sur la rétention de quatre insecticides organophosphorés par leurs MIPs, nous avons ajouté à 10mL de nos solutions aqueuses dopées par 1 μ g d'insecticides organophosphorés des masses variables de nitrate de sodium (NaNO_3). La solution de chaque insecticide est percolée à travers son propre MIP, et les étapes de lavage et d'élution sont réalisées suivant les protocoles optimisés.

Les résultats obtenus sont représentés sur *la figure V.13*. Ces courbes représentent la variation des pourcentages de rétention de quatre insecticides sur leurs MIPs, en fonction des concentrations croissantes en nitrate de sodium.

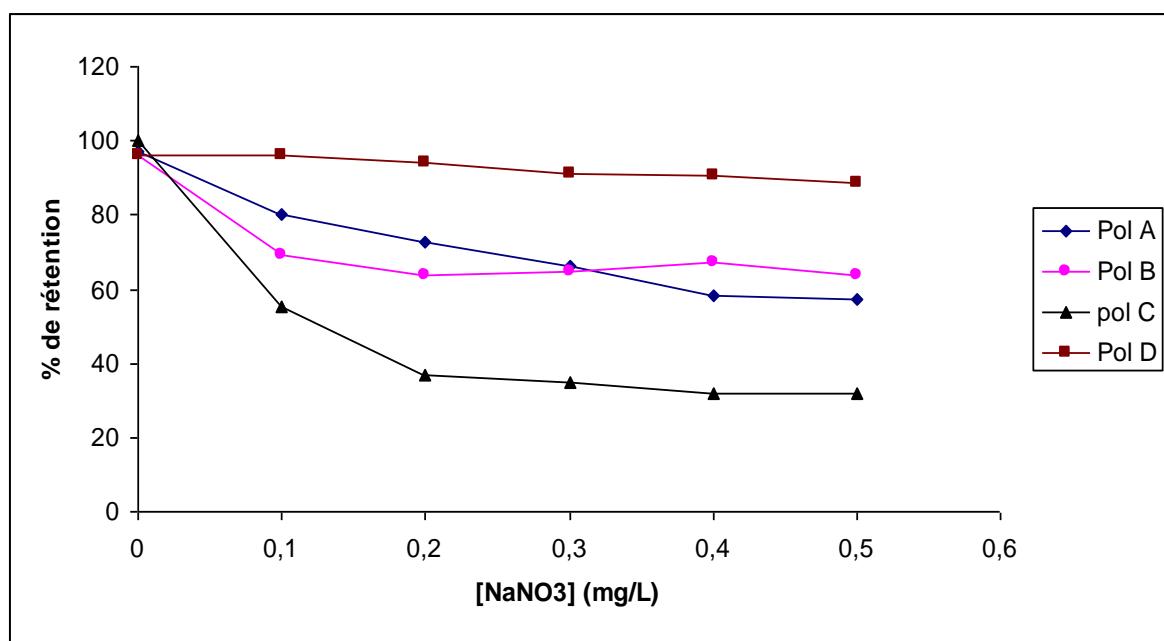


Figure V. 13 : Effet de la force ionique sur la rétention des insecticides organophosphorées par leurs MIPs (n=3 et RSD <4,3).

Ces courbes montrent que, l'ajout de NaNO₃ n'a pas pratiquement pas d'effet sur la rétention du fenthion sur son MIP (Pol D), alors que dans le cas des insecticides organophosphorés méthidathion, diméthoate et malathion avec leurs MIPs Pol A, Pol B et Pol C respectivement, cette rétention diminue au fur et à mesure que la concentration en NaNO₃ augmente. Cette diminution de la rétention est probablement due à une compétitivité d'adsorption des ions nitrate avec ces insecticides par les MIPs. On peut même supposer que la diffusion des insecticides vers la surface de polymère devient de plus en plus lente en milieux aqueux lorsque la force ionique augmente ce qui diminue l'accès des molécules dans les cavités.

VI. Conclusion

De nombreux MIPs ont été synthétisés par polymérisation radicalaire dans le but de développer des cavités sélectives vis-à-vis des insecticides organophosphorées. Plusieurs stratégies ont alors été mises en place pour obtenir des supports sélectifs en optimisant plusieurs facteurs.

Dans un premier temps, des MIPs ont été synthétisés à l'aide des monomères fonctionnels sélectionnés par modélisation, tout en étudiant différents ratios molaires, molécule cible/monomères fonctionnels /monomères réticulant. Cette première approche nous a permis de trouver un ratio optimal 1 /4/20, qui assure la formation des bonnes cavités au sein des supports obtenus.

Dans un second temps, les supports imprimés synthétisés suivant le ratio optimal, ont été utilisé pour étudier les effets de plusieurs paramètres (effet du solvant, effet du volume, les solutions de lavage et les solutions d'élution). Les études réalisées montrent que les insecticides organophosphorés ont une rétention plus forte dans les solvants apolaires que dans les solvants polaires. De même les grands volumes des solvants apolaires n'entraînent

Chapitre V

aucune diminution sur la rétention de ces insecticides. Les solutions hexane/20% dichlorométhane, hexane/15% dichlorométhane, dichlorométhane, et dichloromethane/5% acétonitrile, sont des solutions de lavages optimales pour les insecticides méthidathion, diméthoate, malathion, et fenthion respectivement. Le méthanol/2% TFA est la solution d'élution pour toutes les insecticides étudiés. L'application du protocole optimisé sur les solutions aqueuses a été réalisée et l'étude de quelques paramètres a été étudiée comme l'effet du pH et de la force ionique.

CHAPITRE VI

**APPLICATION DES POLYMERES A
EMPREINTES MOLECULAIRES AU
« CLEAN-UP » D'UN ECHANTILLON
NATUREL ET DETECTION PAR HPLC-UV
ET BIOCAPTEUR ENZYMATIQUE : CAS DE
L'HUILE D'OLIVE DOPEE PAR DES
INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORES**

I .Introduction

L'analyse de produits phytosanitaires présents dans les échantillons complexes comme l'huile de l'olive, nécessite des méthodes de séparation et de détection performantes ainsi qu'une étape préalable de traitement de l'échantillon afin de préconcentrer l'analyte et de purifier la matrice. La méthode de choix reste l'extraction solide-liquide (SPE), mais l'utilisation des supports conventionnels d'extraction met en jeu une rétention basée sur des interactions hydrophobes ce qui conduit fréquemment à la coextraction de composés de polarité similaire. Un apport en sélectivité au niveau de l'extraction peut être obtenu par des supports d'immunoaffinité basés sur l'utilisation d'anticorps spécifiques de l'analyte recherché greffés sur un support solide (immunoadsorbants). Cependant, le coût et le temps nécessaires à la production d'anticorps ont récemment conduit à l'émergence d'une technique alternative basée sur la synthèse de polymères hautement réticulés possédant des cavités spécifiques d'une molécule modèle. Ces polymères à empreintes moléculaires (MIPs) possèdent des propriétés comparables à celles d'anticorps en termes de sélectivité avec, en plus, l'avantage d'un coût de développement réduit et d'une plus grande stabilité thermique et chimique. Le mécanisme de rétention mis en jeu lors de l'étape d'extraction repose, comme pour les immunoadsorbants, sur un mécanisme de reconnaissance moléculaire. Les interactions mises en jeu lors de la reconnaissance sont souvent des interactions non covalentes de type liaisons hydrogène, $\pi-\pi$ ou électrostatiques.

Le but de ce chapitre est d'appliquer le protocole d'extraction solide-liquide (SPE) précédemment optimisé, en utilisant les polymères à empreintes moléculaires comme adsorbant pour l'extraction sélective des insecticides organophosphorées à partir d'huile d'olive. L'efficacité de cette méthode est validée par une comparaison avec l'extraction en utilisant les méthodes conventionnelles (cartouches C₁₈). Une préconcentration de volumes plus élevés d'huile, est également réalisée, puis l'analyse des insecticides dans les fractions

Chapitre VI

d'élutions est effectuée, en utilisant deux méthodes de détection : HPLC-UV et biocapteur enzymatique.

II. Partie expérimentale

II. 1. Les MIPs utilisés

Les polymères utilisés dans ce chapitre (*Tableau VI.1*) sont synthétisés suivant les conditions optimales, optimisées dans le chapitre précédent.

Tableau VI . 1: Polymères MIPs utilisés

Molécules à extraire	Polymère utilisé
Méthidathion, Méthidathion-oxon	MIP : Méthidathion-MBAA
Diméthoate, Ométhoate	MIP : Ométhoate-IA
Malathion, Malaoxon	MIP : Malaoxon-MBAA
Fenthion	MIP : Fenthion -Acrylamide

II.2. Méthodes de préparation des échantillons

II. 2.1. Extraction solide-liquide sur cartouches MIPs

L'huile d'olive extra vierge est dopée avec des concentrations connues en insecticides organophosphorés, puis l'échantillon préparé est chauffé à 45 °C pendant 30 min pour augmenter sa capacité d'écoulement, agité pendant quelques minutes pour bien être homogénéisé; puis 1mL de d'huile dopée est dilué dans 10mL d'hexane (*Figure VI.1*). Les solutions obtenues sont ensuite percolées à travers les cartouches MIP et NIP. Les interférents présents dans l'huile d'olive sont éliminés en utilisant des solutions de lavage optimisées précédemment, puis les insecticides retenus sont élués avec 1mL méthanol/2% TFA (*Tableau*

Chapitre VI

VI.2). Les solutions d'élution sont évaporées à sec, reprises dans 1 mL de la phase mobile et enfin analysées par HPLC-UV.

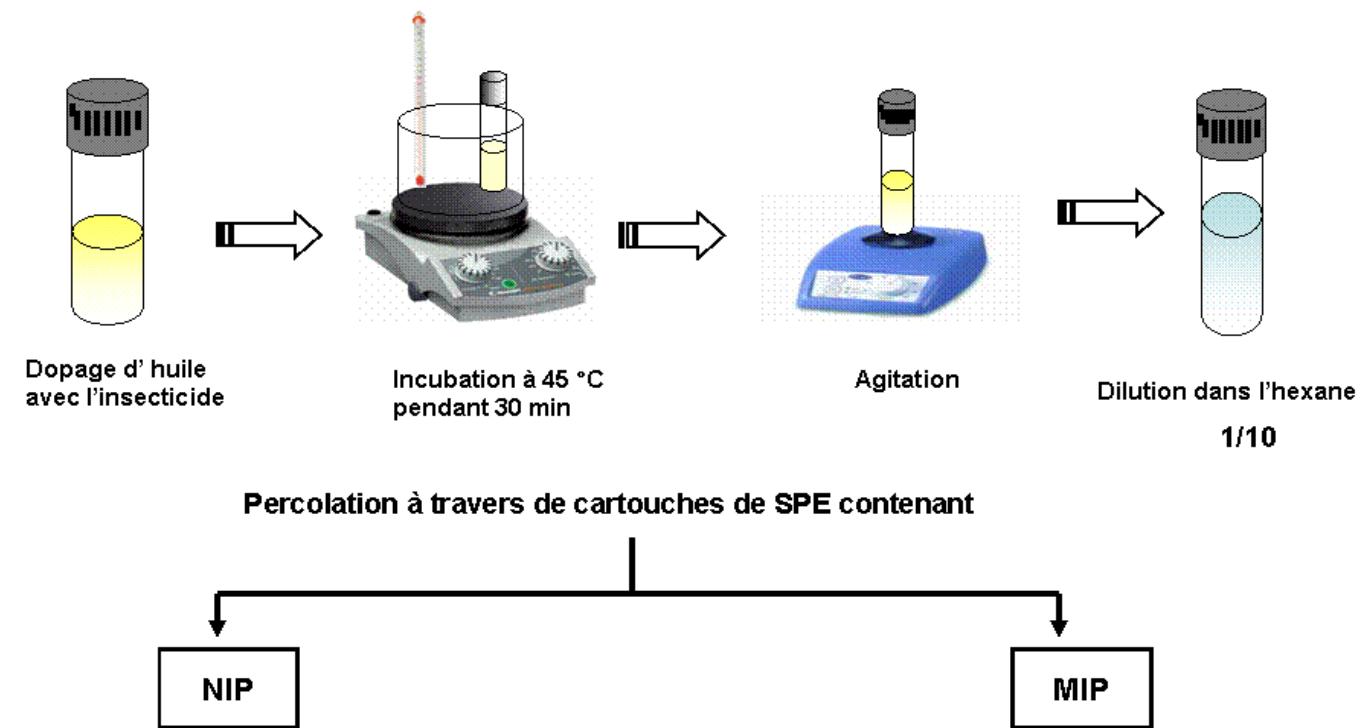


Figure VI. 1 : Protocole de préparation des échantillons d'huile d'olive

Tableau VI. 2 : Protocoles d'extraction utilisés

Polymères	Conditionnement	Solution de lavage	Solution d'élution
Methidathion-MBAA	5mL hexane	2mL hexane /20% DCM	1mL méthanol/2% TFA
Omthaote-IA	5mL hexane	2mL hexane /15% DCM	1mL méthanol/2% TFA
Malaoxon-MBAA	5mL hexane	2mL DCM	1mL méthanol/2% TFA
Fenthion-Acrylamide	5mL hexane	2mL DCM /5% ACN	1mL méthanol/2% TFA

Chapitre VI

II. 2.2. Extraction solide-liquide sur cartouche C₁₈

L'extraction sur les cartouches C₁₈ est réalisée en deux étapes :

II. 2.2.1.Extraction liquide-liquide

Avant l'extraction, les échantillons sont équilibrés à la température ambiante durant 2h afin de faciliter la séparation. 1mL d'huile d'olive dopée avec l'insecticide, est transféré dans une ampoule à décanter, puis 25 mL d'acétonitrile sont ajoutés. L'ampoule est agitée vigoureusement durant au minimum 2min, avant d'être mise au congélateur en position horizontale à une température inférieure à 18° durant au minimum 3h. La solution est récupérée dans un ballon de façon à ce qu'il n'y ait pas un entraînement de la phase lipidique puis le continu du ballon est évaporé jusqu'à 3mL environ à l'évaporateur rotatif.

II. 2.2.2. Purification sur colonnes C₁₈

Les cartouches C₁₈ sont conditionnées à faible pression par 12 mL de méthanol et 12 mL d'acétonitrile, puis 3mL de la solution à purifier sont introduits en tête de la cartouche. Les molécules retenues sont élues par 1,5 ml de méthanol et la solution d'élution est évaporée à sec, reprise dans 1mL de la phase mobile acétonitrile/eau (50 %/ 50%, v/v), avant analyse par HPLC-UV.

II. 3. Détection ampérométrique des insecticides organophosphorés

L'activité de l'enzyme immobilisée ainsi que les mesures d'inhibition sont réalisées par des mesures ampérométriques en solution agitée. L'électrode est immergée dans une cellule de réaction contenant 10 mL de tampon phosphate à pH 7 ; le milieu réactionnel est agité à l'aide d'un agitateur magnétique. L'électrode est connectée à un potentiostat qui permet d'appliquer une différence de potentiel de +100 mV vs Ag/AgCl entre l'électrode de

Chapitre VI

référence et l'électrode de travail. Ce potentiel permet l'oxydation du médiateur choisi dans cette étude : le cobalt-phtalocyanine, suivant les réactions représentées sur *la figure VI.2.*

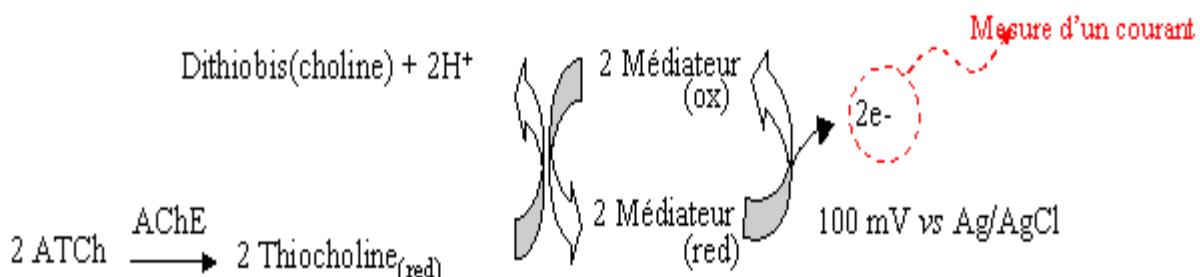


Figure VI. 2 : Détection ampérométrique de la thiocholine

Le dispositif de mesure électrochimique de l'activité de l'AChE est le suivant :

L'électrode est placée dans la cellule de réaction (à 30°C) et le potentiel est appliqué. Un courant correspondant notamment au courant capacitif est enregistré. Quand ce courant est stabilisé et que la ligne de base est atteinte, la réaction est initiée par l'ajout du substrat ATCh-Cl dans la cellule de réaction. Le courant augmente jusqu'à atteindre un palier qui correspond à l'état stationnaire ; la variation du courant étant proportionnelle à la concentration en substrat. La concentration saturante en substrat est déterminée par des injections successives de concentrations connues d'ATCh-Cl jusqu'à saturation du capteur enzymatique.

Afin de vérifier la stabilité du capteur, des injections consécutives de substrat en concentration saturante sont alors réalisées ; la cellule étant rincée entre chaque mesure. Ces essais permettent de déterminer la réponse initiale I_0 du capteur.

Les mesures d'inhibition ont été réalisées après incubation du biocapteur dans une solution de pesticide de concentration connue pendant 10 min. La réponse finale I_f est mesurée en présence de la même concentration saturante de substrat, ainsi la diminution de la

Chapitre VI

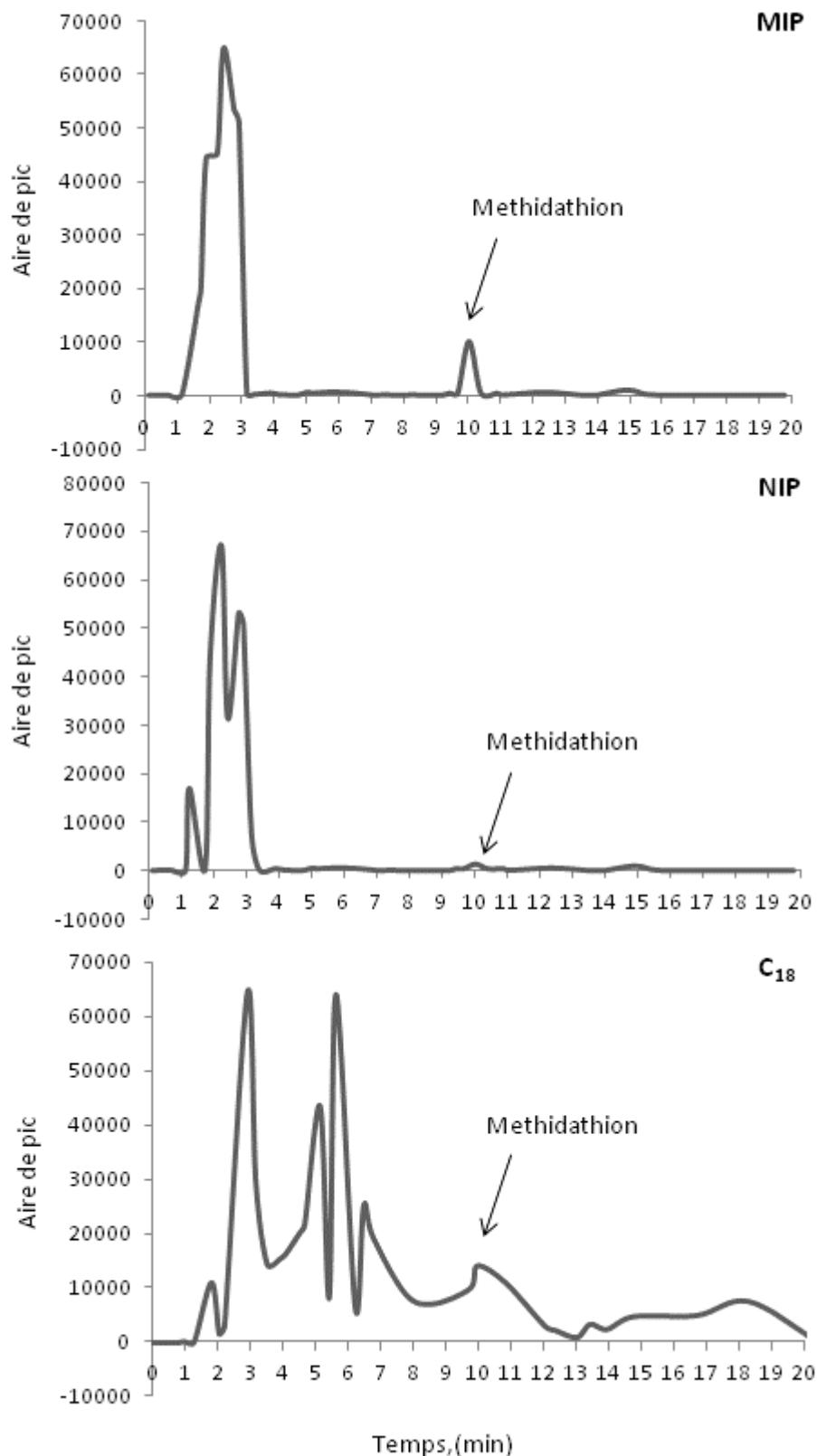
réponse du capteur est due à l'inhibition partielle ou totale de l'enzyme par l'inhibiteur. Le taux d'inhibition est calculé selon la formule :

$$I \% = \frac{I_0 - I_f}{I_0} * 100 \quad (\text{Eq 18})$$

III. Résultats et discussion

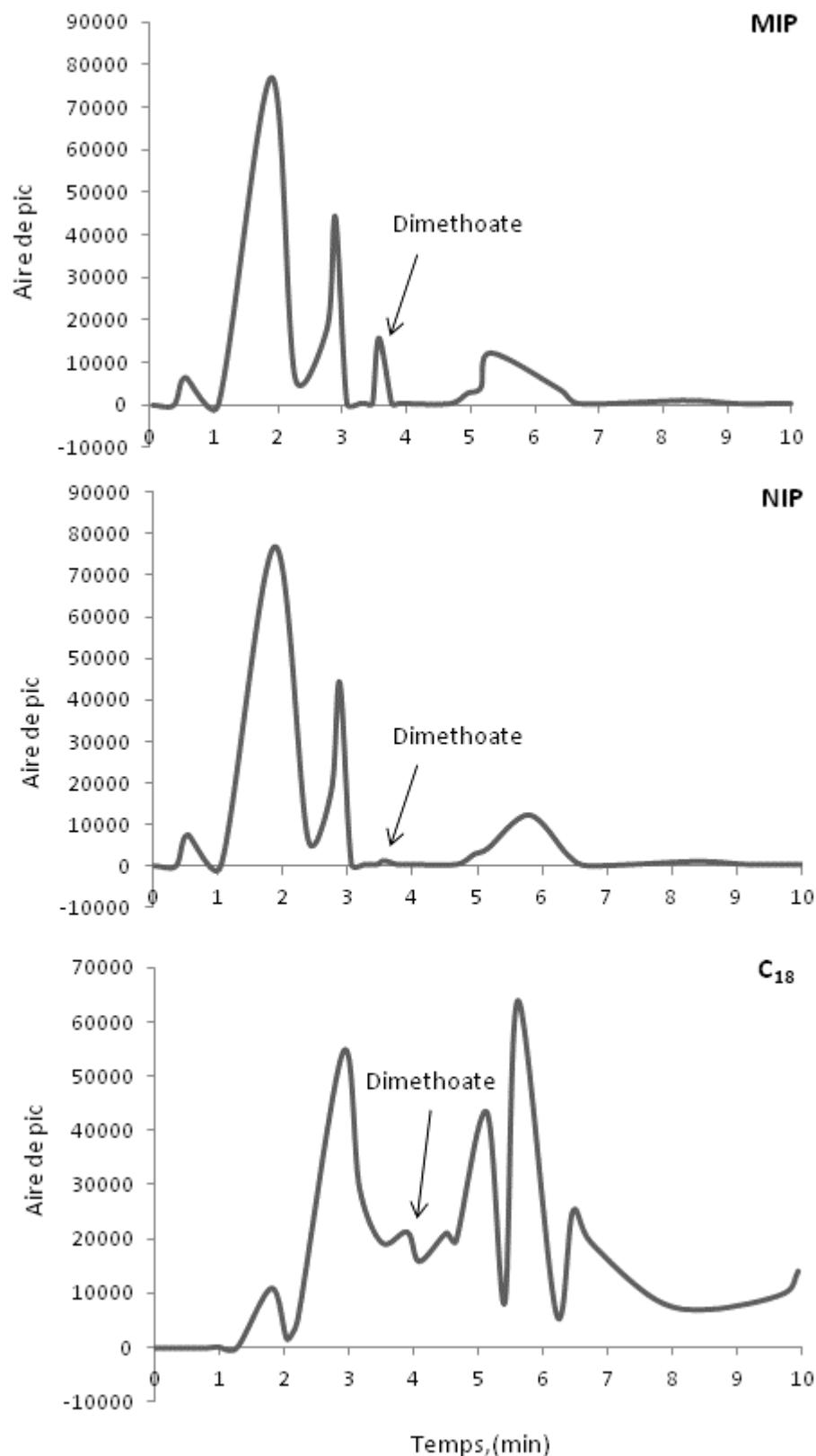
III. 1. Extraction des insecticides organophosphorés à partir d'huile olive

L'application de la méthode d'extraction par MIPs associée à la détection par HPLC-UV, est évaluée pour les échantillons d'huile d'olive. Avant de faire l'extraction des échantillons dopés, un échantillon blanc est analysé afin de confirmer l'absence de ces insecticides dans l'huile. 1mL d'huile dopé avec 1 μ g d'un insecticide est dilué au 1/10 dans de l'hexane. La solution obtenue est percolée à travers les cartouches de MIPs après une étape de conditionnement avec 5ml d'hexane. Après la percolation, les cartouches sont lavées puis les molécules adsorbées sont élues, suivant les protocoles décrits dans le *tableau II*. Une extraction sur les NIPs est également réalisée dans des conditions similaires comme expérience de contrôle. Les résultats de l'analyse des solutions d'élution sont montrés dans la *figure VI.3 (Figures MIP et NIP)*.

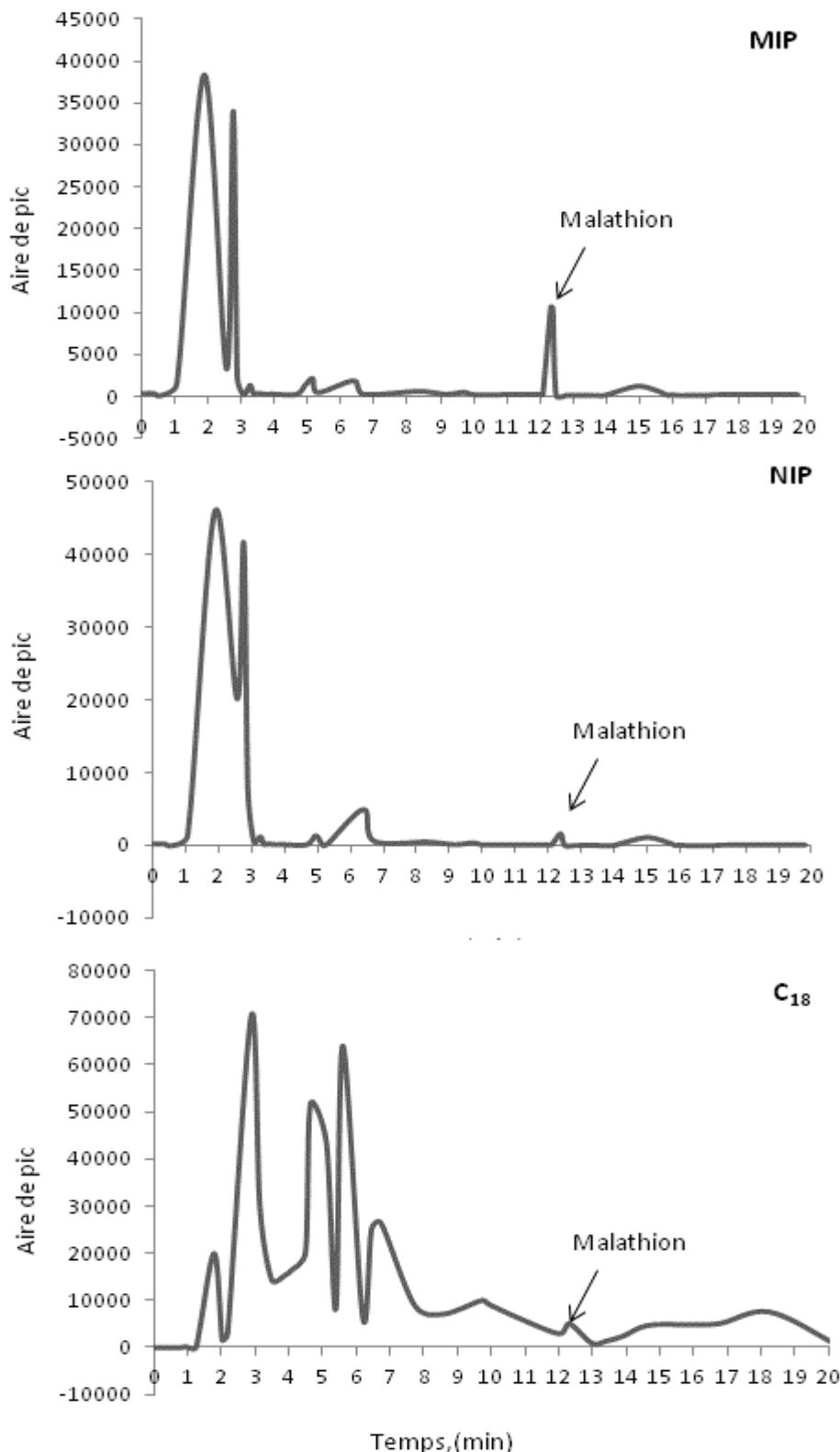


Chromatogrammes du méthidathion

Chapitre VI

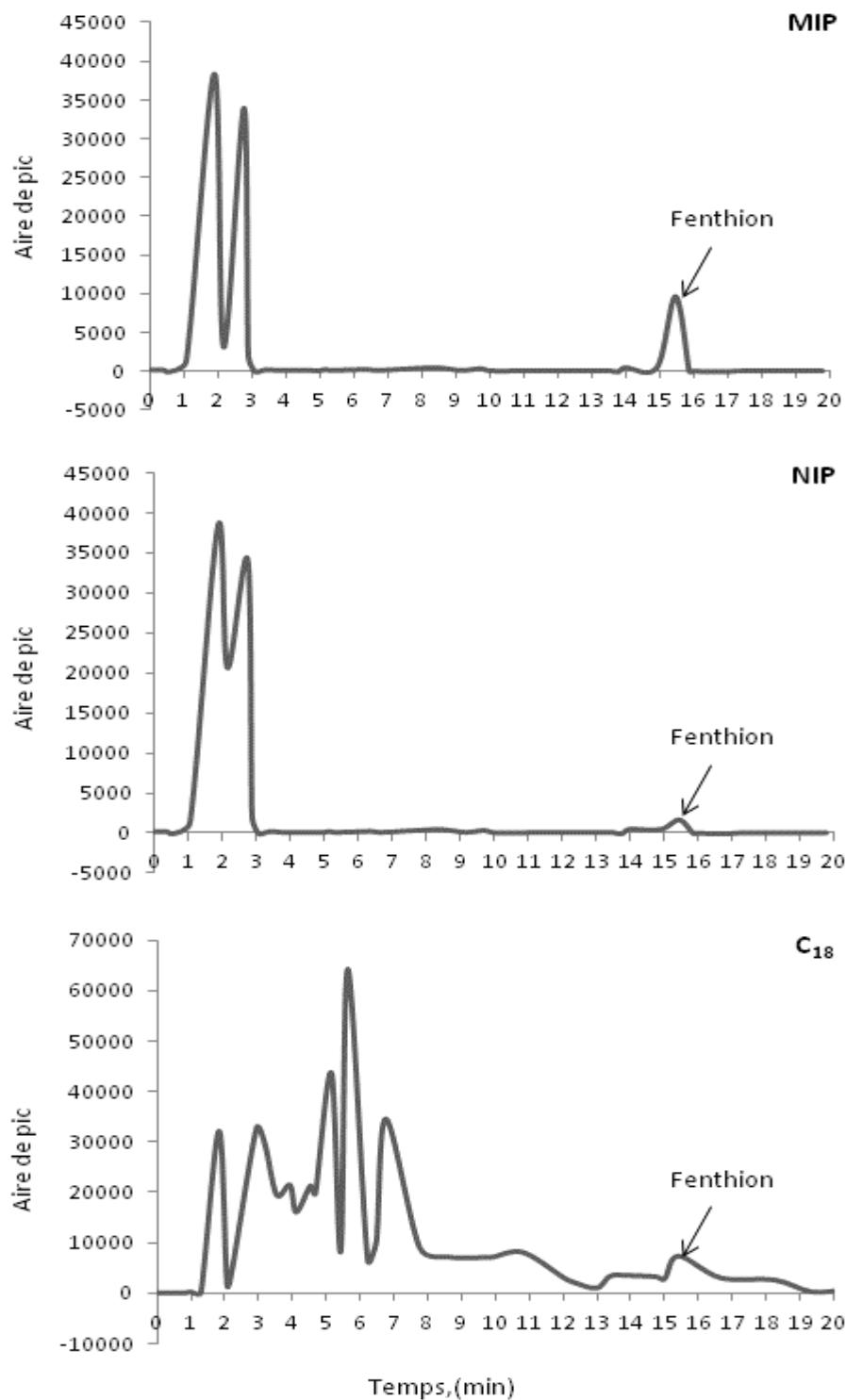


Chromatogrammes du diméthoate



Chromatogrammes du malathion

Chapitre VI



Chromatogrammes du fenthion

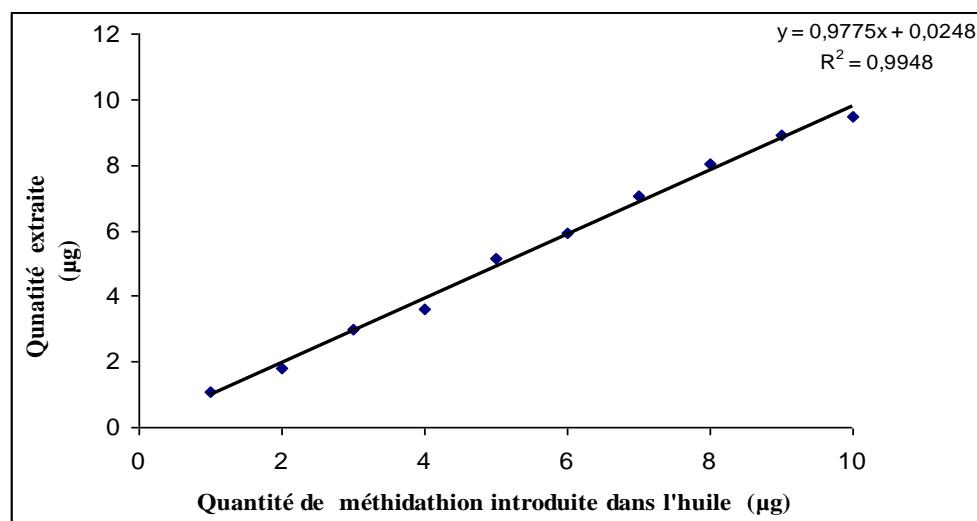
Figure VI. 3 : Chromatogrammes des solution d' élation d'insecticides (méthidathion, diméthoate, malathion, fenthion) après l'extraction de 1mL d'huile d'olive à travers les MIPs, NIPs et la silice C_{18} . Conditions chromatographiques en Annexe V

Chapitre VI

Dans tous les cas, les résultats obtenus montrent que l'extraction d'insecticides organophosphorés en utilisant les NIPs donne des rendements d'extraction faibles (<5%) des différents insecticides. Ces résultats indiquent que la majorité des insecticides, sont lavés avec les composants de la matrice pendant l'étape de lavage. Les chromatogrammes de l'analyse des fractions d'élution après l'extraction d'huile d'olive dopée sur des MIPs sont également illustrés dans la figure. Ces chromatogrammes montrent que tous les insecticides sont retenus par leurs MIPs correspondants, et ensuite ils sont tous décrochés au cours de l'étape d'élution et que l'étape de lavage n'entraîne aucune désorption des molécules.

III. 2. Validation de la méthode

Dans le but de valider la méthode d'extraction développée, des échantillons d'huile d'olive sont dopés avec des concentrations de 1 à 10 μ g des insecticides organophosphorés, puis les échantillons sont dilués dans l'hexane, et les solutions obtenues sont extraites sur cartouches (MIPs). Les résultats obtenus sont représentés dans *la figure VI.4.*



Chapitre VI

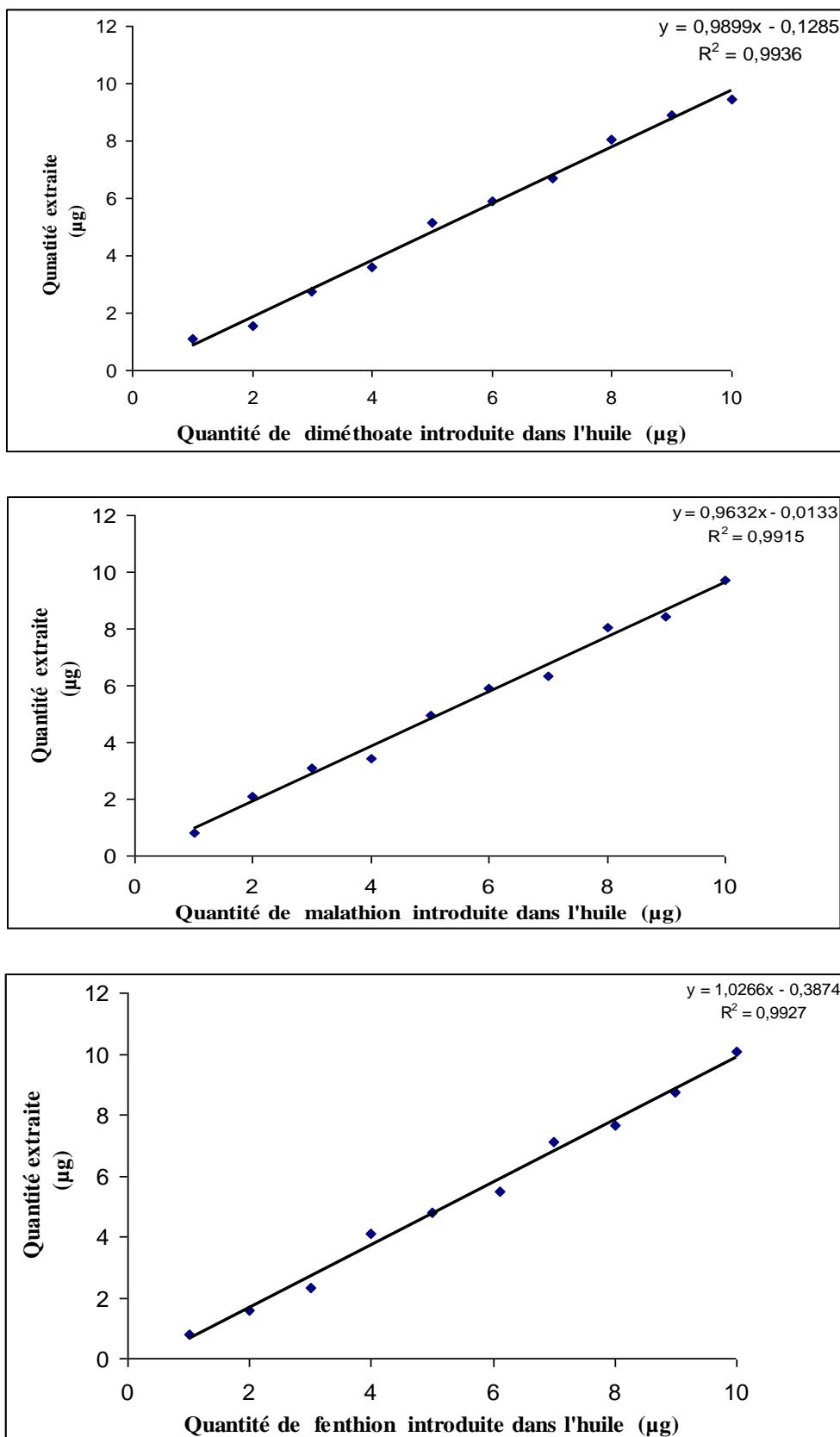


Figure VI. 4 : Courbes représentant les quantités d'insecticides extraites par MIPs, en fonction des quantités introduites dans huile d'olive.

Chapitre VI

Les résultats de ces courbes montrent que les quantités des insecticides extraites par MIPs augmentent au fur et à mesure que les quantité introduites dans les échantillons augmentent, suivant des droites linéaires avec des coefficients de corrélation $R^2 = 0,9948$, 0,9936 , 0,9915 et 0,9927 pour les insecticides méthidathion diméthoate, malathion et fenthion respectivement. Pour l'extraction des insecticides ométhoate, malaoxon et methidathion-oxon (formes oxon du diméthoate, du malathion et du méthidathion) les mêmes résultats que leurs formes de base sont obtenus avec des coefficients de corrélations égaux à 0,9958, 0,9972 et 0,9905 respectivement.

III. 3. Les limites de détection et limites de quantification

Les limites de détection et celles de la quantification sont déterminées par dopage de l'huile d'olive avec des concentrations variant de 0 jusqu'à 1 mg/L. Les échantillons sont pré-concentrés avec des cartouches de MIPs puis les solutions d'élution sont évaporées à sec et reprises dans 0,5 ml de la phase mobile (acétonitrile /Eau, 50/50) et analysées par HPLC-UV. Les résultats obtenus sont représentés dans le *tableau VI.3*.

Chapitre VI

Tableau VI. 3 : Limites de détection et de quantifications des insecticides organophosphorés étudiés.

Insecticides	Gamme linéaire (mg/L)	Coefficient de corrélations (R^2)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	LMRs (mg/L)
Méthidathion	0-1	0,9990	0,02	0,14	1
Diméthoate	0-1	0,9912	0,012	0,064	2
Malathion	0-1	0,9974	0,03	0,14	0,5
Fenthion	0-1	0,988	0,005	0,023	1
Omethoate	0-1	0,9946	0,1	0,56	2
Malaoxon	0-1	0,9905	0,08	0,36	0,5
Methidathion-oxon	0-1	0,9963	0,06	0,38	1

Les limites de détection obtenues sont égales à 0,02 ; 0,012 ; 0,03 et 0,005 mg /L, et les limites de quantification sont égales à 0,14 ; 0,064 ; 0,14 et 0,023 mg /L pour les insecticides méthidathion, diméthoate, malathion et fenthion respectivement. Ces résultats montrent que tous les limites de détection obtenues sont inférieures aux MLRs des insecticides utilisés et elles sont presque égales à celles obtenues par *Giacomo Dugo* en utilisant la détection par chromatographie en phase gazeuse GC-FPD qui sont égales à 0,01 ; 0,015 ; 0,029 ; 0,003 pour le méthidathion, le diméthoate, le malathion et le fenthion respectivement [236]. Cette comparaison valide l'efficacité de la méthode en plus de sa forte sélectivité. Pour les formes oxon, ométhoate, maloxon, et methidathion-oxon leurs limite de détection sont supérieures à celles de leurs formes de base diméthoate, malathion et méthidathion, ce qui montre que ces métabolites sont moins détectable par HPLC-UV.

III. 4. Comparaison avec les méthodes conventionnelles utilisant les cartouches C₁₈

En tenant compte des résultats précédents, et afin de comparer les performances des cartouches MIPs avec celles des cartouches commerciales, différentes extractions des échantillons d'huile d'olive sont évaluées. 1mL d'huile dopé avec 1µg d'un insecticide, est

Chapitre VI

soumis à une extraction liquid-liquide en utilisant l'acétonitrile, puis les solutions d'extraction sont purifiées sur les cartouches de silice C₁₈ suivant le protocole décrit dans la partie II. *La figure VI.3* présente les chromatogrammes de l'analyse des solutions d'élution obtenus après l'extraction des insecticides à partir huile d'olive par MIPs et par C₁₈.

L'analyse de ces chromatogrammes montre une différence entre l'extraction par MIPs et par C₁₈ au niveau du taux de récupération. Les insecticides organophosphorés sont très bien récupérés avec les MIPs (>96 %) mais faiblement avec les cartouches de silice C₁₈. Les performances du MIP en terme de sélectivité sont également démontrées. Les pics des insecticides obtenus par l'extraction sur les MIPs sont bien apparents et isolés de ceux des interférents qui sont présents en faible quantité grâce à l'étape de lavage, tandis que les pics obtenus en utilisant les cartouches C₁₈, sont en grande partie recouverts par les interférents de polarité similaires ce qui rend le signal peu visible. Ces résultats confirment l'intérêt des MIPs pour le traitement des matrices complexes.

III. 5. Effet de la matrice

Dans le but de déterminer l'effet de la matrice sur la rétention des insecticides sur leurs MIPs, différentes extractions sont réalisées. Des échantillons d'huile d'olive dopés avec 1 µg d'un insecticide, sont utilisés pour préparer des solutions de 10 mL composées d'un mélange huile d'olive/hexane, tout en variant le pourcentage d'huile dans la solution de 10 à 60 %. Les solutions obtenues sont percolées à travers les cartouches MIPs, lavées avec des solutions de lavage optimisées puis les molécules retenues sont élues par du méthanol acidifié. Les résultats obtenus montrent que le protocole optimisé pour 10% n'est pas performant pour éliminer les interférents dans le cas des pourcentages élevés en huile (*Figure VI.5 A* : exemple pour le méthidathion). Une étape de pré-lavage avec de l'hexane seul suivie par un lavage avec la solution optimisée pour 10% permet d'avoir un pic bien apparent et isolé

Chapitre VI

(Figure VI.5 B : exemple pour le méthidathion). Pour toutes les autres extractions un pré-lavage avec l'hexane est nécessaire. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau VI.4.

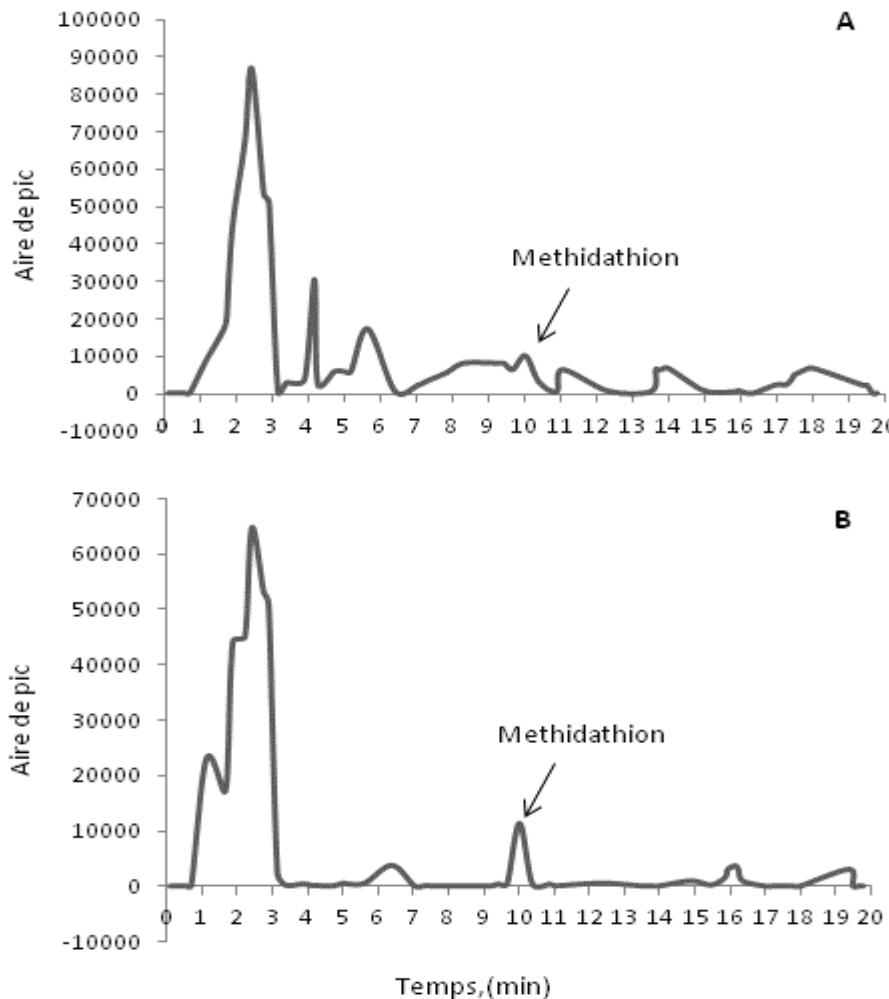


Figure VI. 5: Chromatogrammes des solutions d'élution après l'extraction de méthidathion à partir de 10mL hexane/20%huile d'olive par MIP.

A : après lavage avec 2mL (hexane/20%DCM),
B : après lavage avec 3mL hexane seul suivi par 2mL (hexane/20%DCM)

Chapitre VI

Tableau VI.4: Rétention des insecticides sur les MIPs après l'extraction à partir des solutions contenant différents pourcentages d'huile d'olive. (**n= 3**)

% huile dans l'hexane	Insecticides	Lavage	Rétention (%)
10 %	Méthidathion	2ml hexane /20%DCM	97± 3,4
	Diméthoate	2ml hexane /15%DCM	98± 2,5
	Malathion	2ml DCM	97± 3,5
	Fenthion	2ml DCM /5% ACN	98± 3,7
20 %	Méthidathion	1) 3ml hexane 2) 2ml hexane /20%DCM	96± 2,9
	Diméthoate	1) 3ml hexane 2) 2ml hexane /15%DCM	98± 4,4
	Malathion	1) 3ml hexane 2) 2ml DCM	95± 3,2
	Fenthion	1) 3ml hexane 2) 2ml DCM /5% ACN	97± 2,4
30%	Méthidathion	1) 7ml hexane 2) 2ml hexane /20%DCM	92± 4,3
	Diméthoate	1) 7ml hexane 2) 2ml hexane /15%DCM	93± 5,4
	Malathion	1) 7ml hexane 2) 2ml DCM	90± 4,1
	Fenthion	1) 7ml hexane 2) 2ml DCM /5% ACN	96± 3,6
40%	Méthidathion	1) 12ml hexane 2) 2ml hexane /20%DCM	85± 3,3
	Diméthoate	1) 12ml hexane 2) 2ml hexane /15%DCM	87± 3,2
	Malathion	1) 12ml hexane 2) 2ml DCM	83± 2,7
	Fenthion	1) 12ml hexane 2) 2ml DCM /5% ACN	94± 3,4
50%	Méthidathion	1) 16ml hexane 2) 2ml hexane /20%DCM	80± 4,5
	Diméthoate	1) 16ml hexane 2) 2ml hexane /15%DCM	79± 5,7
	Malathion	1) 16ml hexane 2) 2ml DCM	81± 5,1
	Fenthion	1) 16ml hexane 2) 2ml DCM /5% ACN	90± 4,8
60%	Méthidathion	1) 20ml hexane 2) 2ml hexane /20%DCM	72± 5,6
	Diméthoate	1) 20ml hexane 2) 2ml hexane /15%DCM	66± 5,7
	Malathion	1) 20ml hexane 2) 2ml DCM	68± 4,8
	Fenthion	1) 20ml hexane 2) 2ml DCM /5% ACN	84± 6,1

Chapitre VI

Les résultats de *tableau VI.4* montrent, d'une part, que la solution d'hexane de pré-lavage augmente avec le pourcentage d'huile dans la solution à percoler. Cette étape permet de diminuer la charge des composants de l'huile sur les polymères, et facilite l'étape de lavage. D'autre part, l'application des MIPs aux échantillons avec des quantités d'huile élevées induit une baisse des rendements d'extraction pour tous les insecticides organophosphorés utilisés. Le taux de rétention reste presque stable pour les pourcentages de 10% et 20% d'huile. Ce taux commence à diminuer graduellement pour les pourcentages compris entre 30 % d'huile jusqu'à 60 %, ce qui peut être du à la capacité d'écoulement faible de la solution, et à la charge importante de la surface des polymères par des composants interférents de la solution pour les grandes quantités en huile, ce qui abaisse l'accès des insecticides dans leurs cavités spécifiques. Ces résultats montrent que ces MIPs peuvent préconcentrer des insecticides, dans un volume de 10 mL avec 50% d'huile avec un taux de rétention supérieur ou égal à 80 %.

III. 6. Durée de vie des MIPs

Pour déterminer la possibilité de réutilisation des cartouches MIPs, différentes solutions de 10 mL huile d'olive / hexane (1/10) dopés avec 1 μ g d'un insecticide sont préparés, puis les cartouches SPE emballées avec 50 mg des MIPs sont soumis à plusieurs cycles de percolation et de régénération en utilisant ces solutions. Ces expériences montrent que les performances des polymères MIPs restent les mêmes, sans aucun dégradation, et que les MIPs peuvent être utilisés pour au moins 10 fois sans perdre de leur performances. La valeur moyenne des rétentions de ces polymères est de 98 % pour tous les insecticides utilisés. Dans toutes les mesures le RSD est au-dessous de 6%.

Chapitre VI

III. 6. Combinaison MIPs-biocapteur

Nous avons vu précédemment que les formes oxon (ométhoate, malaoxon et méthidathion-oxon) des insecticides organophosphorés (diméthoate, malathion et méthidathion) respectivement, ont une plus faible détection que leurs formes de base en analysant les solutions d'élution par HPLC-UV. Afin d'augmenter la détection de ces métabolites dans l'huile d'olive, nous avons choisi dans ce travail une approche qui combine l'extraction par un polymère à empreintes moléculaires avec la détection par biocapteur. Le biocapteur ampérométrique basé sur l'immobilisation de l'acétylcholinestérase par piégeage dans une matrice sol-gel a été choisi pour ce travail en raison de ses performances optimales pour le dosage des insecticides après extraction de l'huile d'olive. Ce biocapteur ampérométriques a été développé par Mademoiselle Najwa Ben Oujji [237] dans le cadre d'une thèse complémentaire, qui fait partie du même projet Volubilis.

Des tests de réponse du biocapteur ont été réalisés avec des échantillons issus de cette méthode d'extraction. Une comparaison entre les pourcentages d'inhibition obtenus avec les standards préparés dans du tampon pH 7 et des solutions issues de l'extraction par MIPs est présentée sur *la figure VI.6*.

Chapitre VI

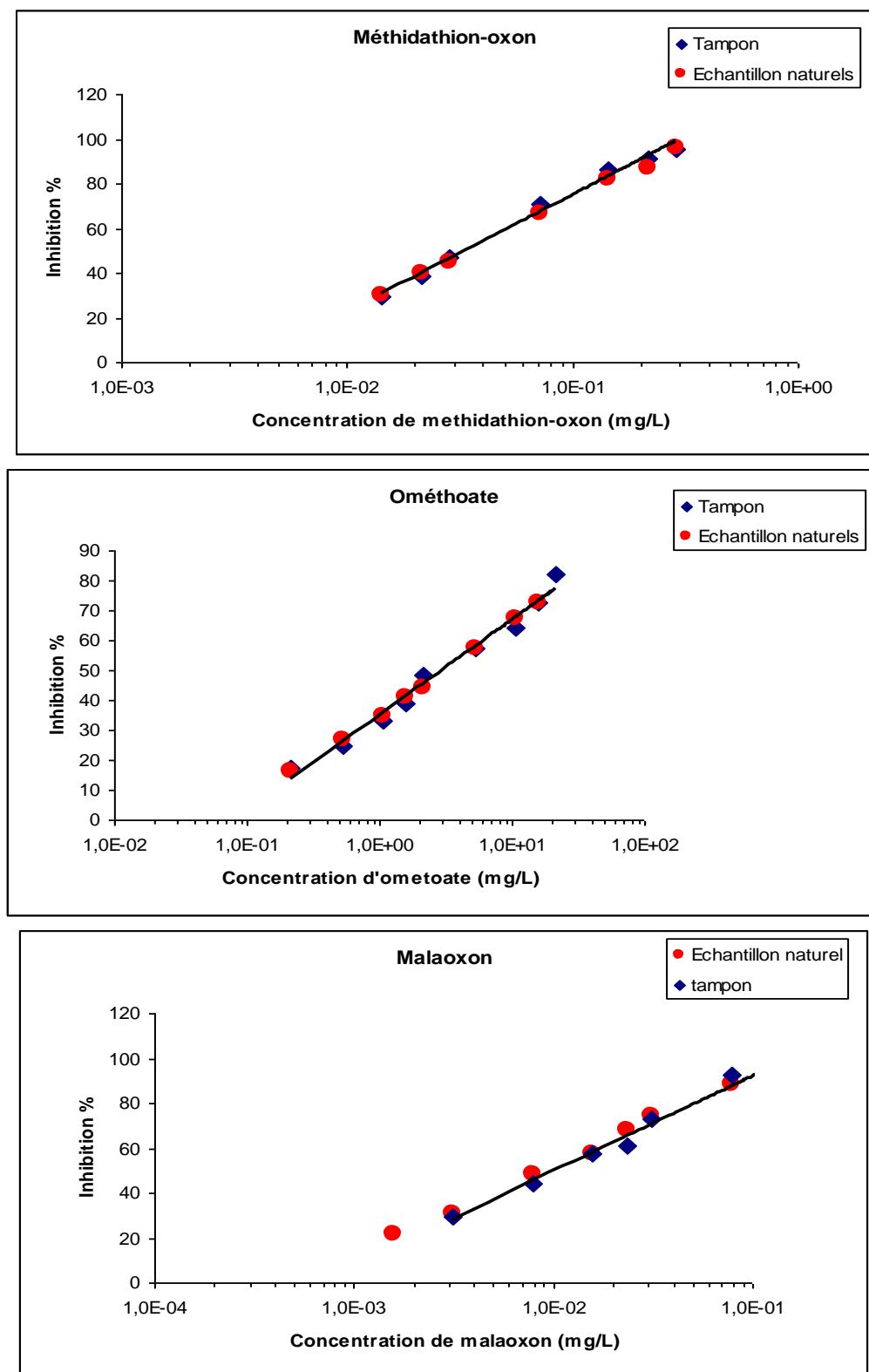


Figure VI. 6 : Essais de détection des trois insecticides (forme oxon) par un biocapteur ampérométrique à AChE immobilisée dans une matrice sol-gel [237] : comparaison de l'inhibition obtenue avec des solutions standard (tampon) et après extraction à partir d'huile d'olive par MIPs (échantillons naturel)

Chapitre VI

Les résultats obtenus montrent que les échantillons issus de l'extraction par MIPs d'huile d'olive dopée donnent des pourcentages d'inhibition identiques à ceux obtenus avec des solutions standard. Le taux de recouvrement de 100 % montre la très bonne performance du capteur ainsi que de la méthode d'extraction utilisée. Les limites de détection des insecticides forme oxon en utilisant cette méthode sont égales à 0,01 ; 0,005 ; 0,001 mg/L pour l'ométhoate, le méthidathion-oxon et le malaoxon respectivement.

Afin de mettre en évidence la sélectivité du système de dosage développé, différents tests sont réalisés à partir des trois insecticides utilisés seuls ou en mélange à des concentrations voisines de celles qui provoquent une inhibition de 50 %. Le protocole de dopage d'huile et d'extraction a été réalisé comme décrit dans la partie (II. 2.1.). Les molécules retenues sont élues, évaporées à sec puis reprises dans une solution tampon pH 7 pour être analysées par biocapteur ampérométrique. Les résultats obtenus sont présentés dans le *tableau VI.5*.

Tableau VI. 5 : Détection des insecticides par biocapteur après l'extraction par MIPs s partir de l'échantillon avec le mélange des trois insecticides, où à partir d'échantillon avec un seul insecticide

Polymère	Solution traitée	Inhibition %
MIP-malaoxon	Huile dopée par le malaoxon	57 %
	Huile dopée par le mélange	100 %
MIP-méthidathion oxon	Huile dopée par le méthidathion-oxon	66 %
	Huile dopée par le mélange	68 %
MIP-ométhoate	Huile dopée par l'ométhoate	58 %
	Huile dopée par le mélange	61 %

Les résultats du tableau montrent que pour le méthidathion-oxon et l'ométhoate, les pourcentages d'inhibition sont pratiquement similaires avec l'insecticide seul ou avec le

Chapitre VI

mélange des trois insecticides, ce qui montre que des systèmes de dosage sensibles et sélectifs soit pour l'ométhoate soit pour le methidathion-oxon ont été développés. En revanche le MIP synthétisé avec le malaoxon comme molécule empreinte, donne deux pourcentages d'inhibition différents : 57 % pour l'échantillon avec le malaoxon seul, et 100 % pour l'échantillon avec le mélange. Ce résultat ne peut être expliqué que par la rétention d'autres insecticides en plus du malaoxon, ce qui montre que le MIP-malaoxon n'est pas sélectif. Le système ne pourra être sélectif que si l'extraction se fait en trois étapes avec l'utilisation du MIP-malaoxon en dernier lieu. En effet, la solution finale issue de ces trois extractions ne contiendra que le malaoxon qui peut être facilement détecté par le biocapteur.

VI. Conclusion

Les résultats expérimentaux obtenus au cours de l'extraction d'une matrice complexe (huile d'olive) ont montré une grande spécificité des MIPs pour leurs molécules empreintes avec des rendements d'extractions importants. Le potentiel de ces polymères a été démontré par une comparaison avec des méthodes conventionnelles utilisant des cartouches C₁₈, au niveau de la capacité de rétention aussi bien qu'au niveau de la sélectivité. Bien que le pourcentage élevé en huile d'olive dans la solution traitée entraîne une diminution des pourcentages de retention, les MIPs synthétisés peuvent atteindre un rendement d'extraction d'au moins 80 % quand la quantité d'huile représente 50 % de la solution. En plus ces polymères peuvent être réutilisés au moins 10 fois sans aucune influence sur leurs performances. Le système de dosage développé (MIP-biocapteur) permet de détecter rapidement de faibles concentrations d'insecticides organophosphorés (forme oxon). Ce système présente une selectivité importante pour les molécules ométhoate et méthidathion-oxon.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Ce travail avait pour objectif principal le développement de polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction et la préconcentration sélective des insecticides organophosphorés utilisés dans le traitement des olives à savoir le méthidathion, le malathion, le diméthoate, le fenthion et leurs formes oxon. Dans un premier temps, nous avons élaboré une stratégie pour l'optimisation de la synthèse des polymères sélectifs, notamment sur le choix des monomères fonctionnels. Cela nécessitait un criblage virtuel des monomères par ordinateur en contact avec les molécules à récupérer (des insecticides dans notre cas), afin de sélectionner ceux ayant le plus d'affinité pour les molécules en question. Les tests réels ont confortés les données informatiques et ont aussi montré une sélectivité naturelle de certains polymères pour les insecticides.

Il est aussi apparu que les polymères non imprimés (NIPs) permettaient de déterminer l'efficacité d'un éventuel MIP puisque la rétention d'une molécule sur le polymère en milieu organique, qui est directement liée à la force de l'interaction entre le polymère et cette molécule, donne une bonne estimation de la rétention et de la sélectivité du polymère imprimé (MIP) pour cette molécule. La préparation des polymères non imprimés facilitait alors la décision quant au choix du monomère fonctionnalisé.

Le traitement mathématique des courbes d'adsorption selon le modèle de Freundlich a permis de caractériser l'hétérogénéité du MIP et du NIP et d'estimer le nombre apparent de sites en fonction de l'affinité de ces derniers pour la molécule cible. L'hétérogénéité en forme et en énergie des sites d'adsorption limite la capacité et la spécificité du MIP vis-à-vis de la molécule cible (et de ses analogues). La présence des empreintes sur le MIP a été autrement confirmée par la technique de la microscopie électronique à balayage. Lors de la synthèse de chaque MIP, les monomères sélectionnés par modélisation ont été utilisés pour la polymérisation et ils ont permis de créer des empreintes spécifiques à la molécule empreinte

Conclusion générale

par formation de liaisons comme les liaisons hydrogène. L'étude de la récupération des molécules cibles par la procédure d' extraction solide- liquide SPE en utilisant les MIPs nous a permis de déterminer les effets de plusieurs paramètres affectant la rétention des molécules dans leurs cavités spécifiques, à savoir la nature des solvants de percolation et les volumes de ces solvant. Le choix de l'hexane comme solvant de percolation a été justifié d'une part par le fait qu'il n'affecte pas la rétention même si on utilise des grands volumes, et d'autre part parce que ce solvant est miscible avec l'huile d'olive qui est notre échantillon naturel. Les résultats obtenus par les deux polymères MIPs et NIPs en préconcentrant les molécules cibles à partir de l'hexane, sont similaires ce qui nécessite une étape de lavage afin de différencier entre les deux polymères. Les solutions de lavages optimisées sont composées essentiellement des mélanges hexane/dichlorométhane. Ces solutions ont réussi à éliminer les interactions non spécifiques, ce qui fait diminuer notablement la rétention sur le NIP tout en maintenant celle sur le MIP. Les résultats concernant la sélectivité des polymères montrent que les MIPs synthétisés sont très sélectifs pour leurs molécules cibles sauf le MIP, maloxon-MBAA qui peut retenir en plus de sa molécule empreinte d'autres molécules de structures similaires. Les polymères MIP-diméthoate et MIP-malathion sont remplacés dans la suite de travail par ceux de leurs formes oxon MIP-ométhoate et MIP-malaoxon respectivement comme ces derniers peuvent retenir fortement les deux molécules.

L'application du protocole d'extraction optimisé sur les solutions aqueuses a démontré que les MIPs synthétisés peuvent extraire les molécules cibles jusqu' à un volume de 50 mL sans aucune influence sur la capacité de rétention des polymères, mais cette capacité dépend fortement du pH de la solution. Les meilleurs rendements d'extraction sont obtenus avec les solutions de pH entre 7 et 8. L'étude de l'effet de la force ionique a montré que l'ajout de NaNO₃ dans la solution diminue fortement la rétention des insecticides. Ce résultat est dû à une compétition d'adsorption avec les ions nitrate.

Conclusion générale

Les supports imprimés développés au cours de ce travail sont finalement appliqués à l'extraction solide-liquide des insecticides organophosphorés méthidathion, diméthoate, malathion, fenthion et leurs métabolites ométhoate, malaoxon et méthidathion-oxon à partir d'huile d'olive. Les résultats expérimentaux obtenus indiquent que les MIPs ont montré une grande spécificité pour leurs molécules empreintes ainsi que pour les métabolites présents dans la matrice complexe (rendement >96 %). Les performances de cette méthode ont été validées par comparaison avec des cartouches conventionnelles C₁₈. Les résultats de cette comparaison indiquent d'une part que les quantités extraites en utilisant les MIPs sont plus importantes que celles avec les cartouches C₁₈ et que d'autre part, les composés interférents sont co-élués avec les insecticides sur le chromatogramme issu du traitement par les cartouches C₁₈. Ces composés perturbent donc la quantification des insecticides et pourrait être à l'origine de la faible quantité obtenue par cette méthode de traitement. Pour le chromatogramme issu du traitement par les MIPs, aucune co-élution n'est observée grâce à la purification apportée par la sélectivité de ces polymères.

La technique est apparue très sensible et permettait de détecter les insecticides analysés à des concentrations inférieures aux limites autorisées.

L'effet de la matrice sur la rétention des insecticides par les MIPs a été étudié, et les résultats ont montré que l'augmentation de la quantité d'huile dans l'hexane diminue cette rétention. Malgré ceci, les MIPs gardent leurs performances comme ils permettent l'extraction de presque 80% d'insecticides contenu dans une solution de 10mL d'hexane à 50 % d'huile d'olive.

Finalement, nous avons utilisé un système de dosage qui permet la détection des molécules ométhoate, malaoxon et méthidathion-oxon. La méthode consistait en un couplage d'une extraction sélective sur des cartouches des polymères imprimés (MIPs) autours de ces molécules, et d'une analyse par un biocapteur ampérométrique. Toutefois elle a rapidement

Conclusion générale

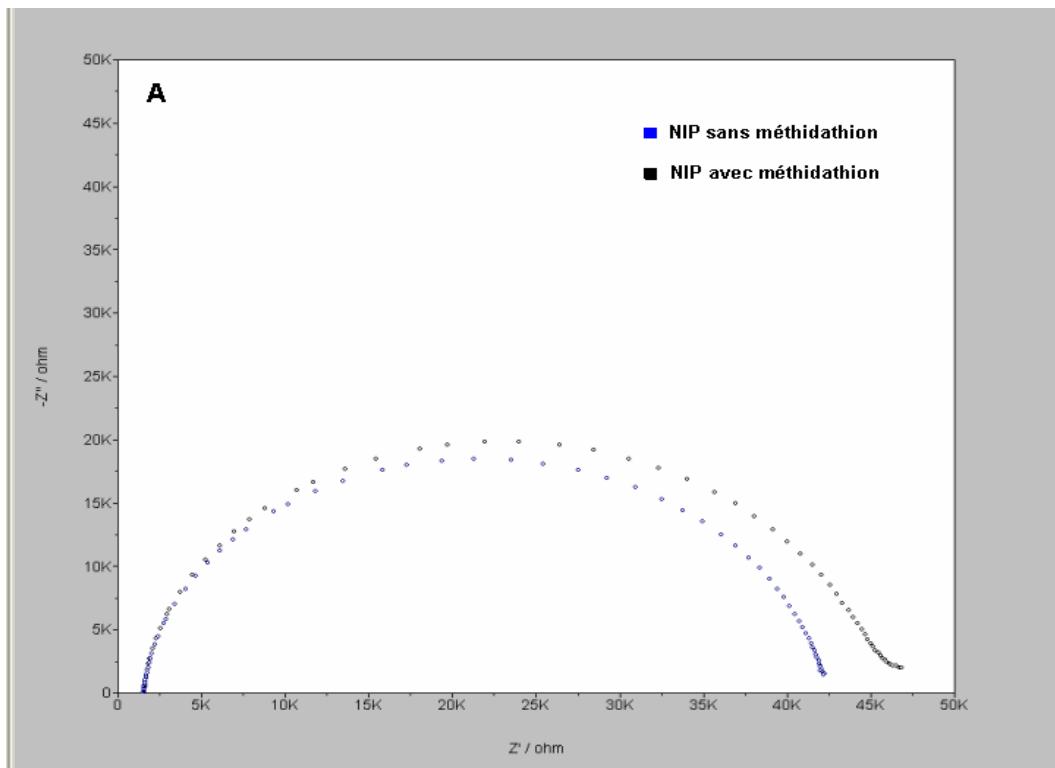
montré des limites de détection importantes par rapport à celles obtenues en utilisant la détection par HPLC-UV. Cependant il s'agit d'une méthode très bon marché pouvant servir sur le terrain pour l'analyse directe des insecticides dans les échantillons contaminés, et ainsi de savoir si l'échantillon est pollué ou non, en vue d'un examen plus poussé en laboratoire.

PERSPECTIVE

PERSPECTIVE

Suite à la grande sélectivité des polymères à empreintes moléculaires synthétisés, l'utilisation des ces matériaux pour le développement d'outils analytiques permettant des analyses rapides sur le terrain, est envisageable. Pour ceci, notre futur travail va se focaliser sur l'immobilisation des MIPs sur des électrodes, puis les composés retenus seront détectés automatiquement par une méthode electrochimique basée sur la détection impédancemétrique. Des essais préliminaires ont été réalisés par immobilisation des MIPs par voie sol-gel, Les mesures electrochimiques ont été exécutées avec un potentiostat/galvanostat AUTOLAB PGSTAT100 équipé d'un système d'analyseur de réponse de fréquence (Eco Chimie, les Pays-Bas) contrôlé par deux logiciels d'Autolab : Analyseur de Réponse de fréquence (4.9) pour impédance et un système Général Électrochimique (4.9) pour la voltammetrie [238]. Des résultats prometteurs sont obtenus (*Figure VII.1*)

Ces résultats montrent une adsorption plus importante du méthidathion par l'électrode modifiée par le MIP par rapport à celle possédant le NIP.



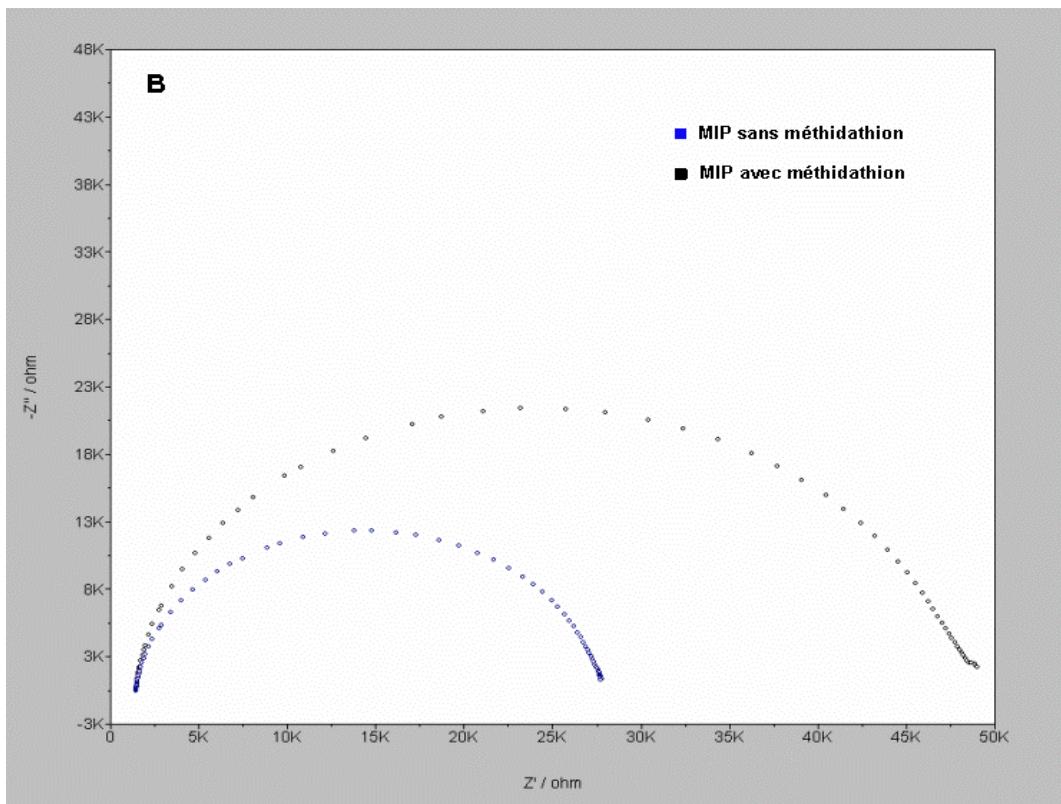


Figure VII. 1: Courbes de Nyquist de 1mM [Fe (CN) 6] 4/3 pour :(A) électrode modifiée par le NIP et (B) électrode modifiée par le MIP en utilisant une gamme de fréquences de 100mHz-100 kHz et un potentiel de 0.1V.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Uzzan, A. (1992) «Olive et huile d'olive». In «*Manuel des corps gras*» Karleskind, A. Tome 1, Ed : Lavoisier, Paris, 221-228.
- [2] Boscou, D. (1996) Olive Oil Composition. In *Olive Oil : Chemistry and Technology*. AOACS Press, USA, 52-83, 85-127
- [3] Harwood, J. et Aparicio, R. (2000) Handbook of olive oil – Analysis and properties, An Aspen publication, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, 1-513.
- [4] Conseil Oléicole International (COI, Novembre 2011a) Production mondiale d'huile d'olive, tableau II .1 . Novembre 2011.
- [5] Conseil Oléicole International (COI, Novembre 2011b) Consommation mondiale d'huile d'olive, tableau II.2 . Novembre 2011.
- [6] Keys A. (1980) Seven countries: a multivariate analysis of death and coronary heart diseases. Cambridge, Massachusetts, USA. Harvard University Press.
- [7] Viola P. (1987) Olive oil and health, International Olive Oil Council, Madrid, Spain.
- [8] Kiritsakis, A.K. (1998) Composition of olive oil. In *Olive Oil from the tree to the table*. Second Edition. Food and Nutrition Press, Inc. Trumbull, Connecticut, 006611, USA. pp. 113-154.
- [9] Aparicio, R. Roda, L. Albi, M.A. Gutiérrez, F. t. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1999) 4150-4155.
- [10] Pelletier, X. Belbraouet, S. Mirabel, D. *Ann Nutr Metab*, 39 (1995) 291-295.
- [11] Hertog, M.G.L. Kromhout, D. Aravanis, C. *Arch Intern Med*, 155 (1995) 381-386.
- [12] Jialal, I. Devaraj, S. *Clin Chem*, 42 (1996) 498-506.
- [13] Mata, P. Alonso, R. Lopez-Farra, A. *Arterioscler Throm Vasc Biol*, 16 (1996) 1347-1355
- [14] Reaven, P. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 6 (1996) 57-64.

Bibliographie

- [15] Simons, L.A. Von Konigsmark, M. Balasubramaniam, S. *Aust NZ J Med*, 26 (1996) 496-503.
- [16] <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP>.
- [17] Costa, L.G. Richter, R. J. Li, W-F. Cole, T. Guizetti, M. Furlong, C.E. *Biomarkers* 8 (2003) 1.
- [18] Ekström, F. Afkur, C. Tunelmal, A-K. Landberg, S. *Biochemistry*, 45 (2006) 74.
- [19] Boublík Y. *Protein Engineering*, 15 (2002) 43.
- [20] Eubanks, L. M. Dickerson, T. J. Janda, K.D. *Chemical Society Reviews*, 36 (2007) 458-470.
- [21] *European Food Safety Authority Journal* 8 (2010) 1639
- [22] Sanchez-Ortega, A. Sampedro, M. C. Unceta, N. Goicolea, M.A. Barrio, R.J. *Journal of Chromatography*, 1094 (2005) 70.
- [23] Cun, Romain, C. I. Recherche de pesticide dans les eaux : une enquête pour Sherlock Holmes, http://culturesciences.chimie.ens.fr/dossiers-chimie/societe/article-Recherche_Pesticides.html#table_exemples_molec.
- [24] John, H. Worek, F. Thiermann, H. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 391(2008) 97.
- [25] Schellin, M. Hauser, B. Popp, P. *Journal of Chromatography A*, 1040 (2004) 251.
- [26] Wong J.W. et al., *Journal of Agricultural And Food chemistry*, 55 (2007) 1117.
- [27] Sanz, C. P. *Analytica Chimica Acta*, 524 (2004) 265.
- [28] Hassan, J.; Farahani, A.; Shamsipur, M., Damerchili, F. *J. Hazard. Materials*, 184 (2010) 869–871
- [29] Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E., Silvério, F. O. *Food Control*, 21 (2010) 1307–1311
- [30] Qu, Lin-Juan; Zhang, Hui; Zhu, Jian-Hua; Yang, Guo-Sheng ., Aboul-Enein, H. Y. *Food Chemistry*, 122 (2010) 327–332

Bibliographie

- [31] Wu, G.; Bao, X.; Zhao, S.; Wu, J.; Han, A., Ye, Q. *Food Chemistry*, 126 (2011) 646– 654
- [32] Rodrigues, F. M.; Mesquita, P.; Oliveira, L. S.; Oliveira, F. S.; Filho, A. M.; Pereira, P. A., Andrade, B. J. *Microchem. J.* 11(2010) 002
- [33] Filho, A. M.; Santos, F. N., Pereira P. A. P. *Microchemical Journal*, 96 (2010b) 139–145
- [34] Toledano, R.; Cortes, J.; Andini, J.; Villén, J ., Vázquez, A. *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 4738–4742
- [35] Wang, Y., Du, R. *Forensic Science International*, 198 (2010) 70–73
- [36] Filho, A. M.; Santos, F. N., Pereira P. A. P. *Talanta*, 81 (2010a) 346–354
- [37] Wu, C.; Liu, N.; Wu, Q.; Wang, C., Wang, Z. *Anal. Chim. Acta*, 679 (2010) 56–62
- [48] D’Oliveira, J.C. Al-Sayyed, Pichat, G. P. *Environ. Sci. Technol.* 24(7) (1990) 990-996.
- [49] Bahnemann, *Solar Energy* 77 (2004) 445-459.
- [40] Stumm, W. Morgan, J.J. *Aquatic chemistry*, Ed.2, Wiley inter-science J., Wiley & sons (1981).
- [41] Hiemenz, P.C. in: *principales of colloid and surface chemistry*, Ed., Marcel Dekker, New York, (1986) 353-419.
- [42] Calvet, R. Terce, M. Arvieu, J.C. *Ann. Argon* 31 (1980) 239-257.
- [43] Minh, C.T. *Les biocapteurs : principes, construction et applications.* (1991) : Masson.
- [44] Clark, L.C. Lyon, C. *Annals of the New York Academy of Sciences.*, 102 (1962) 29-45.
- [45] Dejous, C., *Contribution à l'étude de microcapteurs à ondes acoustiques visant la biodétection rapide sur site.* Université Bordeaux 1. (2005) 126.
- [46] Tran-Minh, C." *Les biocapteurs.Principe, construction et application."* Paris, (1991) Masson
- [47] Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, RA., Wilson, GS.. *Biosensors and Bioelectronics*, 16 (2001) 121-131.

Bibliographie

- [48] Gerard, M., Chaubey, A., Malhotra, B.D. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(5) (2002) 345-359.
- [49] Badia , A.: *Groupe Physical and Analytical Chemistry de l'Université de Montréal au Canada, partie du cours d'Antonella Badia. Image disponible à l'adresse suivante : http://www.esi.umontreal.ca/~badiaa/biocapteurs.pdf.*
- [50] Bard, A.J. Faulkner, L.R. *Electrochemical methods : Fundamentals and applications..: John Wiley & sons, Inc. (2001)*
- [51] Ramon-Azcon, J., Valera, E., Rodriguez, A., Barranco, A., Alfaro, B., Sanchez-Baeza, F., Marco, M.P. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(9) (2008) 1367-1373.
- [52] Hou, Y., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Zhang, A., Minic-Vidic, J., Gorjankina, T., Persuy, MA., Pajot-Augy, E., Salesse, R., Akimov, V., Reggiani, L., Pennetta, C., Alfinito, E., Ruiz, O., Gomila, G., Samitier, J., Errachid, A. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(7) (2007) 1550-1555.
- [53] Fernandez-Sanchez, C., McNeil, CJ., and Rawson, K.. *Trends in Analytical Chemistry*, 24(1) (2005) 37-48.
- [54] Lisdat, F. and Schäfer, D. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2008).
- [55] Rosset R., Caude M., Jardy A., *Chromatographie en phase liquide et supercritique, Lavoisier (1991)*
- [56] Hercegová A., Dömötöróvá M., Matisová E., *J. Chrom. A*, 1153 (2007) 54-73
- [57] Kovalczuk T., Jech M., Poustka J., Hajšlová J., *Anal. Chim. Acta*, 577 (2006) 8-17.
- [58] Picó Y., Blasco C., Font G., *Mass Spectrom. Rev.* 23 (2004) 45-85.
- [59] Hogendoorn E., van Zoonen P., *J. Chrom. A*, 892 (2000) 435-453.
- [60] Hogenboom C., Hofman M. P., Kok S. J., Niessen W. M. A., Brinkman U. A. Th., *J. Chrom. A*, 892 (2000) 379-390.
- [61] Hajsllová J., Zrostlíková J., *J. Chrom. A*, 1000 (2003) 181-197.

Bibliographie

- [62] Picó Y., Font G., Moltó J. C., Mañes J., *J. Chrom. A*, 882 (**2000**) 153-173.
- [63] Careri M., Mangia A., Musci M., *J. Chrom. A*, 727 (**1996**) 153-184.
- [64] Freitas L. G., Götz C. W., Ruff M., Singer H. P., Müller S. R., *J. Chrom. A*, 1028 (**2004**) 277-286.
- [65] Sherma J., *J. AOAC International*, 80 (**1997**) 283
- [66]. Polyakov M.V., *Zhur. Khim.* 25 (**1931**) 799-805.
- [67]. Dickey F.H., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 35 (1949) 227
- [68]. Pauling L., Delbrück M. *Science* 92 (1940) 77-79,
- [69]. Wulff G., Sarhan A., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 11(**1972**) 341.
- [70]. Takagishi T., Klotz I.M., *Biopolymers* 11 (1972) 483
- [71]. Malitisa C., Losito I., Zambonin P.G, *Anal. Chem.*, 71 (**1999**) 1366-1370.
- [72]. Peng H., Liang C., Zhou A., Zhang Y., Xie Q., Yao S., *Anal. Chim. Acta*, 423 (**2000**) 221-228.
- [73]. Blanka Tóth, These de doctorat ,(2010)
- [74]. Sellergren B., *Chiral Separation Technique, 2nd edition, Wiley-VCH, Weinheim*, (**2001**) 153-184.
- [75]. Shim Y.-H., Yilmaz E., Lavielle S., Haupt K., *Analyst* 129 (**2004**) 1211-1215.
- [76]. Claude B., Morin P., Lafosse M., Belmont A.-S., Haupt K., *Talanta* 75 (**2008**) 344-350.
- [77]. Pichon V., Haupt K., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Techn.*, 29 (**2006**) 989-1023.
- [78]. Andersson L.I., Schweitz L., *Handb. Anal. Sep.*, 4 (**2003**) 45-71.
- [79]. Lanza F., Sellergren B., *Adv. Chromatogr.*, 41(**2001**)137-173.
- [80]. Haupt K., Mosbach K., *Chem. Rev.*, 100 (**2000**) 2495-2504.
- [81]. Whitcombe M.J., Alexander C., Vulfson E.N., *Trends Food Sci. Technol.*, 8 (**1997**) 140-145.
- [82]. Kim H., Spivack D.A., *JACS*, 125 (2003)11269

Bibliographie

- [83]. Wulff G., Dederichs R., Grotstollen R., Jupe C., *Affinity Chrom. and Related Techniques*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, (1982) 207-216.
- [84]. Wulff G., *Pure Appl. Chem.*, 54 (1982) 2093-2102.
- [85]. Harun, N., *thesis* (2010)
- [86]. Wulff G., Vietmeier J., *Makromol. Chem.*, 190 (1989) 1727.
- [87]. Shea K.J., Dougherty T.K., *J. Am. Chem. Soc.*, 108 (1986) 1091.
- [88]. Shea K.J., Sasaki D.Y., Stoddard G.J., *Macromolecules*, 226 (1989) 1722.
- [89]. Wulff G., Schauhoff S., *J. Org. Chem.*, 56 (1991) 395-400.
- [90]. Kugiyama A., Matsui J., Takeuchi T., Yano K., Muguruma H., Eigersma A.V., Karube I., *Anal. Lett.*, 28 (1995) 2317.
- [91]. Alexander C., Andersson H.S., Andersson L.I., Ansell R.J., Kirsch N., Nicholls I.A., Whitcombe M.J., *J. Mol. Recogn.*, , 19 (2006) 106-180
- [92]. Wulff G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 34 (1995) 1812-1832.
- [93]. Shea K.J., *Trends Polym. Sci.*, 2 (1994) 166-173.
- [94]. Mosbach K., *Trends Biochem. Sci.*, 19 (1994) 9-14.
- [95]. Gallego-Gallegos M., Munoz-Olivas R., Camara C., Mancheno M.J., Sierra M.A., *Analyst*, 131(2006), 98-105.
- [96]. Arshady R., Mosbach K., *Macromol. Chem. Phys.*, 182 (1981) 687-692.
- [97]. Ramström O., Nicholls I.A., Mosbach K., *Tetrahedron:Asymmetry*, 5 (1994) 649– 656.
- [98]. Svenson J., Andersson H.S., Piletsky S.A., *J. Mol. Recoignit.*, 11 (1998) 83-86.
- [99]. Andersson H.S., Nicholls I.A., *Bioorganic Chemistry* 25 (1997) 203-211.
- [100]. Karlsson J.G., Andersson H.S., Karlsson B., Nicholls I.A., *Analyst* 129(2004) 456-462.
- [101]. Osmani Q., Hughes H., Flavin K., Hedin-Dahlstrom J., Allender C.J., Frisby J., McLoughlin P., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 39 (2008) 1229-1236.
- [102]. Hsu C.Y., Lin H.Y., Thomes J.L., Chou T.C., *Nanotechnology* 17 (2006) S77-S83.

Bibliographie

- [103]. Mayes A.G., Whitcombe M.J., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (2005) 1742–1778.
- [104]. Kirsch N., Whitcomb M.J., in *Molecularly Imprinted Materials*, Eds: Marcel Dekker, New York, USA (2005) 93-122.
- [105]. Yilmaz E., Haupt K., Mosbach K., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39 (2000) 2115-2118.
- [106]. Umpleby II R.J., Baxter S.C., Bode M., Berch J.K., Shah R.N., Shimizu K.D., *Anal. Chim. Acta*, 435 (2001) 35-42.
- [107]. Sajonz P., Kele M., Zhong G., Sellergren B., Guiochon G., *J. Chromatogr. A*, 810 (1998) 1-17.
- [108]. Sellergren B., Shea K.J., *J. Chromatogr. A* 690 (1995) 29-39.
- [109]. Umpleby I.I., Baxter S.C., Rampey A.M., Rushton G.T., Chen Y., Shimizu K.D., *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 141-149.
- [110]. Wulff G., Knorr K., *Bioseparation* 10 (2002) 257–276.
- [111]. Wulff G., Schönfeld R., *Adv. Mater.*, 10 (1998) 957– 959.
- [112]. Kim J.M., Ahn K.D., Wulff G., *Macromol. Chem. Phys.*, 202 (2001) 1105–1108.
- [113]. Emgenbroich M., Wulff G., *Chem. Eur. J.*, 9 (2003) 4106–4117.
- [114]. Umpleby R.J., Bode M., Shimizu K.D., *Analyst*, 125 (2000) 1261-1265.
- [115]. Sellergren B., Andersson L., *J. Org. Chem.*, 55 (1990) 3381-3383.
- [116]. Whitcombe M.J., Rodirguez M.E., Villar P., Vulfson E.N., *J. Am. Chem. Soc.*, 117 (1995) 7105- 7111.
- [117]. Cheong S.H., McNiven S., Rachkov A.E., Levi R., Yano K., Karube I., *Macromolecules*, 30 (1997) 1317– 1322.
- [118]. Byström S.E., Börje A., Åkermark B., *J. Am. Chem. Soc.*, 115 (1993) 2081–2083.
- [119]. Batra D., Shea K.J., *Org. Lett.*, 5 (2003) 3895-3898.

Bibliographie

- [120]. Matsui J., Kato T., Takeuchi T., Suzuki M., Yokoyama K., Tamiya E., Karube I .,*Anal.Chem.*, 65 (1993) 2223-2224.
- [121]. Schweitz L., Andersson L.I ., Nilsson S., *Anal.Chim.Acta*, 435 (2001) 43-47.
- [122]. Svenson J., Nicholls I.A., *Anal.Chim.Acta*, 435 (2001) 19-24.
- [123]. Ye L., Cormack P.A.G., Mosbach K., *Anal.Chim.Acta*, 435 (2001) 187-196.
- [124]. Ye L., Weiss R ., Mosbach K . *Macromolecules*, 33 (2000) 8239-8245.
- [125]. Pérez N., Whitcombe M.J., Vulfson E.N., *Macromolecules*, 34 (2001) 830-836.
- [126]. Mayes A.G., Mosbach K., *Anal.Chim.Acta*, 68 (1996) 3769-3774.
- [127]. Hagiwara J., Takehira H., Hosoya K., Tanaka N., *J.Chrom. A*, 813 (1998) 113-121.
- [128]. Plunkett S.D., Arnold F.H., *J.Chrom. A*, 708 (1995) 19-29.
- [129]. Vidyasankar S., Ru M., Arnold F.H., *J.Chrom. A*, 775 (1997) 51-63.
- [130]. Glad M., Reinhöldsson P., Mosbach K., *React.Polym.*, 25 (1995) 47-54.
- [131]. Yilmaz E., Ramstrom O., Moller P., Sanchez D., Mosbach k., *J. Mater* . 12 (2002)1577-1581.
- [132]. Pérez-moral N., Mayes A .G., *Anal.Chim.Acta*, 504 (2004) 15-21.
- [133]. Sergeyeva T.A., Piletsky S.A., El'skaya A.V., Brovko A.A., Karabanova L.V., Sergeeva L.M., Turner A.P.F., *Macromolecules*, 36 (2003) 7352-7357.
- [134]. Piletsky S.A., Day R.M., Chen B., Subrahmanyam S., Piletska E., Turner A.P.F., *International Patent Application PCT/GB01/00324PCT/GB01/00342,(2000)*.
- [135]. Lehmann M., Brunner H., Tovar G.E.M., *Desalination* , 149 (2002) 315-321
- [136]. Wang H.Y., Kobayashi T., Fujii N., *Langumir* , 12 (1996) 4850-4856.
- [137]. Piletsky S.A., Piletskaya E.V., Sergeyeva T.A., Panasyuk T.L ., El'skaya A.V, *Sensors and Actuators B*, 60 (1999) 216-220.
- [138]. Shoji R., Takeuchi T., Kubo I., *Anal.Chim.Acta*, 75 (2003) 4882-4886.

Bibliographie

- [139]. Piletsky S.A., Piletska E.V., Elgersma A.V., Kano K., Karube I., *Biosensors & Bioelectronics*, 10 (1995) 959-964.
- [140]. Mosbach K., Ramstrom O., *Bio/Technology*, 14 (1996) 163-170.
- [141]. Shi H.Q., Tsai W.B., Garrison M.D., Ferrari S., Ratner B.D., *Nature*, 398(1999) 593-597.
- [142]. Alexander C., Vulfson E., *Adv.Mater.*, 9 (1997) 751-755.
- [143]. D'Souza S.M., Alexander C., Carr S.W., Waller A.M., Whitcombe M.J., Vulfson E.N., *Nature*, 398 (1999) 312-316.
- [144]. Ramstrom O., Nicholls I.A., Mosbach K., *Tetrahedron Asymmetry*, 5 (1994) 649-656.
- [145]. Mayes A., Andersson L.I., Mosbach K., *Anal.Biochem.*, 222 (1994) 483-488.
- [146]. Kriz D., Berggren-kriz C., Andersson L.I., Mosbach K., *Anal.Chem.*, 66 (1994) 2636-2639.
- [147]. Schweitz L., Andersson L.I., Nilsson S., *Anal.Chem.*, 69 (1997) 1179-1183.
- [148]. Sellergren B., *Anal.Chem.*, 66 (1994) 1578-1582.
- [149]. Andersson L.I., Paprica A., Arvidsson T., *Chromatographia*, 46 (1997) 57-62.
- [150]. Vlatakis G., Andersson L.I., Muller R., Mosbach K., *Nature*, 361(1993) 645-647.
- [151]. Ramstrom O., Ye L., Mosbach K., *Chem. Biol.*, 3 (1996) 471-477.
- [152]. Lewis J.G., Manley L., Whitlow J.C., Elder P.A., *Steroids* , 57 (1992) 82-85.
- [153]. Purchas R.W., Zinn S.A., Tucker H.A., .., *Anal.Biochem.*, 149 (1985) 399-403.
- [154]. Sainio E.-L., Lehtola T., Roininen P., *Steroids* , 51 (1988) 602-622.
- [155]. Haupt K., Mosbach K., *Chem. Rev.*, 100 (2000) 2495-2504.
- [156]. Haupt K., Noworyta K., Kutner W., *Anal. Commun.*, 36 (1999) 391-393.
- [157]. Andersson L., Mandenius C.F., Mosbach K., *Tetrahedron Lett* , 29 (1988) 5437-5440.
- [158]. Hedborg E., Winquist F., Lundstrom I., Andersson L., Mosbach K., *Sensor Actuators A*, 36 (1993) 796-799

Bibliographie

- [159]. Sergeyeva T.A., Piletsky S.A., Brovko A.A., Slinchenko E.A., Sergeeva L.M., Panasyuk T.L., Elskaya A.V., *Analyst*, 124 (1999) 331-334
- [160]. Dickert F.L., Forth P., Lieberzeit P., Tortschanof M., *Anal , Chem* 360 (**1998**) 759-762
- [161]. Malatesta C., Losito I., Zambonin P.G ., *Anal , Chem* 71 (**1999**) 1366-1370
- [162]. Haupt K., Noworyta K., Kutner W., *Anal , Commun* 36 (1999) 391-393
- [163]. Jakusch M., Janotta M., Mizaikoff B Mosbach K.,Haupt K., *Anal, Chem*, 71 (1999) 4786-4791
- [164]. Dickert F.L., Tortschanof M., Bulst W.E., Fisherauer G., *Anal , Chem* 71 (**1999**) 4559-4563
- [165]. Turkewitsh P., Wandelt B., Darling G.D., Powell W.S., *Anal, Chem*, 70 (**1998**) 2025-2030
- [166]. Kriz D., Mosbach K., *Anal , Chim, Acta*, 300 (1995) 71-75
- [167]. Kroger S., Turner A.P.F., Mosbach K.,Haupt K., *Anal, Chem*, 71 (**1999**) 3698-3702
- [168]. Chen G.H., Guan Z.B., Chen C.T., Fu L.T., Sundarsan V., *Nature Biotechnol.*, 15 (**1997**) 354-357
- [169]. Ramstrom O., Mosbach K., *Curr.Opin.Chem.Biol.*, 3 (**1999**) 759-764.
- [170]. Muller R., Andersson L.I., Mosbach K., *Makromol.Chem.Rap.Comm.*, 14 (**1993**) 637-641.
- [171]. Wulff G., Gross T., Schonfled R., *Angew.Chem., Int. Ed. Engl.*, 36 (**1997**) 1962-1964.
- [172]. Liu X.C., Mosbach K., *Macromol . Rap . Comm.*, 18 (**1997**) 609-615
- [173]. Mastui J., Nicholls I.A., Karube I., Mosbach K., *J.Org .Chem.*, (**1996**) 61.
- [174]. Liu X.C., Mosbach K., *Macromol . Rap . Comm.*, 19 (**1998**) 671-674
- [175]. Severin K; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4 (**2000**) 710-714.
- [176]. Ye L., Ramstrom O., Ansell R.J., Mansson M.O., Mosbach K., *Biotechnol. Bioeng.*, 64 (**1999**) 650-655

Bibliographie

- [177]. Alexander C., Smith C.R., Whitcombe M.J., Vulfson E.N., *J.Am .Chem.Soc.*, 121 (1999) 6640-6651
- [178]. Norell M.C., Andersson H.S., Nicholls I.A., *J. Mol. Recogn.*, 11 (1998) 98-102
- [179]. Ramstrom O., Ye L., Mosbach K., *Anal. Commun.*, 35 (1998) 9-11.
- [180]. Gilson, *The Gilson Guide for SPE automation.*
- [181]. Pichon V., *Techniques de l'ingénieur* P1420 (2006).
- [182]. Poole C.F., *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22 (2003) 362.
- [183]. Majors R.E., *LCGC Europe* December (2001).
- [184]. http://static.coleparmer.com/small_images/1093700.jpg, consulté en 2010
- [185]. http://www.restek.com/restek/images/standard/26207_ph_so_spe.jpg, consulté en 2010
- [186]. Thurman E.M., Snavely K., *trends in analytical chemistry* 19 (2000) 18.
- [187]. <http://www.sigmadralich.com/prodimages/p/p000100.jpg>, consulté en 2010
- [188]. <http://www.waters.com/webassets/other/catalogimages/sepplates.jpg>, consulté en 2010
- [189]. Hennion M.-C., *Journal of Chromatography, A* 856 (1999) 3.
- [190]. Rodriguez-Mozaz S., Alda M.J.L., Barceló D., *Journal of Chromatography, A* 1152 (2007) 97.
- [191]. Tauler R., Lacorte S., Barceló D., *J. Chromatogr. A* 730 (1996) 177.
- [192]. Wille S., Lambert W., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007) 1381.
- [193]. Majors R.E., *LCGC Europe* (2003).
- [194]. Drevenkar V., Froebe Z., Stengl B., Tkalcovic B., *Mikrochim. Acta* 1 (1985) 143.
- [195]. Font G., Mañes J., Moltó J.C., Picó Y., *J. Chromatogr.* 642 (1993) 135.
- [196]. Niessen W.M.A., Manini P., Andreoli R., *Mass Spectrometry Reviews* 25 (2006) 881.
- [197]. Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M., *Analytical Chemistry* 70 (1998) 882.

Bibliographie

- [198]. Mortier K.A., Maudens K.E., Lambert W.E., Clauwaert K.M., Van Bocxlaer J.F., Deforce D.L., Van Peteghem C.H., De Leenheer A.P., *Journal of Chromatography, B* 779 (2002) 321.
- [199]. Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M., *Analytical Chemistry* 75 (2003) 3019.
- [200]. Agüera A., López S., Fernández-Alba A.R., Contreras M., Crespo J., Piedra L. , *Journal of Chromatography A* 1045 (2004) 125.
- [201]. He C, Long Y, Pan J, Li K, Liu F. *J.Biochem Biophys Methods* 70 (2007) 133-150.
- [202]. Sellergen B. *Anal Chem* 66 (1994) 1578-1582.
- [203]. Zander A, Findlay P, Renner T, Sellergren B, Swletlow A. *Anal Chem* 70 (1998) 3304-3314.
- [204]. Muldoon MT, Stanker LH . *Anal Chem* 69 (1997) 803-808.
- [205]. Pichon V., *Journal of Chromatography, A* 1152 (2007) 41.
- [206]. Chapuis F., Pichon V., Lanza F., Sellergren B., Hennion M.C., *Journal of Chromatography B* 804 (2004) 93.
- [207]. Koohpaei A. R., Shahtaheri S. J., Ganjali M. R., Forushani A. R., Golbabaei F., *Talanta*, 75 (2008) 978.
- [208]. Karim K., Breton F., Rouillon R., Piletska E.V., Guerreiro A., Chianella I., Piletsky S.A., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1795–1808.
- [209]. Piletsky S.A., Karim K., Piletska E.V., Day C.J., Freebairn K.W., Legge C.H., Turner A.P.F., *Analyst* 126 (2001) 1826-1830.
- [210]. Powell M.J.D., Restart Procedure for the conjugate Gradient method, *Mathematical Programming*, 12 (1977) 241-254
- [211]. Gasteiger I., Marsili M., *Tetrahedron* , 36 (1980) 3219-3228.

Bibliographie

- [212]. Strasser R.J., Stirber A.D., *Mathematics and computer in simulation*, 56 (2001) 451-461
- [213]. Purcel W.P., Singer J.A., *J.Chem.Eng.Data*, 12 (1967) 235-246.
- [214]. Piletsky S.A., Piletska E.V., Karim K., Day C.J., Freebairn K.W., Legge C.H., Turner A.P.F., *Macromolecules*, 35 (2002) 7499-7504.
- [215]. Subrahmanyam S., Piletsky S.A., Piletska E.V., Chen B., Karim K., Turner A.P.F., *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 631-637.
- [216]. Guerreiro A.R, Romero-Guerra M., Piletska E.V., Piletsky S.A., Turner A.P.F., Tuning of drug-specific molecular imprinted polymers to aqueous environment , *Synthetic Receptors* 2003, 15-17 October 2003, Lisbon, Portugal.
- [217]. Sellergren B., Lepisto M., Mosbach K., *J. Am. Chem. Soc.*, 110 (1988) 5853-5860.
- [218]. Whitcombe M.J., Martin L., Vulfson E.N., *J. Chromatogr. A* 47 (1998) 457-464.
- [219]. Svenson J., Karlsson J.G., Nicholls I.A., *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 39-44.
- [220]. Breton F., Thèse de Doctorat (2005)
- [221]. Takeuchi T., Fukuma D., Matsui J., *Anal. Chem.* 71 (1999) 285-290.
- [222]. Lanza F., Sellergren B., *Anal. Chem.* 71 (1999) 2092-2096.
- [223]. Umpleby II R.J., Baxter S.C., Chen Y., Shah R.N., Shimizu K.D., *Anal. Chem.* 73 (2004) 4584-4591 .
- [224] Rampey A.M., Umpleby II R.J., Rushton G.T., Iseman J.C., Shah R.N., Shimizu K.D.. *Anal. Chem.* 76 (2004) 1123.
- [225]. Ciardelli .G, Cioni. B., Cristallini .C., Barbani .N., Silvestri D., Giusti .P., *Biosens. Bioelectron.* 20 (2004) 1083.
- [226]. Wulff, G., Kemmerer. R., *New Journal of Chemistry* 6 (1982) 681-687.
- [227]. Srebnik. S., Lev.O., *Journal of Chemical Physics* 116 (2002) 10967-10972.
- [228]. Spivak, D. A., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(2005) 1779-1794.

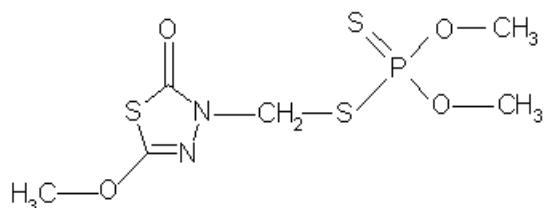
Bibliographie

- [229]. Piletsky S.A , Molecular Imprinting of Polymers, *biotechnology intelligence unit* (**2006**)
- [230]. Sellergren .B., Andersson. L.I., *Methods* 22 (**2000**) 92–106.
- [231]. Bohmer .M.R., Elattar .Y.S., Foissy. A., Colloid .J.. *Interf. Sci.* 164 (**1994**) 126-135.
- [232]. Porschmann. J., Kopinke .F.D., Pawliszyn .J., *Environ. Sci. Technol.* 31 (**1997**) 3629
3636.
- [233]. Fontaine .D.D., Lehmann .R.G., Miller . J.R., *Environ. Qual.* 20 (**1991**) 759-762.
- [234]. Davis. J.A., *Geochim. Cosmochim. Acta* 46 (**1982**) 2381-2393.
- [235]. Haderlein .S.B., Weissmahr. K.W., Schwazzenbach .R.P., *Environ. Sci. Technol.* 30
(**1996**) 612-622.
- [236]. Giacomo D., Giuseppa D.B., Loredana T., Marcello S., *Food Control* 16 (**2005**) 435
438
- [237]. Ben Oujji N., Bakas I., Istamboulié G., Ait-Ichou I., Ait-Addi E., Rouillon R ., Noguer
T., *Food Control* 16 (**2013**) 657–661
- [238]. Hayat A ., Barthelmebs L., Sassolas A., Marty J-L. *Talanta* 85 (**2011**) 513–518

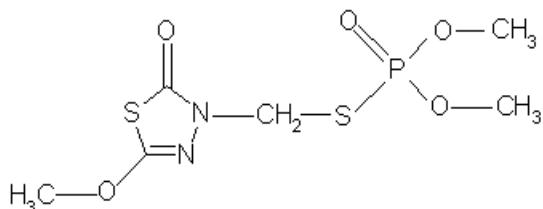
ANNEXES

ANNEXE I

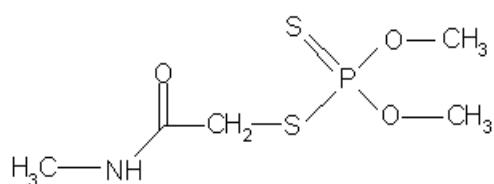
Les insecticides organophosphorés utilisés proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)



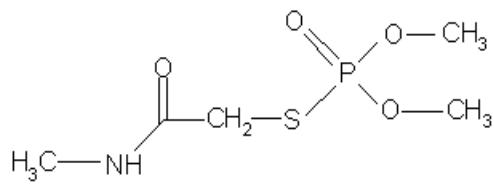
Methidathion



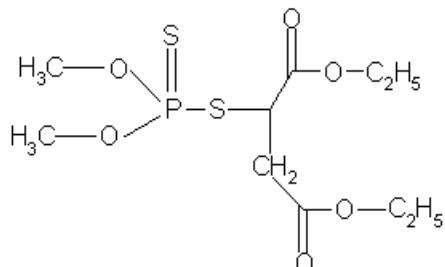
Methidathion-oxon



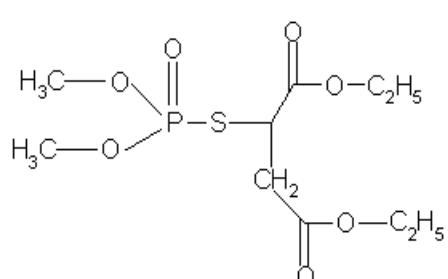
Dimethoate



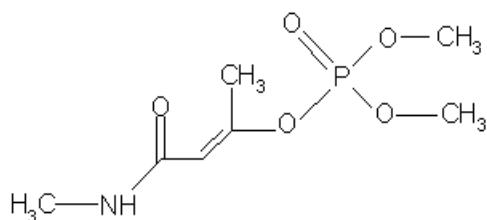
Omethoate



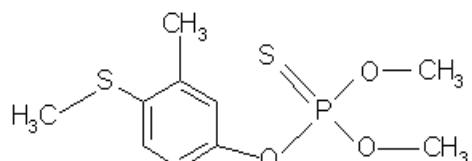
Malathion



Malaoxon



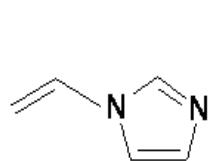
Monocrotophos



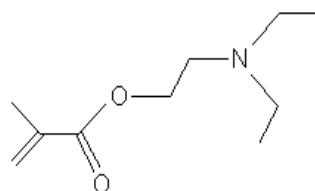
Fenthion

Structures chimiques des insecticides organophosphorés utilisés.

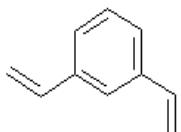
ANNEXE II



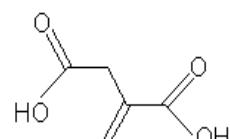
1-Vinylimidazole
(VI)



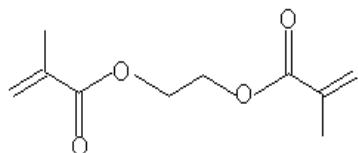
N,N-Diethylamino Ethyl
Methacrylate (DEAEM)



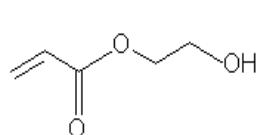
m-Divinylbenzene
(Mdvb)



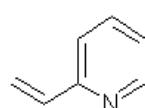
Itaconic Acid
(IA)



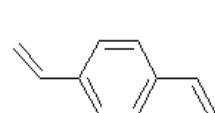
N,N-Diethylamino Ethyl
Methacrylate (DEAEM)



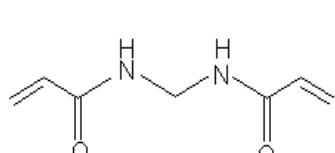
2-Hydroxyethyl Methacrylate
(2-HEM)



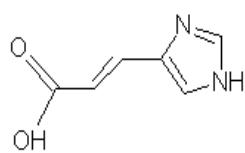
2-Vinylpyridine
(2-VP)



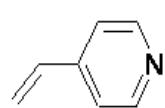
p-Divinylbenzene
(Pdvb)



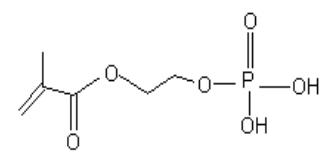
N,N-Methylene bisacrylamide
(MBAA)



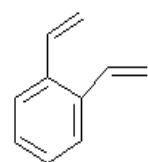
Urocanic acid (UA)



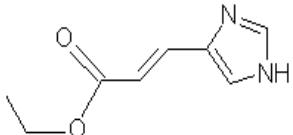
4-Vinylpyridine
(4-VP)



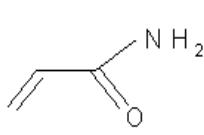
Ethylene Glycol Methacrylate Phosphate
(EGMP)



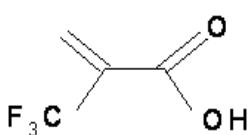
o-Divinylbenzene
(Odvb)



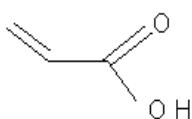
Urocanic acid
urocanique ethyl
ester



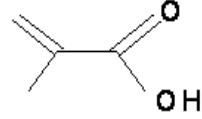
Acrylamide



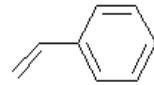
Trifluoromethacrylic acid
(TFMAA)



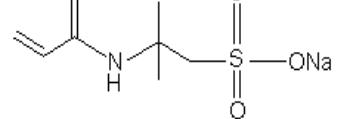
Acrylic acid
(AA)



Methacrylic acid
(MAA)



Styrene



Acrylamido-2-Methyl-1-Propane
Sulfonic Acid (AMPSA)

Structures des monomères fonctionnels utilisés dans la modélisation

ANNEXE III

Composition des polymères (MIPs) synthétisés pour les insecticides, avec différents monomères fonctionnels

Molécule cible	Quantité de molécule cible (mg)	Monomère fonctionnel	Quantité de Monomère (mg)	Quantité d'EGDMA (mg)	Quantité de diméthylformamide (g)	Quantité d'AIBN (mg)
Méthidathion	49	MBAA	100	643	1,5	10
	58	IA	100	761,7	1,5	10
	53,9	TFMAA	100	707,6	1,5	10
	87,8	MAA	100	1151,6	1,5	10
Diméthoate	27,2	EGMP	100	471,6	1,5	10
	44	IA	100	762	1,5	10
	40,9	TFMAA	100	707,6	1,5	10
	28,9	EGDMA	100	500	1,5	10
	55,1	Styrène	100	952,9	1,5	10
Malathion	53,5	MBAA	100	643	1,5	10
	116,1	Acrylamide	100	1394,3	1,5	10
	95,9	MAA	100	1151,6	1,5	10
	41,6	EGDMA	100	500	1,5	10
	58,96	TFMAA	100	707,6	1,5	10
Fenthion	98	Acrylamide	100	1394	1,5	10
	45,1	MBAA	100	642,8	1,5	10
	80,8	MAA	100	1151,6	1,5	10
	35,1	EGDMA	100	500	1,5	10
	66,9	Styrène	100	952,9	1,5	10

* Les polymères NIPs ont été préparés dans les mêmes conditions que les MIPs mais en absence de la molécule cible

ANNEXE IV

Composition des polymères synthétisés pour la caractérisation

Polymère	Molécule cible	Quantité de molécule cible (mg)	Monomère fonctionnel	Quantité de monomère (mg)	Quantité d'EGDMA (mg)	Quantité de diméthylformamide (g)	Quantité d'AIBN (mg)
Pol 1	Methidathion	49	MBAA	100	643	1,5	10
Pol 2	-	0	MBAA	100	643	1,5	10
Pol 3	Dimethoate	44	IA	100	762	1,5	10
Pol 4	-	0	IA	100	762	1,5	10
Pol 5	Malathion	54	MBAA	100	643	1,5	10
Pol 6	-	0	MBAA	100	643	1,5	10
Pol 7	Fenthion	98	Acrylamide	100	1394	1,5	10
Pol 8	-	0	Acrylamide	100	1394	1,5	10

ANNEXE V

Technique chromatographique

Toutes les analyses de différentes solutions testées (extraction, lavage, élution) ont été réalisées en utilisant une chromatographie à haute performances (HPLC) de système LaChrom Elite® acheté chez Merck-Hitachi (VWR, la France). L'appareil, est constitué d'une pompe L 2130, configurée en série, commandée par microprocesseur, auto-aspirante, à débit extrêmement constant et contrôle de fiabilité intégré ; et un auto-échantillonneur L-2200 haute performance, par injection directe. Des séparations chromatographiques ont été effectuées avec une colonne de phase inverse C18 Supelcosil™ (250 4.6 mm x, 5 µ M) et la Détection en utilisant un détecteur UV L-2400. Les chromatogrammes ont été traités sur un ordinateur exécutant le logiciel (EZ Chrom Elite).

Méthode :

Phase mobile : Acétonitrile / Eau (50/50, v/v)

Volume d'injection : 20 µL

Débit : 1mL /min

Détection : Methidathion, Methidathion-oxon, 216 nm

Dimethoate, Omethoate ,200 nm

Malathion, Malaoxon, 220nm

Fenthion, 250nm

Monocrotophos, 209 nm

Annexes

ANNEXE VI

Composition des polymères synthétisés en gardant les quantités de tous les réactifs constantes tout en variant la quantité de molécule cible afin d'optimiser le ratio molécule cible/monomère fonctionnel.

T = molécule cible, M= monomère fonctionnel, Ret = monomère réticulant

Pol T :M :Ret	Pol 1 Méthidathion-MBAA			Pol 2 Diméthoate -IA			Pol 3 Malathion-MBAA			Pol 4 Fenthion-Acrylamide		
	T (mg)	M (mg)	Ret (mg)	T (mg)	M (mg)	Ret (mg)	T (mg)	M (mg)	Ret (mg)	T (mg)	M (mg)	Ret (mg)
1:1 :20	196,1	100	643	176,2	100	762	214,2	100	643	391,5	100	1394
1:2 :20	98,05	100	643	88,10	100	762	107,1	100	643	195,7	100	1394
1:4 :20	49	100	643	44,05	100	762	54	100	643	98	100	1394
1:6:20	32,6	100	643	29,36	100	762	35,71	100	643	65,26	100	1394
1:8:20	24,5	100	643	22,02	100	762	26,78	100	643	48,94	100	1394
1:10:20	19,6	100	643	17,62	100	762	21,42	100	643	39,15	100	1394

Annexes

ANNEXE VII

Composition des polymères synthétisés en gardant le ratio molécule cible /monomère fonctionnel constant et en faisant varier la quantité de monomère réticulant (crosslinker) EGDMA

Pol T :M :Ret	Pol 5 Méthidathion-MBAA			Pol 6 Diméthoate -IA			Pol 7 Malathion-MBAA			Pol 8 Fenthion-Acrylamide		
	T (mg)	M (mg)	Ret (mg)	T (mg)	M (mg)	Ret (mg)	T (mg)	M (mg)	Ret (mg)	T (mg)	M (mg)	Ret (mg)
1:4 :5	49	100	160,7	44	100	190,4	53	100	160,7	97	100	348,5
1:4 :10	49	100	321,4	44	100	380,8	53	100	321,4	97	100	697,1
1:4 :20	49	100	643	44	100	762	53	100	643	97	100	1394
1:4 :30	49	100	964,2	44	100	1142,6	53	100	964,2	97	100	2091
1:4 :40	49	100	1285,7	44	100	1523,5	53	100	1285,7	97	100	2788
1:4 :50	49	100	1607	44	100	1904,4	53	100	1607	97	100	3486

T = molécule cible, M= monomère fonctionnel, Ret = monomère réticulant

ANNEXE VIII

$$\text{Pourcentage de rétention} = \frac{\text{Quantité retenue par le polymère}}{\text{quantité initiale}} * 100$$

$$\text{Pourcentage de récupération} = \frac{\text{Quantité détectée dans la solution}}{\text{quantité initiale}} * 100$$

$$\text{Facteur d'impression} = \frac{R_{MIP}}{R_{NIP}}$$

Où R_{MIP} et R_{NIP} sont les rétentions respectives sur le MIP et son MIP correspondant.

Déviation standard :

$$RSD = 100 * \sqrt{\frac{\sum (\text{résultat} - \text{moyenne des résultats})^2}{\text{nombre de résultats} - 1}}$$

moyenne des résultats

ANNEXE IX

Tableau I : Température de dégradation des insecticides organophosphorés utilisés

Insecticides	Température de dégradation
Diméthoate	113 °C
Méthidathion	117 °C
Malathion	174 °C
Fenthion	210°C
Monocrotophos	125°C

Tableau II : Moment dipolaire des solvants utilisés

Solvant	Moment dipolaire
Hexane	0,09
Toluène	0,38
Chloroforme	1,04
Dichlorométhane	1,14
Méthanol	1,70
Acétonitrile	3,44

PUBLICATIONS

Publications

Analytica Chimica Acta 734 (2012) 99–105



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca



Molecular imprinting solid phase extraction for selective detection of methidathion in olive oil

Idriss Bakas^{a,b}, Najwa Ben Oujji^{a,b}, Ewa Moczko^c, Georges Istamboulie^a, Sergey Piletsky^c, Elena Piletska^c, Ihya Ait-Ichou^b, Elhabib Ait-Addi^b, Thierry Noguer^{a,*}, Régis Rouillon^a

^a Université de Perpignan Via Domitia, IMAGES EA4218, bâtiment S 52 Av. Paul Alduy, 66860 Perpignan, Cedex, France

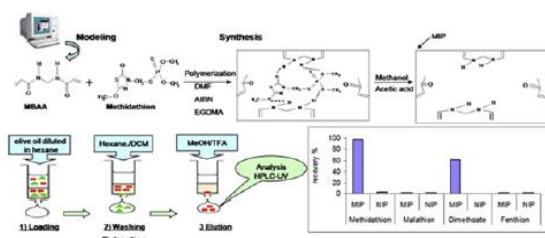
^b Laboratoire AQUAMAR, Equipe Matériaux Photocatalyse et Environnement, Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr, B.P. 8106 Cité Dakhla, Agadir, Morocco

^c Cranfield Health, B52, Cranfield University, Cranfield, Bedfordshire, MK43 0AL, UK

HIGHLIGHTS

- Development of a molecular imprinted polymer (MIP), based on molecular modelling for methidathion (organophosphorus insecticide).
- Optimisation of a protocol of extraction based on molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE).
- Application of the optimised protocol for the extraction of methidathion from olive oil.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2012

Received in revised form 10 May 2012

Accepted 13 May 2012

Available online 19 May 2012

Keywords:

Computational modelling

Methidathion

MIP

Olive oil

ABSTRACT

A specific adsorbent for extraction of methidathion from olive oil was developed. The design of the molecularly imprinted polymer (MIP) was based on the results of the computational screening of the library of polymerisable functional monomers. MIP was prepared by thermal polymerisation using N,N'-methylene bisacrylamide (MBAA) as a functional monomer and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as a cross-linker. The polymers based on the itaconic acid (IA), methacrylic acid (MAA) and 2-(trifluoromethyl)acrylic acid (TFMAA) functional monomers and one control polymer which was made without functional monomers with cross-linker EGDMA were also synthesised and tested. The performance of each polymer was compared using corresponding imprinting factor. As it was predicted by molecular modelling the best results were obtained for the MIP prepared with MBAA. The obtained MIP was optimised in solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography (MISPE-HPLC-UV) and tested for the rapid screening of methidathion in olive oil. The proposed method allowed the efficient extraction of methidathion for concentrations ranging from 0.1 to 9 mg L⁻¹ ($r^2 = 0.996$). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) in olive oil were 0.02 mg L⁻¹ and 0.1 mg L⁻¹, respectively. MIPs extraction was much more effective than traditional C18 reverse-phase solid phase extraction.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Over the decades, traditional olive oil industry has played very important role within national economy and culture of Mediterranean countries including Spain, Portugal, Italy or Morocco [1]. Olive oil has been reported as a primary consumption product and essential component of healthy diet for majority of people living in that area due to rich nutritional values, high antioxidant and monounsaturated fatty-acid content [2,3]. Considering its

* Corresponding author. Tel.: +33 0 468662255; fax: +33 0 468662223.

E-mail addresses: e.piletska@cranfield.ac.uk (E. Piletska), ihya.aitichou@gmail.com (I. Ait-Ichou), noguer@univ-perp.fr (T. Noguer), rouillon@univ-perp.fr (R. Rouillon).

beneficial properties and increasing worldwide distribution, there has been an extended demand for efficient cultivation and mass production of olive oil [4]. Beside relevant advances in production, there are some serious problems caused by different insects which attack and damage olive trees. One of them is the common olive oil fruit fly *Bactrocera oleae*, which induces an increase of acidity, affects fruits shelf life and decreases the yield of the olives. In order to protect trees from the infection and avoid significant losses in olive oil production, trees are usually treated with suitable pesticides which act as repellents against flies or other insects. Despite the advantages which agrochemicals offer for the improvement of the olive's yield, they still remain highly toxic and compromise the quality of olive oil. Therefore, regular monitoring and detection of these chemicals are essential for consumer protection and healthy diet [5].

The most extensively used agrochemicals in the cultivation of olives are organophosphorus insecticides [6]. They provide accurate, rapid and cost-effective treatment but become dangerous if applied at the harvest stage. The consumption of the contaminated olives may present a high risk for human health. Additionally, the majority of these pesticides are lipophilic and are able to remain in the oil for extended periods of time [7]. In order to decrease a potential risk of organophosphorus pesticides (OPs) and reduce their appearance in the food products European Union and the Codex Alimentarius Commission of the Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) have determined the maximum residue limits which are acceptable and not harmful to humans (MRLs) [4,6]. Since olive oil is a highly complex liquid which consists of triglycerides (98–99%) it is very challenging to find a suitable method which would allow a quick detection and a monitoring of the minimal concentration of pesticides. Among the popular strategies is an isolation or extraction of pesticides fraction from the fatty matrix [8].

In the past years, a most common method which was used for the detection of volatile pesticides has been gas chromatography (GC). GC coupled with mass-spectrometry detector (GC–MS/MS) was particularly suitable for accurate qualitative and quantitative analysis of oil samples [9]. Later the ion-trap mass analyser has been applied for detection of organophosphorus and pyrethroid pesticides [10,11]. More recently, triple quadrupole, flame photometric, nitrogen-phosphorus and electron-capture detectors have been used for determination of multi-class pesticide residues and were very successful due to their high efficiency, selectivity and sensitivity [12–17]. Although all these techniques demonstrate a good performance, they are compromised by complicated sample preparation and high cost of measurements.

Current trends for the control of the pollutants in olive oil are focused on the development of molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) which has already been successfully applied for pre-concentration and trace detection of various analytes in the environmental, clinical or food samples [18–24]. Most of the reported target analytes (e.g. templates) which were used for imprinting have been non-linear molecules, which provided additionally steric recognition [25–35]. In this work a cyclic molecule methidathion, which is commonly found in olive oil, was chosen as a template. To our knowledge, this is the first paper describing application of MIP-based method for the determination of methidathion in olive oil.

2. Experimental

2.1. Reagents

All chemicals including OPs (methidathion, malathion, dimethoate and fenthion), functional monomers (MBAA,

MAA, TFMMA and IA), cross-linker EGDMA, initiator 1,1'-azobisisobutyronitrile (AIBN), solvents (dimethylformamide (DMF), dichloromethane, methanol, acetonitrile, hexane, heptane) and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from Sigma–Aldrich (France). The 3 mL reservoir glass columns with frits were purchased from Chromabond (France).

2.2. Molecular modelling and computational design

The molecular modelling was performed using a workstation from Research Machines running the CentOS 5 GNU/Linux operating system, configured with a 3.2 GHz core 2 duo processor, 4 GB memory and running the SYBYL 7.3 software suite (Tripos Inc., St. Louis, Missouri, USA). A virtual library of 20 functional monomers was designed and screened against of molecular models of OPs (methidathion, malathion, fenthion and dimethoate) using LEAPFROG algorithm [36]. All structures were minimised and Gasteiger–Huckel charges were applied. The binding energies values of electrostatic, hydrophobic, Van der Waals forces, and dipole–dipole interactions were obtained. Monomers which gave the highest binding score were selected for the polymer preparation [37].

2.3. Synthesis of the imprinted polymers

A set of polymers was synthesised based on the results of the computational modelling. Several monomers (MBAA, IA, MAA and TFMMA) which showed the highest binding energy towards the template were selected. The molar ratio of template, functional monomer and cross-linker was 1:4:20 respectively. The polymer was synthesised by mixing 1 mM methidathion (template), 20 mM EGDMA (cross-linker), 40 mg of AIBN (initiator) and 4 mM of suitable monomer in 5 mL of DMF. The mixture was degassed with N₂ for 10 min, sealed in a glass bottle and thermally polymerised in oil bath at 80 °C for 12 h. After synthesis the polymer monolith was grounded and wet sieved with methanol to obtain particles with diameter 45–100 µm. Particles were collected, washed intensively using Soxhlet extraction with methanol/acetic acid solution (90/10, v/v), oven-dried and packed (50 mg) into glass SPE cartridges. Corresponding blank or non-imprinted polymers (NIPs) were prepared using the same protocol in the absence of template.

2.4. Solid phase extraction

MIPs and corresponding NIPs polymer particles (50 mg) were packed into 3 mL glass SPE cartridges between polyethylene frits. Before each experiment polymer was cleaned using 5 mL of methanol and reconditioned with corresponding loading solution.

In order to test the effect of different solvents on the polymer performance, the SPE cartridges were loaded with 1 mL of 1 mg L⁻¹ pesticide dissolved in acetonitrile, dichloromethane, heptane or hexane (flow rate- 1 drop per second). Additional studies were also performed in order to test the polymer's ability for pre-concentration of methidathion and to optimise the washing step. The adsorbed molecules were eluted by applying 1 mL of methanol/2% TFA solution. The eluted solution was evaporated at 50 °C using rotative evaporator and prior to HPLC analysis were reconstituted in 1 mL of acetonitrile/water (50/50, v/v).

In order to evaluate the polymer's binding capacity, SPE cartridges were loaded with 5 mL of different pesticide solutions with concentrations ranging from 0.02 to 2 mg L⁻¹.

The loading of the cartridges with 5 mL- and 10 mL- aliquots were also performed in order to evaluate the possibility to pre-concentrate the diluted concentrations of methidathion using MIP-based cartridge.

Table 1

Screening of a virtual library of functional monomers on their interaction with methidathion.

Functional monomers	Binding energy (kcal mol ⁻¹)
MBAA	-29.36
IA	-26.49
Acrylamide	-25.75
N,N-Diethylamino ethyl methacrylate (DEAEM)	-24.55
Acrylamido-2-methyl-1-propane sulfonic acid (AMPSA)	-18.22
Ethylene glycol methacrylate phosphate (EGMP)	-18.18
Uraconic acid (UA)	-17.74
TFMAA	-15.35
MAA	-14.78
EGDMA	-6.23

Regeneration of the SPE columns was performed by washing the polymer with 1 mL of methanol/0.1 M HCl solution followed by 5 mL of methanol at a flow rate of 2–3 drops per second. The experiments were carried out in triplicates, giving reproducible results with relative standard deviation (RSD) values ranging from 2% to 8%.

2.5. HPLC analysis

The quantification of pesticides was performed using an HPLC L-2000 series LaChrom Elite® system from Merck-Hitachi (VWR, France). Chromatographic separations were carried out with a C18 Supelcosil™ reverse phase column (250 × 4.6 mm, 5 µm) using acetonitrile/water mixture (50/50, v/v) as a mobile phase at flow rate 1 mL min⁻¹. The injection volume was 20 µL. Methidathion, malathion, fenthion and dimethoate were detected respectively at wavelengths 216, 220, 250, and 200 nm, and data acquisition was performed using EZchrom Elite software. Analysed samples (standards and recovered insecticide) were dissolved in the eluent phase (acetonitrile/water, 50/50, v/v). The quantification of organophosphorus pesticides (OPs) was conducted by measuring the peak area and comparing it with the relevant calibration curve. Standard solutions for the calibration curve were prepared by dilution of the stock solution with concentration of 1 g L⁻¹ in acetonitrile in the mobile phase solvent.

3. Results and discussion

3.1. Selection of functional monomer

Computational modelling was performed in order to predict the affinity of different polymers towards the template molecule (methidathion) and to select the best functional monomer which could be further used in the optimisation of MIP. It was expected that functional monomer which demonstrates the highest binding energy towards the template should produce the polymer with the highest affinity [36].

Accordingly the results of computational modelling MBAA was identified as the most promising monomer which could form strong interactions with methidathion (binding energy -29.36 kcal mol⁻¹) (Table 1). Other functional monomers which demonstrated high binding towards methidathion included IA, MAA and TFMAA. Control polymer which was made only with cross-linker EGDMA without any functional monomers was also prepared. Additionally, corresponding NIPs prepared in the absence of template were used in control measurements.

Table 2

Correlation between interaction energy (kcal mol⁻¹) of the molecular complexes between methidathion and functional monomers and imprinting factors (IF) of the MIPs prepared with corresponding monomers.

Number	Functional monomers	Binding energy (kcal mol ⁻¹)	IF
1	MBAA	-29.36	2.02
2	IA	-26.49	1.89
3	TFMAA	-15.35	1.23
4	MAA	-14.78	1.04
5	EGDMA	-6.23	0.73

The performance of each MIP was characterised by its imprinting factor:

$$\text{IF} = \frac{\text{[amount of bound methidathion/mg MIP]}}{\text{[amount of bound methidathion/mg NIP]}}$$

The affinity of MBAA-, IA-, MAA-, TFMAA- and EGDMA-based polymers towards methidathion was analysed by solid phase extraction (SPE). Solutions of methidathion in acetonitrile (2 mg L⁻¹) were loaded onto the polymeric cartridges and eluted. The concentration of pesticide was determined using an HPLC system. The experimental results (corresponding imprinting factors) were compared with values generated by computer modelling (Table 2). These data were in good correlation between experimental results and computer approximations. MBAA-based MIP demonstrated the largest imprinting factor (2.0) which correlated with highest binding energy between MBAA and methidathion molecule. At the same time MIP which was made only with cross-linker without any functional monomer demonstrated the lowest imprinting factor (0.73) which was in agreement with computational modelling (EGDMA, -6.23 kcal mol⁻¹). It was found that MBAA formed multiple point interactions with template which could explain its stronger binding as compared with MAA and IA monomers which only demonstrated a single point interactions, and cross-linker EGDMA which did not show any interactions. MBAA-template molecular complex was defined by hydrogen bonds between two nitrogen atoms of the MBAA and two oxygen atoms of methidathion (Fig. 1S). Thus, the experimental results confirmed the reliability of the computational method used in our studies and clearly indicated that MBAA is able to produce strong interactions with methidathion. This monomer was therefore selected and applied in all further experiments.

3.2. Performance of selected polymer in different solvents

Selected MBAA-based polymer was evaluated for its ability to bind methidathion in solvents with different polarity. Methidathion solutions were prepared in 1 mL of hexane, heptane, dichloromethane and acetonitrile, and loaded onto MIP and NIP-based SPE cartridges containing 50 mg of polymer. Adsorbed molecules were eluted using 1 mL of methanol/2% TFA solution and quantified using HPLC analysis. Results are listed in Table 3.

It was found that MBAA-based MIP showed higher ability to bind methidathion in non polar solvents such as hexane or heptane. Significant loss in its binding activity was observed for polar solvents, especially acetonitrile with only 42% adsorption. The same

Table 3

The effect of different solvents on the adsorption of methidathion.

Solvent	Adsorption (%)	
	MIP	NIP
Hexane	99 ± 2.1	100 ± 3.1
Heptane	100 ± 3.2	100 ± 4.7
Dichloromethane	80 ± 5.2	14 ± 3.8
Acetonitrile	42 ± 1.8	7 ± 3.3

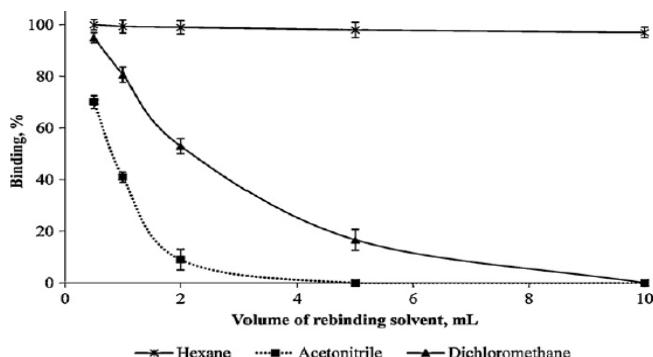


Fig. 1. Effect of the volume of loading solution on the binding of methidathion on the MIP-based polymer.

polymer bound 80% of methidathion in dichloromethane and 42% in acetonitrile. These results were consistent with those reported in literature showing that the strength of binding of analyte to the MIP increased with the decreasing polarity of the rebinding solvent [38]. NIP demonstrated similar to MIP adsorption of methidathion from heptane and hexane solutions, while its binding in dichloromethane and acetonitrile was reduced (respectively 14% and 7%). Therefore dichloromethane was considered as one of the potential solvents for the MIP-based methidathion extraction.

The capability of the MBAA-based MIP to pre-concentrate methidathion was tested by dissolving the same quantity of analyte (1 µg) in the different volumes of hexane and acetonitrile, which were used as models of non-polar and polar solvents. The solutions were loaded onto SPE cartridges containing 50 mg of polymer (Fig. 1). Additional measurements were also performed for dichloromethane.

Fig. 1 shows that in the presence of acetonitrile a significant loss in methidathion binding was observed when volume of the solvent increases from 0.5 to 10 mL. A similar behaviour was observed for dichloromethane. When a small volume (up to 0.5 mL) of methidathion was loaded into SPE cartridges, the percentages of adsorbed methidathion from acetonitrile and dichloromethane increased to 70% and 95%, respectively. Further increase in the volume of dichloromethane and acetonitrile solutions of methidathion resulted in subsequent loss of the MIP's binding activity. When the volume of loading solution increased to 10 mL, no more pesticide binding was observed. This behaviour could be explained by high solubility of methidathion in polar solvents. Hexane was shown to be the only solvent that did not demonstrate any dependence between the percentage of the methidathion adsorption and loading volume, as 100% of methidathion remaining adsorbed by the MIP. These results clearly indicate that hexane was the most suitable solvent for MIP extraction of methidathion from olive oil, therefore it was used in further experiments and optimisation of the SPE protocol.

3.3. Optimisation of washing solution

The washing procedure is a crucial step which could reduce the concentration of interfering compounds in the extracted solution and minimise non-specific interactions between analytes and imprinted polymer. It is important to ensure that the washing process should not affect the specific binding of methidathion to the polymer.

Initially SPE cartridges containing 50 mg of MBAA-based MIP or NIP polymers were conditioned with 5 mL of hexane and loaded with 1 mL of 1 mg L⁻¹ methidathion solution in hexane. Different

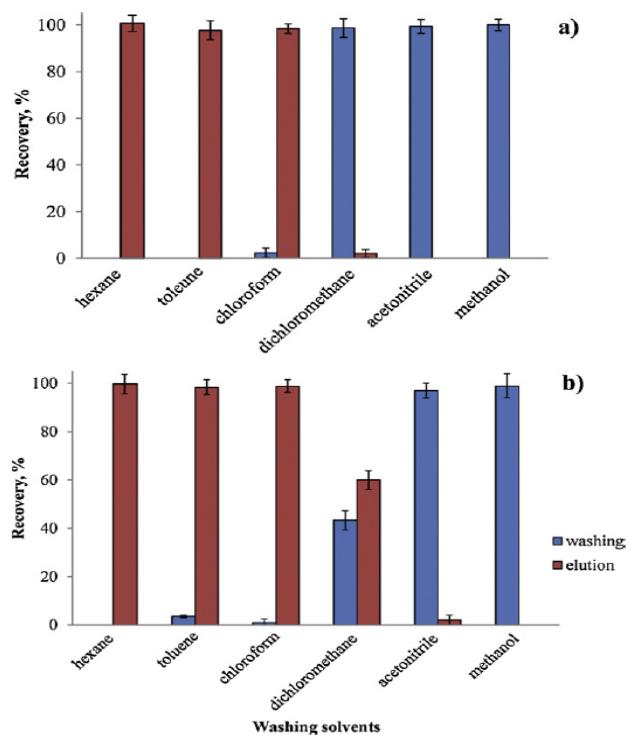


Fig. 2. Recovery of methidathion in the washing (blue) and elution (red) fractions after loading 1 mL of 1 mg L⁻¹ pesticide on NIP (a) and MIP cartridges (b). Washing step: 2 mL of the solvents; elution step: 1 mL of methanol/2% TFA. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article).

solvents were tested in order to optimise the washing procedure. Chloroform, toluene, dichloromethane, acetonitrile or methanol (2 mL) were loaded onto the columns, followed by pesticide elution with 1 mL of methanol/2% TFA. Both, washing and elution, fractions were collected and analysed using by reverse-phase chromatography. Fig. 2a shows that after washing of MBAA-based NIP with chloroform, hexane or toluene, all pesticide remained on the polymer, no methidathion being detected in the washing solution. It seems that low polarity organic solvents did not affect the non-specific binding of methidathion by polymer. In contrast, polar solvents like methanol, acetonitrile and dichloromethane demonstrated total removal of the pesticide, suggesting that non-specific binding could be efficiently reduced by using one of these solvents. The same experiment was performed using MBAA-based MIP which showed that acetonitrile and methanol strongly affected specific interactions removing the main amount of pesticide in the washing step (Fig. 2b). Promising results were obtained using dichloromethane, which facilitated the removal of all pesticide bound to NIP (Fig. 2a) but promoted specific interactions between methidathion and MIP (Fig. 2b). About 40% of the pesticide was removed from the cartridge after the washing step and about 60% after elution with methanol/2% TFA. This result indicated that dichloromethane could be very suitable for the MIP washing process.

Further experiments were performed in order to analyse the effect of different dichloromethane ratios in the washing solution (see Fig. 3a and b). The amount of dichloromethane contained in the dichloromethane:hexane washing mixture was varied in the

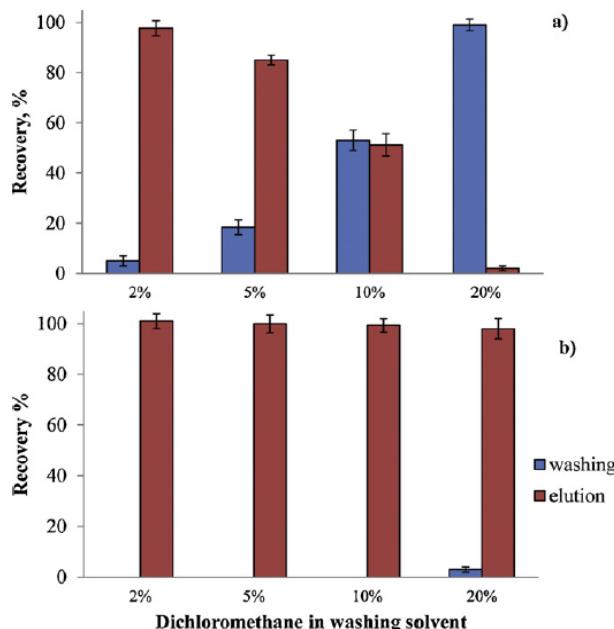


Fig. 3. Recovery of methidathion using NIP (a) and MIP (b) after loading 1 mL of 1 mg L⁻¹ pesticide and the polymer washing with different % of dichloromethane in hexane. In blue- washing and in red- elution with 1 mL methanol/2% TFA. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article).

range between 2 and 20%. Fig. 3a clearly illustrates the effect of dichloromethane on non-specific interactions when using NIP. It was found that low percentage of dichloromethane was not sufficient for the reduction of non-specific binding of methidathion to NIP. The increase of the dichloromethane concentration up to 10% and 20% allowed minimising the non-specific binding. This confirmed the results of previous experiments showing that 100% dichloromethane induced a total removal of methidathion from the NIP, whereas the pesticide bound specifically to the MIP was still retained on the column (Fig. 3b).

Fig. 3b shows the effect of washing solution using different dichloromethane ratios on the binding of methidathion on the MIP, followed by elution with 1 mL methanol/2% TFA solution. It appeared that washing the polymer with 80% hexane/20% dichloromethane was sufficient for removal of all methidathion molecules which were not specifically bound to the polymers (NIP and MIP), and that such washing did not affect specific interactions. It was also shown that 1 mL methanol/2% TFA solution can be used for the elution and total recovery of the target analyte. This protocol was therefore applied in all further experiments.

3.4. Evaluation of MIP selectivity and capacity

The evaluation of the selectivity of MBAA-based MIP was carried out using three different OPs: fenthion, malathion and dimethoate (Fig. 4). Pesticide solution (1 mL of 1 mg L⁻¹ in hexane) was loaded onto SPE cartridges which were packed with 50 mg of MIP or corresponding NIP. The analysis was performed using HPLC equipped with UV detector. Table 4 shows recovery rates (%) of OPs after SPE washing and elution steps. It was shown that some small quantity of pesticides which were retained by the NIP was completely removed during the washing step. In comparison, MBAA-based MIP retained 98% of methidathion, while dimethoate was only partially retained (62%) and the other two pesticides were not retained at all (malathion and fenthion). Since MBAA-based MIP cannot bind

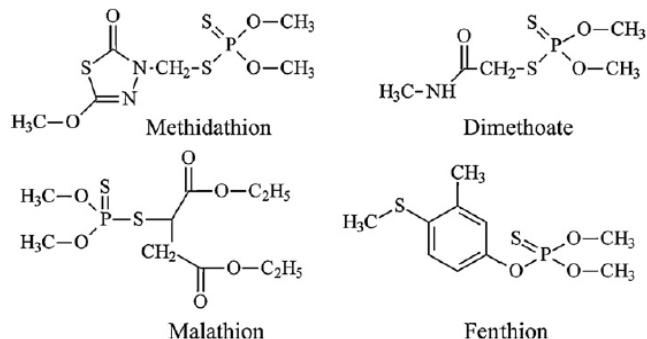


Fig. 4. Chemical structures of OPs insecticides used in oleiculture.

malathion and fenthion, it suggests about polymer's high selectivity towards methidathion. This could be explained by its unique molecular structure which is quite different from the three others.

The evaluation of MIP capacity was performed by determining the maximum amount of methidathion that can be retained on the polymer. Increasing amounts of methidathion in hexane solution were loaded on SPE cartridges containing 50 mg of MBAA-based MIP. The curve presented in Fig. 5 shows the correlation between the amounts of methidathion extracted (per g of adsorbent) using the MIP and the amounts of pesticide initially applied. A full recovery of methidathion was observed for loadings ranging from 0.1 to 9 µg.

3.5. Extraction of methidathion from olive oil

Commercially available extra virgin olive oil was purchased in a local supermarket and spiked with known concentration of methidathion in hexane. The mixture was incubated at 45 °C for 30 min while stirring. Then 1 mL of oil which contained 1 µg of methidathion was diluted in 9 mL of hexane and passed through SPE cartridges containing either NIP or imprinted MBAA-based polymer. All interfering components present in olive oil were removed using SPE method which was optimised for methidathion extraction. The cartridges were washed with 2 mL of hexane containing 20% dichloromethane and eluted with 1 mL of methanol/2% TFA solution. Typical HPLC chromatogram of olive oil washing out solution is shown in Fig. 6b. It was found that the retention time for the methidathion was around 10 min. The quantitative recovery from oil samples spiked with 1 mg L⁻¹ methidathion was 88.5% for MIP and 5.6% for the NIP. These results show that the designed MIP was efficient for the extraction of methidathion from a complex matrix like olive oil. It must be highlighted that the main quantity of pesticide was extracted in the first millilitre of eluent.

In order to validate the methodology and confirm its potential for the sample clean-up, the MIP was applied to the extraction of olive oil samples spiked with different concentrations of

Table 4
Recovery rates (%) obtained after loading 1 mL of 1 mg L⁻¹ pesticide solution onto MIPs and NIPs.

Analytes	NIP		MIP	
	Washing	Elution	Washing	Elution
Methidathion	99 ± 3	nd ^a	nd	98 ± 3
Dimethoate	98 ± 3	nd	42 ± 6	62 ± 6
Malathion	100 ± 3	nd	97 ± 5	nd
Fenthion	99 ± 3	nd	99 ± 3	nd

^a nd – Not detectable.

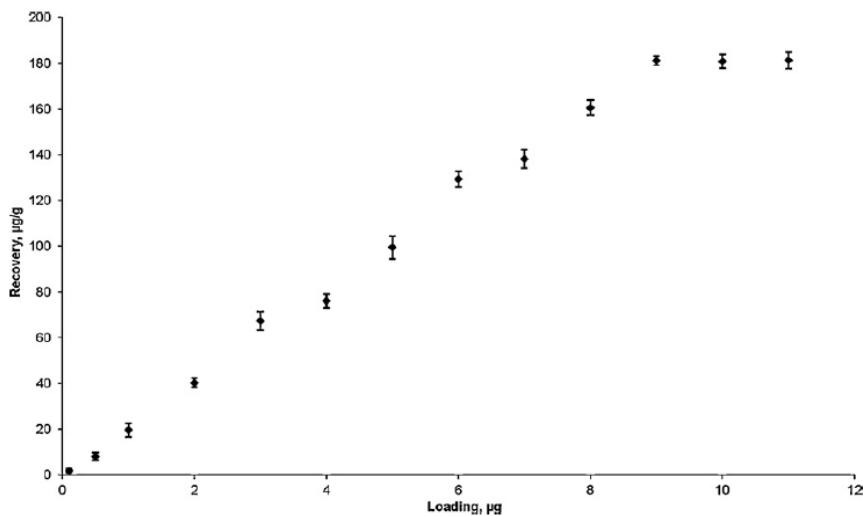


Fig. 5. Capacity curve for 5 mL of hexane spiked with different amounts of methidathion during its loading and recovery.

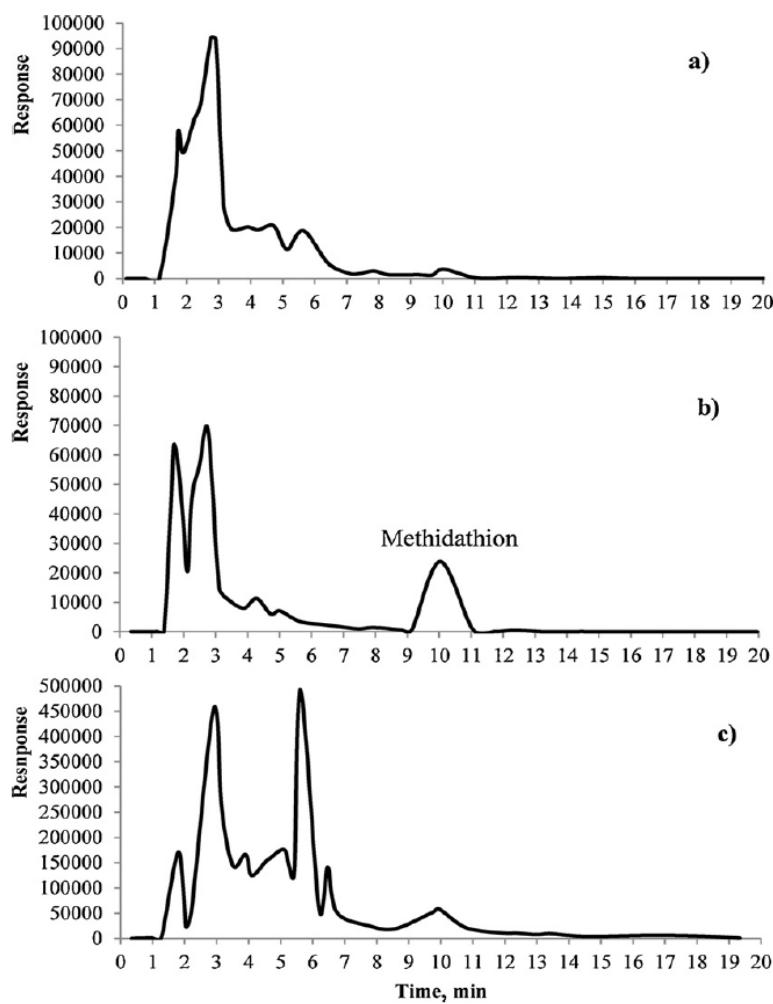


Fig. 6. Chromatograms obtained after extraction of olive oil spiked with 1 mg L^{-1} of methidathion in hexane on NIP cartridge (a), MIP cartridge (b), and on C18-silica SPE cartridge (c). Detection wavelength 216 nm, retention time of methidathion: 10 min.

methidathion (each point repeated for 3 times). The direct correlation between peak areas and concentrations was found over the range of 0.1–9 mg L⁻¹ with a linear regression coefficient (R^2) of 0.996. The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) in olive oil were 0.02 and 0.1 mg L⁻¹, respectively.

In parallel, methidathion-spiked samples were also analysed following liquid/liquid extraction using acetonitrile, and SPE which was performed using C18 column. The performances of MISPE and C18 cartridges were compared in Fig. 6. As can be observed from the chromatograms, a worse baseline was obtained when samples were extracted using C18 column (Fig. 6c). The extraction using MIP-based SPE was shown to be much more selective, providing a cleaner extract containing predominantly methidathion (Fig. 6b). The comparison of two extraction methods clearly demonstrated the advantage of using molecularly imprinted polymers as selective adsorbents for the determination of methidathion. MIPs extraction was much easier to perform as compared with the traditional extraction procedure and showed higher recovery values. Also it was possible to re-use MIP-based SPE columns many times without any deterioration.

4. Conclusion

This study shows the possibility of using molecularly imprinted polymers for the efficient and selective extraction of methidathion from olive oil. Experimental results confirmed that the polymers based on the functional monomer MBAA, which was selected by computational modelling, demonstrated highest affinity for methidathion. A comprehensive study of MIP's performance under various conditions was conducted in order to characterise the polymer and produce the optimal SPE protocol for the binding of methidathion. It is necessary to stress that integration of all important parameters was crucial factor for successful development and optimisation of the protocol for extraction of methidathion from such complex matrix like olive oil. The proposed method proved to be highly accurate, quick and inexpensive. The MISPE method was shown to be more selective to methidathion than the conventional SPE method.

Acknowledgments

Authors acknowledge with gratitude «Volubilis» Hubert Curien programme and its financial support for the project MA/09/215 (Association biocapteurs-matériaux à empreinte moléculaire pour la détection des insecticides utilisés sur l'olivier).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.013>.

References

- [1] United Nations Conference on Trade and Development (UNCTAD), Based on data from Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO), 2003.
- [2] D. Boskou, Olive Oil: Chemistry and Technology, AOCS Press, Champaign, Illinois, 1996.
- [3] US Food and Drug Administration, News, November 2004 (www.fda.gov/bbs/topics/news/2004/NEW01129.html).
- [4] F. Luchetti, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 104 (2002) 559–563.
- [5] C. Lentza-Rizos, Grasas Aceites 47 (1996) 392–396.
- [6] C. Lentza-Rizos, E.J. Avramides, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 141 (1995) 111–134.
- [7] P. Cabras, A. Angioni, V.L. Garau, M. Melis, F.M. Pirisi, M. Karim, E.V. Minewlli, J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 2244.
- [8] M. López-Mesas, M. Crespi, Grasas Aceites 51 (2000) 183–189.
- [9] J.F. García Reyes, C. Ferrer, M.J. Gómez Ramos, A. Molina Díaz, A.R. Fernández Alba, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 239–251.
- [10] M. Guardia Rubio, M.L. Fernández De Córdoba, M.J. Ayora Cañada, A. Ruiz Medina, J. Chromatogr. A 1108 (2006) 231–239.
- [11] F.A. Esteve Turrillas, A. Pastor, M. de la Guardia, Anal. Chim. Acta 553 (2005) 50–57.
- [12] A. Garrido Frenich, J.L. Fernández Moreno, J.L. Martínez Vidal, F.J. Arreola Liébanas, J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 8346–8352.
- [13] G. Dugo, G. Di Bella, L. La Torre, M. Saitta, Food Control 16 (2005) 435–438.
- [14] LL. Zhiqiang Zhou, C. Pan, C. Qian, S. Jiang, F. Liu, J. Chromatogr. B 66 (2007) 625–629.
- [15] E.G. Amvrazi, T.A. Albanis, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 9642–9651.
- [16] C. Yagüe, S. Bayarri, P. Conchello, R. Lázaro, C. Pérez-Arquillué, A. Herrera, A. Ariño, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 5105–5119.
- [17] E.M. Díaz Plaza, J.M. Cortés, A. Vázquez, J. Villén, J. Chromatogr. A 1174 (2007) 145–150.
- [18] E. Caro, N. Masque, R.M. Marce, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, J. Chromatogr. A 963 (2002) 169–178.
- [19] K. Hosoya, K. Yoshizako, H. Sasaki, K. Kimata, N. Tanaka, J. Chromatogr. A 828 (1998) 91–94.
- [20] E.P.C. Lai, S.G. Wu, Anal. Chim. Acta 481 (2003) 165–174.
- [21] P.D. Martin, G.R. Jones, F. Stringer, I.D. Wilson, J. Pharm. Biomed. Anal. 35 (2004) 1231–1239.
- [22] S.G. Hu, L. Li, X.W. He, Anal. Chim. Acta 537 (2005) 215–222.
- [23] F. Puoci, C. Garreffa, F. lemma, R. Muzzalupo, U.G. Spizzirri, Food Chem. 93 (2005) 349–353.
- [24] M.L. Zhang, J.P. Xie, Q. Zhou, G.Q. Chen, Z. Liu, J. Chromatogr. A 984 (2003) 173–183.
- [25] B. Sellergren, Trends Anal. Chem. 18 (1999) 164–174.
- [26] K. Karim, F. Breton, R. Rouillon, E.V. Piletska, A. Guerreiro, I. Chianella, S.A. Piletsky, Adv. Drug Delivery Rev. 57 (2005) 1795–1808.
- [27] I.A. Nicholls, K. Adbo, H.S. Andersson, P.O. Andersson, J. Ankarloo, J. Hedin Dahlström, P. Jokela, J.G. Karlsson, L. Olofsson, J.P. Rosengren, S. Shoravi, J. Svenson, S. Wikman, Anal. Chim. Acta 435 (2001) 9–18.
- [28] M.J. Whitcombe, L. Martin, E.N. Vulson, J. Chromatogr. A 47 (1998) 457–464.
- [29] J. Svenson, J.G. Karlsson, I.A. Nicholls, J. Chromatogr. A 1024 (2004) 39–44.
- [30] T. Sagawa, K. Togo, C. Miyahara, H. Ihara, K. Ohkubo, Anal. Chim. Acta 504 (2004) 37–41.
- [31] J. O'Mahony, A. Molinelli, K. Nolan, M.R. Smyth, B. Mizaikoff, Biosens. Bioelectron. 20 (2005) 1884–1893.
- [32] B.J. Brune, J.A. Koehler, P.J. Smith, G.F. Payne, Langmuir 15 (1999) 3987–3992.
- [33] S. Striegler, E. Tewes, Eur. J. Inorg. Chem. 2 (2002) 487–495.
- [34] T. Takeuchi, D. Fukuma, J. Matsui, Anal. Chem. 71 (1999) 285–290.
- [35] F. Lanza, B. Sellergren, Anal. Chem. 71 (1999) 2092–2096.
- [36] S.A. Piletsky, B. Sellergren, Analyst 126 (2001) 1826–1830.
- [37] F. Breton, R. Rouillon, E.V. Piletska, K. Karim, A. Guerreiro, I. Chianella, S.A. Piletsky, Biosens. Bioelectron. 22 (2007) 1948–1954.
- [38] B. Sellergren, L.I. Andersson, Methods 22 (2000) 92–106.

Publications

Food Control 30 (2013) 657–661



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont



Sol–gel immobilization of acetylcholinesterase for the determination of organophosphate pesticides in olive oil with biosensors

Najwa Ben Oujji ^{a,b}, Idriss Bakas ^{a,b}, Georges Istamboulié ^a, Ihya Ait-Ichou ^b, Elhabib Ait-Addi ^b, Régis Rouillon ^a, Thierry Noguer ^{a,*}

^a University of Perpignan, IMAGES EA 4218, Building S 52 Av Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

^b University Ibn Zohr, AQUAMAR, Photocatalysis and Environment Team, Chemistry Department, Faculty of Science, BP 8106 Cité Dakhla, Agadir, Morocco

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2012

Received in revised form

31 August 2012

Accepted 3 September 2012

Keywords:

Electric eel acetylcholinesterase

Organophosphorus insecticides

Sol–gel

Amperometric biosensors

Olive oil

Screen-printed electrodes

ABSTRACT

This paper presents the construction of amperometric biosensors for the detection of organophosphorus insecticides widely used in the treatment of olive trees. The systems are based on the immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes by bioencapsulation in a sol–gel composite. The enzyme activity was estimated by measuring the thiocholine produced by the enzymatic hydrolysis of the acetylthiocholine chloride using cobalt phtalocyanine as mediator. The developed devices have been used to carry out inhibition studies with three pesticides: malathion, methidathion and dimethoate (in their oxidized form), and tested using standard solutions and real samples of olive oil. These biosensors showed good operational stability as they maintained their initial analytical signal response during 10 successive measurements, and a good reproducibility with a relative standard deviation of 3%. The limits of detection of the developed devices were very compatible with the maximum residue limit tolerated by international regulations, they were as low as 10^{-9} M for the widely used pesticide malaoxon (oxidized malathion). The developed sensors were successfully used for the determinations of insecticides in real samples of olive oil.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The extensive use of organophosphorus and carbamate insecticides in modern agriculture has raised serious public concern regarding the environment and food safety. In the field of olive oil, insecticide treatments are applied every year to control the fly population, mainly based on pesticides belonging to the class of organophosphates. These chemicals allow crop protection of olive trees, however their residues detected in the oil and fruits are a major risk for consumer health. Therefore, both European Union and the Codex Alimentarius Commission of the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations have established maximum pesticide residues limits (MRLs) for olives and olive oil (Lentza-Rizos & Avramides, 1995; Luchetti, 2002). Concerning the three pesticides used in this study, the MRLs are in order of 0.5 mg/kg for malathion, 2 mg/kg for dimethoate and 1 mg/kg for the methidathion, according to the French Department of Agriculture

and Agri-Food (AF920805) (2012). As for olive oil, these MRLs correspond to molar concentrations ranging from $1.7 \cdot 10^{-6}$ M (malathion) to $9.7 \cdot 10^{-6}$ M (dimethoate).

In the last years, growing attention has been paid to the development of reliable, fast and low cost analytical systems to monitor pesticides from environmental and food industry. Chromatographic techniques (GC, HPLC) generally coupled with UV or MS detectors are currently used as reference methods and allow the detection of a wide range of pollutants with a very high sensitivity, reliability and precision. In spite of their advantages, these techniques require expensive instrumentation and highly trained personnel, are time consuming, and are not easily adapted to in field analysis (Andreescu, Barthelmebs, & Marty, 2002). New technologies based on biological detection systems have emerged and can be a good alternative for these classical methods. Among these techniques, biosensors have been shown to be very promising due to their simplicity and cost effectiveness compared to conventional techniques.

Biosensors are analytical devices which tightly combine bio-recognition elements and physical transducers for detection of target compounds. In enzyme-based biosensors, the biological element is the enzyme which reacts selectively with its substrate

* Corresponding author. Tel.: +33 (0) 4 68 66 22 55; fax: +33 (0) 4 68 66 22 23.
E-mail addresses: najwa_benoujji@hotmail.com (N. Ben Oujji), ihya.aitichou@gmail.com (I. Ait-Ichou), noguer@univ-perp.fr (T. Noguer).

(Guilbault, Pravda, & Kreuzer, 2004). Amperometric biosensors based on inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity have been extensively studied to detect the presence of organophosphate pesticides in various kinds of samples (Andreas & Marty, 2006; Istambouli, Cortina-Puig, Marty, & Noguer, 2009).

This work describes the development of a cheap, fast and simple amperometric biosensor based on the inhibition of AChE for the detection of three organophosphorus insecticides commonly used for the treatment of olive trees: Malathion, Dimethoate and Methidathion in their oxidized forms (Fig. 1). The sensor was designed for the fast detection of insecticides contained in olive oil after a simple liquid–liquid extraction. Previous works have described the development of amperometric and optical biosensors based on the immobilisation of AChE on magnetic microbeads by covalent coupling which had a good analytical performance with reasonable reproducibility and stability (Ben Oujji et al., 2012). This work aims to enhance the performance of the previously described systems by optimizing the immobilisation procedure of AChE on low-cost screen-printed electrodes using sol–gel entrapment. The general principle of the sensing device is shown in Fig. 2. To our knowledge it is the first description of a sol–gel based biosensor for the detection of these pesticides in olive oil.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and stock solutions

AChE (EC 3.1.1.7) from electric eel (EE) (Type V-S, 1000 U/mg) was purchased from Sigma–Aldrich (St Quentin–Fallavier, France). Acetylthiocholine chloride (Sigma–Aldrich) solutions were prepared daily in 0.9% NaCl (Sigma–Aldrich) in order to minimize hydrolysis. Stock solutions of enzymes were prepared in 0.1 M phosphate buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, Sigma–Aldrich) at pH 7. The organophosphorus insecticides malaoxon, omethoate and methidathion were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Pesticide stock solutions (concentration 10^{-3} M) were prepared in acetonitrile (Sigma–Aldrich) and stored at 4 °C, pesticide solutions were prepared daily in distilled water by dilution of the stock solution. The oxidation of methidathion was obtained using N-bromosuccinimide provided by Sigma–Aldrich. Sol–gel matrices were prepared using tetramethoxysilane (TMOS), poly(ethyleneglycol) 600 (PEG), hydroxyethyl-cellulose (HEC) (Sigma–Aldrich) and hydrochloric acid (HCl) (Carlo Erba, Italy). Graphite (Electrodag 423SS) and silver/silver chloride (Electrodag 418SS) inks were obtained from Acheson (Plymouth, UK). Cobalt phthalocyanine-modified carbon paste was purchased from Gwent Electronic Materials, Ltd. (Gwent, UK). Poly(vinyl)chloride (PVC) sheets (200 mm × 100 mm × 0.5 mm), supplied by SKK (Denzlingen, Germany), were used as support for the screen-printed electrodes. A glycerophtalic paint (Astral, France) was used as insulating layer.

2.2. Apparatus

The determination of AChE activity was carried out with a Hewlett Packard diode array 8451A spectrophotometer. Screen-

printed electrodes were produced using a semi-automatic DEK248 printing machine according to a procedure previously described (Andreas et al., 2002), but in a three-electrode configuration. The working electrode was a 4 mm-diameter disk, the auxiliary electrode was a 16 mm × 1.5 mm curved track and the Ag/AgCl pseudo-reference electrode was a 5 mm × 1.5 mm straight track. Amperometric measurements were carried out with a 641VA potentiostat (Metrohm, Switzerland), a constant potential of 100 mV was applied between screen-printed working and reference (Ag/AgCl) electrodes. The current was measured using a BD40 (Kipp & Zonen, The Netherlands) flatbed recorder.

2.3. Encapsulation in sol–gel

Among several industrial applications, sol–gel is a well-known technology for building physical matrices dedicated to enzyme immobilization (Brinker & Sheerer, 1990). Sol–gel has been used to entrap a wide variety of biological species, including enzymes and live microorganisms for different applications (Alvarez, Desimone, & Diaz, 2007; Andreas et al., 2002). Sol–gel immobilization has been shown to improve the stability and catalytic activity of the biomolecules.

Sol–gel process involves hydrolysis of alkoxide precursors under acidic conditions followed by condensation of the hydroxylated units, which leads to the formation of a porous gel. First, a low-molecular weight metal alkoxide precursor molecule such as tetramethoxysilane (TMOS) or tetraethoxysilane (TEOS) is hydrolysed in the presence of water at acidic pH, resulting in the formation of (Si–OH) groups. In a second step, the condensation reaction between silanol moieties at alkaline pH results in the formation of siloxane (Si–O–Si) polymers, creating a matrix in which an enzyme can be successfully entrapped (Sassolas, Blum, & Leca-Bouvier, 2012) (Fig. 3). In some cases, the cracking of the sol–gel polymers can be prevented using doping agents such as poly(ethyleneglycol).

In this work the protocol of immobilisation was the following: the sol–gel solution was prepared by mixing 150 µL of the precursor tetramethoxysilane (TMOS) with 413 µL of distilled water, 400 µL of HCl 1 mM, and 37 µL of PEG 600. This mixture was sonicated for 15 min and stored for one night at 4 °C. The enzymatic solution prepared in phosphate buffer (pH 8) was mixed 1:1 (v/v) with HEC (2%). Then, this solution was mixed with the sol–gel in a ratio 2:1 (v/v) (Hayat, Barthelemebs, & Marty, 2012). 2 µL of the obtained solution was quickly deposited on the surface of the working electrode, and allowed to dry for 3 h at room temperature. The amount of enzyme entrapped on each electrode was 3 mIU.

2.4. Determination of acetylcholinesterase activity

Before immobilization, enzymatic activity of AChE was determined using the Ellman's method (Ellman, Courtney, Andres, & Featherstone, 1961), based on the reaction between the enzymatic reaction product thiocholine with DTNB, which leads to the formation of a yellow compound (5-thio-2-nitrobenzoate) that can be spectrophotometrically detected at 412 nm.

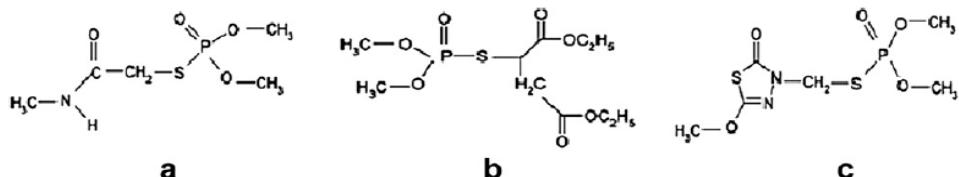


Fig. 1. Structure of organophosphates insecticides used in this study in their oxidized forms: (a) omethoate; (b) malaoxon; (c) methidathion oxide.

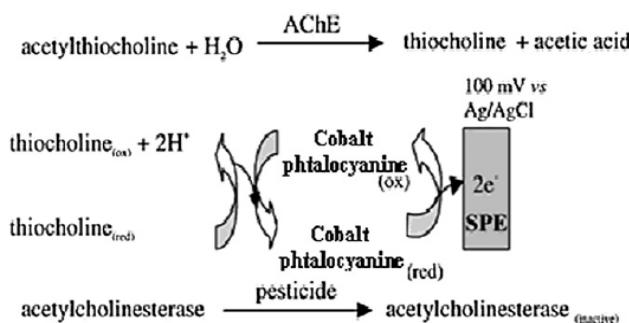


Fig. 2. Principle of the amperometric detection of acetylcholinesterase activity using cobalt phthalocyanine as mediator.

2.5. Determination of the inhibition constant k_i

The mechanism of inhibition of AChE by organophosphate compounds is well-known (Aldridge, 1950). In this work, the inhibition constant k_i was calculated using immobilized enzyme, the calculation procedure was as follows: AChE-based sensors were incubated for 0, 1, 3, 5, 8 and 10 min with different concentrations of pesticides, the enzyme activity was then determined according to the amperometric procedure as described in § 2.6. The residual activity of AChE was calculated by comparing the slope of obtained kinetics before and after inhibition. The graphs obtained by plotting log of residual activity versus incubation time for each inhibitor showed a linear representation. The apparent reaction rate k_{obs} (min^{-1}) were obtained by measuring the slope of this straight line. Plotting $1/k_{\text{obs}}$ versus $1/[I]$ allowed calculating the inhibition constant k_i , which corresponds to the reciprocal value of the obtained slope.

2.6. Amperometric measurements

The screen-printed electrode system was vertically immersed in a thermostated cell (30°C) containing 10 mL phosphate buffer pH 7 under constant magnetic stirring (260 rpm). The applied potential was 100 mV versus Ag/AgCl reference electrode, using cobalt phthalocyanine as mediator. The current intensity was recorded and, after current stabilisation, 1 mM ATCh (final concentration) was added in the cell. The measured signal corresponded to the difference of current intensity between the baseline and the plateau. The cell was washed with distilled water between measurements.

The pesticide detection was made in a three-step procedure as follows: first, the initial response of the electrode to 1 mM ATCh was recorded three times, then the electrode was incubated in a solution containing a known concentration of insecticide, and finally the residual response of the electrode was recorded again. Electrodes were thoroughly washed with distilled water between

each measurement. The percentage of the inhibition was correlated with the insecticide concentration, the inhibition rate was calculated according to the following formula: $I (\%) = [(I_0 - I)/I_0]100$, I and I_0 being respectively the current after the and before inhibition.

2.7. Extraction of pesticides from olive oil

Before assays, the pesticides were extracted using a simple liquid–liquid extraction procedure as follows: 10 mL of a commercially available bio extra virgin olive oil purchased in a local supermarket was spiked with a known concentration of pesticide diluted in hexane. The mixture was heated at 50°C for 30 min, and 500 μL of this olive oil was added to 400 μL of acetonitrile and 100 μL of dichloromethane. The mixture was centrifuged at 13,400 rpm for 90 s and the resulting supernatant was recovered and used as a pesticide mother solution.

3. Results and discussion

3.1. Determination of the inhibition constant k_i

The inhibition constant k_i is proportional to the affinity of the pesticide for the enzyme and its inhibitory power. k_i is therefore a fundamental parameter to compare the inhibitory potency of insecticides and assess the sensitivity of the enzymes studied. Using the immobilized enzyme, inhibition constants of 0.3, 1.7 and $0.004 \mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ were found respectively for oxidized methidathion, malaoxon and omethoate. These data clearly show that the acetylcholinesterase of electric eel was inhibited most strongly by the malaoxon and the oxidised methidathion but very weakly by omethoate. When compared to the k_i of free AChE (Ben Oujji et al., 2012), the k_i values of immobilized AChE were slightly lowered, probably due to the sol–gel network which acts as a barrier that slows down the diffusion of the inhibitor to the enzyme.

3.2. Oxidation of methidathion

This study focuses on the detection of oxidized forms of organophosphate insecticides, which are less stable but more toxic than the normal forms. The oxidized forms of dimethoate and malathion, respectively called omethoate and malaoxon are commercially available, but in the case of methidathion an oxidation step must be carried out using N-bromosuccinimide (NBS) (Bavcon Kralj, Trebše, & Franko, 2006). The efficiency of this oxidation step was controlled using reverse-phase HPLC, it was shown that 3.10^{-5} M NBS was sufficient for the total oxidation of a 10^{-5} M methidathion solution. The effect of NBS on AChE has been also investigated to ensure that the enzyme was not affected by the oxidizing agent, it was shown that in assays conditions NBS did not inhibit AChE.

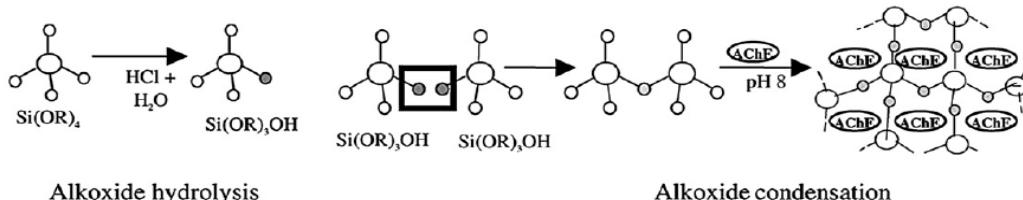


Fig. 3. General principle of sol–gel encapsulation method.

Publications

Table 1

Performances of the developed enzymatic sensor for the detection of omethoate, methidathion (oxidized form) and malaoxon. LOD (IC_{10}), IC_{50} and IC_0 are the concentrations of pesticides inducing respectively 10%, 50% and 0% decrease of the signal.

Pesticide	Equation	R^2	IC_0 (M)	IC_{10} (M)	IC_{50} (M)	Dynamic range (M)
Omethoate	$I = 13.859 \ln(C) + 203.83$	0.985	4.0×10^{-7}	4.3×10^{-7}	1.5×10^{-5}	7.5×10^{-5} – 2.5×10^{-6}
Methidathion	$I = 22.796 \ln(C) + 413.91$	0.990	1.3×10^{-8}	2.0×10^{-8}	1.1×10^{-7}	5×10^{-6} – 5×10^{-8}
Malaoxon	$I = 18.366 \ln(C) + 366.74$	0.982	2.1×10^{-9}	3.6×10^{-9}	3.2×10^{-8}	5×10^{-7} – 10^{-8}

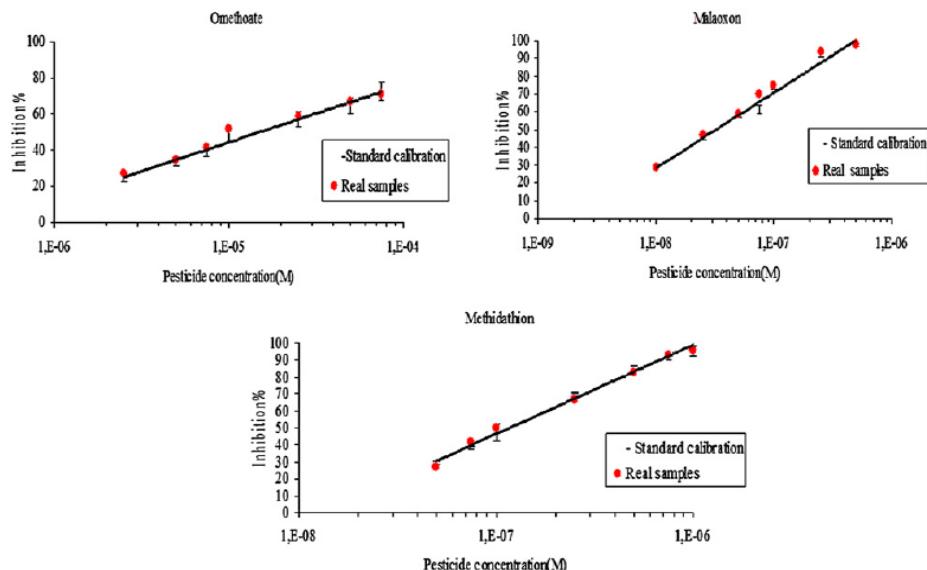


Fig. 4. Detection of omethoate, methidathion and malaoxon in olive oil real samples (●), comparison with the standard curves (straight lines).

3.3. Detection of organophosphates by amperometric method

Operational stability and reproducibility of the developed biosensors was tested to ensure that any decrease in the signal was related to enzyme inactivation by pesticides and not to enzyme leakage. The stability was estimated by repetitive measurements of the response of a single electrode to 1 mM ACh, with intermediate rinses with distilled water. The biosensors showed a good operational stability, as they maintained their initial analytical signal response during 10 successive measurements. The electrodes response for successive substrate injection was $450 \text{ nA} \pm 15 \text{ nA}$ for 10 assays, indicating a good reproducibility of measurements. Inhibition reproducibility experiments were carried out by measuring 5 times the inhibition percentage produced by 10^{-8} M of malaoxon, the obtained results showed a good reproducibility of the developed device with a relative standard deviation (R.S.D.) of 3% ($324 \pm 10 \text{ nA}$). Concerning storage stability, no loss of activity was observed after 1 month storage at -18°C , providing that the electrodes were kept in sealed plastic bags.

Calibration curves were obtained for the three pesticides by incubating the biosensors in insecticide solution of known concentration for 10 min. As expected, the biosensor displayed a very low limit of detection for malaoxon and methidathion, while omethoate was detected with a lower sensitivity (Table 1).

We have described in previous work the immobilisation of electric eel acetylcholinesterase by covalent coupling on magnetic microbeads (Ben Oujji et al., 2012). The current work demonstrates that biosensors based on the immobilisation of AChE in a sol–gel matrix are more reproducible and stable than those obtained by the immobilisation on magnetic beads, probably due to the absence of the

glutaraldehyde coupling agent which may induce a partial denaturation of the protein. Despite this difference, the sensitivities of the biosensors made according to the two immobilization methods were very similar, as the limits of detection found using the magnetic beads as immobilisation method were in the order of 5.10^{-6} M for omethoate, 10^{-8} M for methidathion and 10^{-9} M for malaoxon.

3.4. Application to real samples

In order to demonstrate their viability, the developed biosensors were applied to the detection of insecticides extracted from spiked olive oil. A blank assay was previously performed in order to verify that any other insecticide was already present in the olive oil. The unspiked olive oil revealed no inhibition effect, whereas the spiked samples exhibit the same inhibition degrees as using the standard solutions (Fig. 4). The recovery percentage of insecticides from the spiked samples was almost 100% for all the pesticides concentration tested, demonstrating the good analytical performance of the developed device for the detection of these pesticides in real samples.

4. Conclusions

A cheap, fast and simple amperometric biosensor was developed based on the immobilisation of a low amount of the acetylcholinesterase by encapsulation in a sol–gel matrix on a screen-printed electrode. The device was applied to the detection of three organophosphorus insecticides mostly used for the treatment of olive trees: malathion, dimethoate and methidathion. The biosensor measurement was performed without a laborious

sample pre-treatment, after a simple liquid–liquid extraction from olive oil. The results showed a good performance of the biosensors with reasonable limits of detection, as well as good reproducibility and stability and a good lifetime when stored at –18 °C. This study highlighted the low sensitivity of the electric eel acetylcholinesterase for omethoate compared to malaoxon and oxidized methidathion, which lead to detection limits as low as 10^{–9} M. The analysis of spiked olive oil samples showed a good correlation with the results obtained using standards solutions, with almost 100% of recovery percentage.

Acknowledgements

Ben Oujji Najwa would like to express gratitude to Averroès programme (EC programme Erasmus Mundus) for granting this work.

References

- Aldridge, W. N. (1950). Some properties of specific cholinesterases with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues. *Biochemical Journal*, 46, 451–456.
- Alvarez, G. S., Desimone, M. F., & Diaz, L. E. (2007). Immobilization of bacteria in silica matrices using citric acid in the sol-gel process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1059–1064.
- Andreascu, S., & Marty, J. L. (2006). Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications. *Biomolecular Engineering*, 23, 1–15.
- Andreascu, S., Barthelmebs, L., & Marty, J.-L. (2002). Immobilisation of AChE on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilisation methods: applications to the detection of organophosphorus insecticides. *Analytica Chimica Acta*, 464, 171–180.
- Bavcon Kralj, M., Trebše, P., & Franko, M. (2006). Oxidation as a pre-step in determination of organophosphorus compounds by the AChE-TLS bioassay. *Acta Chimica Slovenica*, 53, 43–51.
- Ben Oujji, N., Bakas, I., Istamboulié, G., Ait-Ichou, I., Ait-Addi, E., Rouillon, R., et al. (2012). Acetylcholinesterase immobilized on magnetic beads for pesticides detection: application to olive oil analysis. *Sensors*, 12, 7893–7904.
- Brinker, C. J., & Sheerer, G. W. (1990). *Sol-gel science. The physics and chemistry of sol-gel processing*. San Diego: Academic Press.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95.
- French Department of Agriculture and Agri-Food (AF920805). (2012). Source=MAP/e-phy 22/08/2012.
- Guilbault, G. G., Pravda, M., & Kreuzer, M. (2004). Biosensors-42 years and counting. *Analytical Letters*, 37, 14481–14496.
- Hayat, A., Barthelmebs, L., & Marty, J.-L. (2012). A simple colorimetric enzymatic-assay for okadaic acid detection based on the immobilization of protein phosphatase 2A in sol-gel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 47–56.
- Istamboulié, G., Cortina-Puig, M., Marty, J.-L., & Noguer, T. (2009). The use of artificial neural networks for the selective detection of two organophosphate insecticides: chlorpyrifos and chlорfenvinfos. *Talanta*, 79, 507–511.
- Lentza-Rizos, C., & Avramides, E. J. (1995). Pesticide residues in olive oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 141, 111–134.
- Luchetti, F. (2002). Importance and future of olive oil in the world market – an introduction to olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 559–563.
- Sassolas, A., Blum, L.-J., & Leca-Bouvier, B.-D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30, 489–511.

Publications

Sensors **2012**, *12*, 7893–7904; doi:10.3390/s120607893

OPEN ACCESS

sensors

ISSN 1424-8220

www.mdpi.com/journal/sensors

Article

Acetylcholinesterase Immobilized on Magnetic Beads for Pesticides Detection: Application to Olive Oil Analysis

Najwa Ben Oujji ^{1,2}, Idriss Bakas ^{1,2}, Georges Istamboulié ¹, Ihya Ait-Ichou ², Elhabib Ait-Addi ², Régis Rouillon ¹ and Thierry Noguer ^{1,*}

¹ IMAGES Laboratory, University of Perpignan, IMAGES EA4218, Building S 52 Av Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France; E-Mails: najwa_benoujji@hotmail.com (N.B.O.); idriss_salame@hotmail.com (I.B.); gistamboulie@yahoo.fr (G.I.); rouillon@univ-perp.fr (R.R.)

² AQUAMAR Laboratory, Photocatalysis and Environment Team, Department of Chemistry, Faculty of Science, University Ibn Zohr, BP 8106 Cité Dakhla, Agadir, Morocco; E-Mails: ihyia.aitichou@gmail.com (I.A.-I.); h.aitaddi@esta.ac.ma (E.A.-A.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: noguer@univ-perp.fr; Tel.: +33-4-68-66-22-55; Fax: +33-4-68-66-22-23.

Received: 4 May 2012; in revised form: 24 May 2012 / Accepted: 4 June 2012 /

Published: 8 June 2012

Abstract: This work presents the development of bioassays and biosensors for the detection of insecticides widely used in the treatment of olive trees. The systems are based on the covalent immobilisation of acetylcholinesterase on magnetic microbeads using either colorimetry or amperometry as detection technique. The magnetic beads were immobilised on screen-printed electrodes or microtitration plates and tested using standard solutions and real samples. The developed devices showed good analytical performances with limits of detection much lower than the maximum residue limit tolerated by international regulations, as well as a good reproducibility and stability.

Keywords: electric eel acetylcholinesterase; organophosphorus insecticides; magnetic microbeads; olive oil

1. Introduction

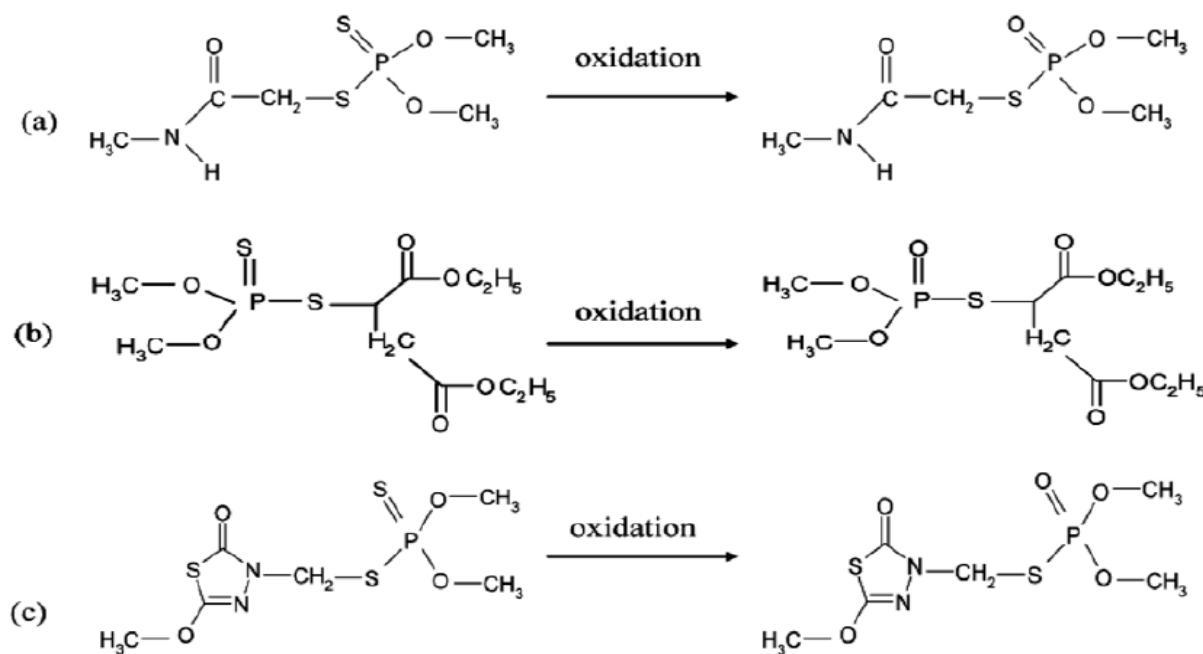
Olive cultivation is widespread throughout the Mediterranean region and is important for the rural economy, local heritage and environment [1]. To ensure crop protection, the use of pesticides is often

required for blocking attacks of pests and diseases, as well as presence of weeds. The olive fruit fly *Bactrocera oleae* is the most serious pest of olives in the Mediterranean countries, causing economic losses reaching up to 15% of olive production [2]. Insecticide treatments are applied every year to control the fly population, mainly based on pesticides belonging to the organophosphates class. These chemicals can persist to the harvest stage and are likely to contaminate olive oil. Therefore, both European Union and the Codex Alimentarius Commission of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) have established maximum pesticide residues limits (MRLs) for olives and olive oil [3,4].

Conventional methods of detection of organophosphate pesticides rely on an analysis by gas chromatography with specific detection. Although these techniques are very powerful and can detect very low concentrations, they are still very expensive and require highly skilled personnel, expensive purification steps and specialized major equipment [5]. In the last decades, new technologies based on biological detection systems have emerged. Among these techniques, biosensors have been shown to be very promising due to their simplicity and cost effectiveness compared to conventional techniques. Biosensors based on the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) have been intensively studied in the aim of detecting organophosphorus insecticides [6]. Cholinesterases are important enzymes present in vertebrates and insects, which hydrolyze the neurotransmitter acetylcholine in the nervous system [7]. Organophosphorus pesticides are esters, amides or thiol derivatives of phosphoric acid esters. They primarily exist in the thionate form which is stable, but not very active. Activation occurs during metabolic oxidation into the biologically active oxon form, which is much less stable [8]. These insecticides act by phosphorylation of the serine located in the catalytic site of AChE, they can be considered as pseudo-substrates [9]. As this phosphorylation is very difficult to reverse, organophosphates are considered as irreversible inhibitors. This irreversibility is probably the main problem related to AChE-based biosensors, because of the difficulty in performing multiple assays using the same sensor [6]. Several methods have been investigated to overcome this problem, including mainly reactivation using oximes [10] and original immobilisation techniques.

Among these immobilisation methods, magnetic particles have recently gained a great attention due to their potential for providing control of electrochemical processes [11] and creating magneto-switchable devices [12,13]. Immobilization of enzymes, antibodies, oligonucleotides, and other biologically active compounds onto magnetic nanoparticles platforms is a key element in using these structures for biosensing purposes. Fabricating biofunctionalized magnetic materials containing a high amount of the biological element with high activity and stability is essential for the design of robust sensors that take advantage of the magnetic capabilities. The different routes for the fabrication of biofunctionalized magnetic nanoparticles include traditional methods such as covalent binding, adsorption, specific affinity interactions, and entrapment in porous surface layers [14]. Immobilisation of acetylcholinesterase on magnetic microbeads was already described in the literature, based on nickel-histidine affinity [6,15]. In this work we propose an immobilisation method that can be applied to the native acetylcholinesterase from electric eel, based on covalent coupling on magnetic microbeads. This method allows designing cheaper biosensors allowing the detection of insecticides in olive oil (Figure 1). The modified beads have been used either in bioassay or in biosensor configurations, based respectively on spectrophotometric or amperometric detection methods.

Figure 1. Structures of organophosphates and their oxidized forms used in this study: (a) dimethoate and his oxon form omethoate; (b) malathion and malaoxon; (c) methidathion and methidathion oxide.



2. Experimental Section

2.1. Chemicals and Stock Solutions

AChE (EC 3.1.1.7) from electric eel (EE) (Type V-S, 1,000 U/mg) was purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Acetylthiocholine chloride (ATChCl), acetylthiocholine iodide (ATChI) and 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB-Ellman's reagent) were provided by Sigma. In order to minimize hydrolysis, ATChCl and ATChI solutions were prepared daily in 0.9% NaCl (Sigma-Aldrich) solution. Stock solutions of enzymes and DTNB were prepared in 0.1 M phosphate buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, Sigma-Aldrich) at pH 7. The organophosphorus insecticides malaoxon, omethoate and methidathion were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Pesticide stock solutions (concentration 10^{-3} M) were prepared in acetonitrile (Sigma) and stored at 4 °C, working pesticide solutions were prepared daily in distilled water by dilution of the stock solution. The oxidation of methidathion was achieved using N-bromosuccinimide provided by Sigma-Aldrich. The glutaraldehyde used for activation of magnetic beads was also purchased from Sigma-Aldrich. Carbon (Electrodag 423SS) and silver/silver chloride (Electrodag 418SS) inks were obtained from Acheson (Plymouth, UK). Cobalt phtalocyanine-modified carbon paste was purchased from Gwent Electronic Materials, Ltd. (Gwent, UK). Poly(vinyl)chloride (PVC) sheets (200 mm × 100 mm × 0.5 mm), supplied by SKK (Denzlingen, Germany), were used as support for the screen-printed electrodes. A glycerophthalic paint (Astral, France) was used as insulating layer.

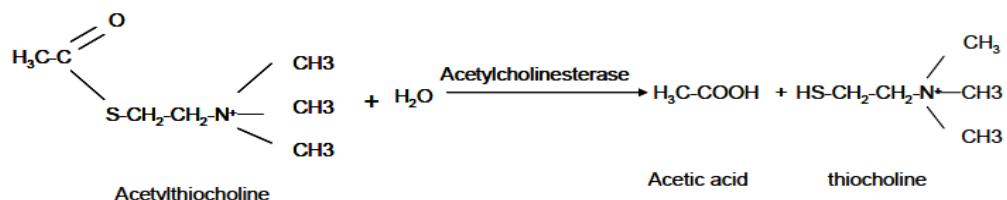
2.2. Apparatus

Spectrophotometric measurements were performed using a Hewlett Packard diode array 8451A spectrophotometer. Colorimetric measurements on PS-microtiter plates, U form (Greiner, Germany) were performed with a Labsystems Multiskan EX microtiter plate reader (Thermo Life Sciences, France). Amperometric measurements were carried out with a 641VA potentiostat (Metrohm, Switzerland), connected to a BD40 (Kipp & Zonen, The Netherlands) flatbed recorder.

Screen-printed electrodes were produced using a semi-automatic DEK248 printing machine according to a procedure previously described [15], but in a three-electrode configuration. The working electrode was a 4 mm-diameter disk, the auxiliary electrode was a 16 mm × 1.5 mm curved line and the Ag/AgCl pseudo-reference electrode was a 5 mm × 1.5 mm straight track. For experiments with magnetic beads, a small 4 mm-diameter magnet was placed on the backside of the working electrode to magnetically attach the enzyme-functionalised beads to the electrode surface.

2.3. Determination of Acetylcholinesterase Activity

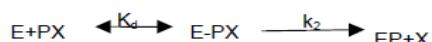
The activity of AChE was measured spectrophotometrically by monitoring at 412 nm the appearance of thionitrobenzoate resulting from the reaction of DTNB with thiocholine, the product of the enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine substrate, according to the procedure described by Ellman *et al.* [16]. This method is based on the use of a synthetic substrate: acetylthiocholine, whose hydrolysis liberates thiocholine and acetic acid according to the reaction:



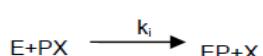
The thiocholine reacts with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) yielding a yellow complex absorbing at 412 nm ($\epsilon = 1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.4. Determination of the Inhibition Constant k_i

The mechanism of inhibition of AChE by organophosphate compounds is well-known [17]. The inhibitor phosphorylates a serine located in the active site and the inhibition can be considered as irreversible in the first 30 min [18]:



With E = enzyme, PX = organophosphate and X = leaving group. This scheme can be simplified with the bimolecular constant $k_i = k_2/K_d$:



To follow the inhibition, the enzyme was incubated with the pesticide during different periods of time, at 30 °C in 0.1 M phosphate buffer, pH 7. The change in remaining free enzyme concentration $[E]/[E_0]$ with time was estimated by sampling aliquots at various times and recording the remaining activity in the presence of 1 mM acetylthiocholine [19].

The experimental procedure was as follows: 300 μL of 2.5×10^{-3} M DTNB and 100 μL of 0.01 M ATChI were added to 500 μL of 0.1 M phosphate buffer at pH 7; then 100 μL of the enzyme-inhibitor solution were taken at fixed time intervals and added to the cell. The incubation times used to study EE-AChE inhibition were 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15 and 20 min.

The residual activity of AChE was calculated by comparing the slope of obtained kinetics before and after inhibition. The graphs obtained by plotting log of residual activity *vs.* incubation time for each inhibitor showed a linear representation. The apparent reaction rate k_{obs} (min^{-1}) were obtained by measuring the slope of this straight line. Plotting $1/k_{\text{obs}}$ *vs.* $1/[I]$ allowed calculating the inhibition constant k_i , which corresponds to the reciprocal value of the obtained slope.

2.5. Immobilisation on Magnetic Nanoparticles by Covalent Coupling

Nickel magnetic beads with a diameter of 200 nm were activated according to the following steps [20]:

- (1) Oxidation of the beads: 60 mg of magnetic beads were stirred for 4 h in 1 mL of 0.5 M sulfuric acid, and then washed twice with distilled water.
- (2) Functionalization with an amine group: 70 μL of 3-aminopropyltriethoxysilane were added to the beads previously poured in 100 mL of ethanol and ultrasonicated during 5 min, the suspension was kept under mechanical stirring overnight and finally washed three times with ethanol and twice with distilled water.
- (3) Covalent coupling with glutaraldehyde: 30 μL of aminated beads were washed twice with 1 mL of 0.1 M pH 7 buffer, 820 μL of buffer, 100 μL of electric eel AChE (4.41 UI/mL) and 80 μL of a 25% glutaraldehyde solution were added to the beads and stirred during 30 min at room temperature.
- (4) 1 μL of the obtained enzyme-linked beads suspension was placed either on the surface of the working electrode, beforehand fitted with a 4 mm-diameter magnet (amperometric detection), or in each well of the microplate (colorimetric detection).

2.6. Measurements

2.6.1. Amperometric Measurements

The electrode was vertically immersed in a thermostated cell (30 °C) containing 10 mL phosphate buffer pH 7 under constant magnetic stirring (417 rpm). The applied potential was 100 mV *vs.* Ag/AgCl reference electrode, using cobalt phtalocyanine as mediator. The current intensity was recorded and, after current stabilisation, 1 mM ATCh (final concentration) was added in the cell. The measured signal corresponded to the difference of current intensity between the baseline and the plateau. The cell was washed with distilled water between measurements.

The pesticide detection was made in a three-step procedure as follows: first, the initial response of the electrode to 1 mM ATCh was recorded three times, then the electrode was incubated in a solution

containing a known concentration of insecticide, and finally the residual response of the electrode was recorded again. Electrodes were thoroughly washed with distilled water between each measurement. The percentage of the inhibition was correlated with the insecticide concentration, the inhibition rate was calculated according to the following formula: $I (\%) = [(I_0 - I)/I_0]100$, I and I_0 being respectively the current after the and before inhibition.

2.6.2. Colorimetric Measurements

Two hundred μL of phosphate buffer pH 8 were added in each well containing AChE-modified magnetic beads suspension in order to equilibrate the enzyme. After removal of the liquid using the Adem-Mag96 [21] 200 μL of phosphate buffer containing 2 mM ACTh-I and 6% DTNB were added and the microplate was incubated for 30 min under constant orbital stirring (300 rpm). The absorbance was then measured at 405 nm using 100 μL of the solution taken from each well. Inhibition experiments were performed by incubating the magnetic beads (1 μL) with 100 μL of different concentrations of pesticide during 10 min. The measurement procedure was the same as described above.

2.7. Extraction Procedure

The determination of the three pesticides in natural oil samples was performed after a simple liquid-liquid extraction procedure. The extraction was performed using 10 mL of olive oil previously spiked with pesticides at final concentrations of 10^{-2} M for omethoate and methidathion, and 10^{-3} M for malaoxon. The mixture was heated at 50 °C for 30 min, and 500 μL of this olive oil was added to 400 μL of acetonitrile and 100 μL of dichloromethane. The mixture was centrifuged at 13,400 rpm for 90 s and the resulting supernatant was recovered and used as a pesticide mother solution, other pesticide solutions were prepared by diluting this mother solution.

2.8. Oxidation of Methidathion

In this study we have focused on the detection of oxidized forms of each pesticide, which are less stable but more toxic than the normal forms. The oxidized forms of dimethoate and malathion, respectively called omethoate and malaoxon are commercially available, but in the case of methidathion an oxidation step must be carried out using *N*-bromosuccinimide (NBS). The efficiency of this oxidation step was controlled using reverse-phase HPLC, it was shown that 3×10^{-5} M NBS was sufficient for the total oxidation of a 10^{-5} M methidathion solution. The effect of NBS on AChE was investigated to ensure that the enzyme is not affected by the oxidizing agent, it was shown that in assays conditions NBS did not inhibit AChE.

3. Results and Discussion

3.1. Determination of the Inhibition Constant k_i

The inhibition constants k_i were calculated by performing enzyme kinetic measurements using different pesticide concentrations and by varying the incubation time of the enzyme with the pesticide. The residual enzyme activity was determined according to the Ellman's spectrophotometric method as

described previously. The inhibition constant k_i is proportional to the affinity of the pesticide for the enzyme and its inhibitory power. k_i is therefore a fundamental parameter to compare the inhibitory potency of insecticides and assess the sensitivity of the enzymes studied. The constants k_i presented in Table 1 have been determined by studying the residual activity of the enzyme after contact with different concentrations of inhibitor for a given incubation time. This value of k_i shows that the acetylcholinesterase of electric eel is highly sensitive to malaoxon and methidathion but very weakly sensitive to omethoate.

Table 1. Inhibition constants k_i ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) obtained for methidathion, malaoxon and omethoate.

	Methidathion	Malaoxon	Omethoate
AChE-EE	1.07	2.98	0.001

3.2. Detection of Insecticides in Microplate Assays

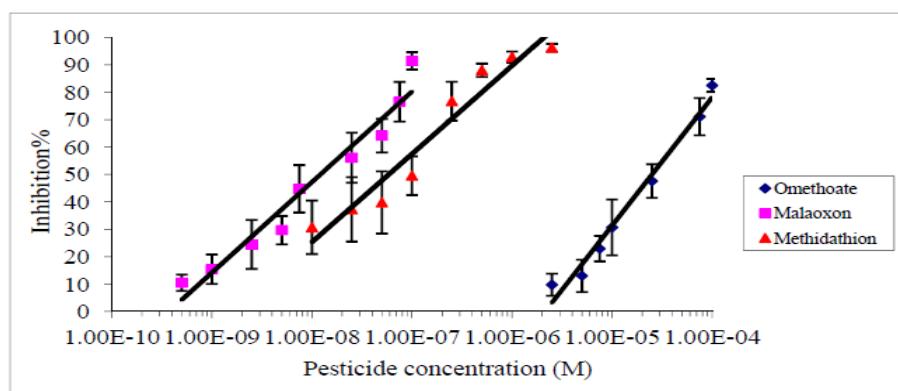
3.2.1. Optimisation of the Reaction Time

The time of reaction of acetylthiocholine with immobilized AChE was studied by measuring every 5 min the appearance of the yellow complex at 412 nm. It was shown that the reaction was completed after 30 min in absence of pesticide; this time was therefore used in inhibition measurements.

3.2.2. Detection of Organophosphates by Colorimetric Method

The inhibition effect of malaoxon, methidathion and omethoate on Electric eel AChE was studied using an incubation time of 10 min and a measurement time of 30 min. Figure 2 shows the inhibition rates obtained with each pesticide as a function of the concentration used.

Figure 2. Inhibition effect of omethoate, methidathion and malaoxon on electric eel AChE immobilized on magnetic beads, measurement by colorimetric method.



As expected from the values of inhibition constants (Table 1), the inhibitory effect of omethoate was the weaker and malaoxon was the more effective inhibitor. The limit of detection (LOD) and the IC₅₀ were calculated as the pesticide concentration inducing respectively 10% and 50% inhibition. The IC₁₀ and IC₅₀ obtained for each pesticide are summarized in Table 2.

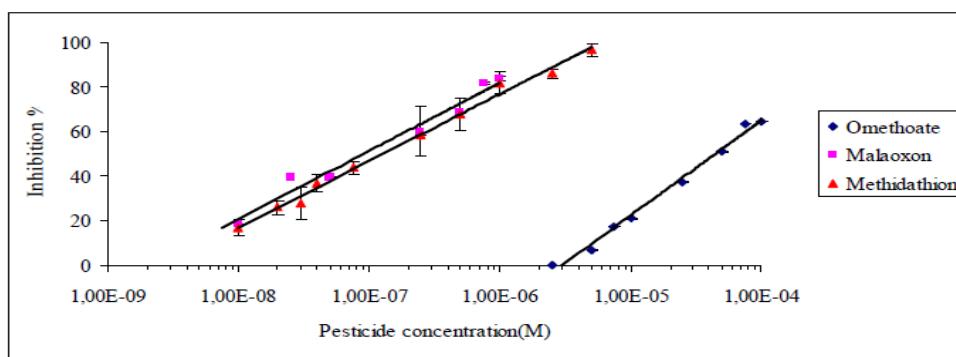
Table 2. The IC₅₀ and IC₁₀ values (M) obtained with the two detection methods with the three pesticides.

	Colorimetric detection		Amperometric detection	
	Pesticide concentration (M)		Pesticide concentration (M)	
	IC ₁₀	IC ₅₀	IC ₁₀	IC ₅₀
Omethoate	3.45E-06	2.65E-05	5.15E-06	4.46E-05
Methidathion	2.50E-09	5.80E-08	8.85E-09	1.36E-07
Malaoxon	8.00E-10	1.30E-08	9.40E-09	1.00E-07

Beside these results, the microplate assay showed a good reproducibility with a stable response, this detection method has the advantage of saving time as it allows analysing 96 samples in a single assay. Furthermore, due to the small volumes used, it allows one to minimize the use of reagents, however this characteristic can be considered also as a disadvantage because of the difficulty to maintain good reproducibility using small volumes.

3.3. Detection of Organophosphates by an Amperometric Method

The operational stability of biosensors based on AChE covalently bound to magnetic beads was tested to ensure that any decrease in the signal was related to enzyme inactivation and not to enzyme leakage. This parameter was estimated by repetitive measurements of the response of a single electrode to 1 mM ATCh, with intermediate rinses with distilled water. In these conditions, the designed sensors showed a very good stability for at least 10 consecutive measurements with a relative standard deviation (R.S.D) in order of 3% (300 ± 10 nA). The reproducibility of the inhibition was estimated by measuring six times the inhibition percentage by 3×10^{-8} of oxidized methidathion, the R.S.D of the inhibition determination was 4% (217 ± 10).

Figure 3. Inhibition effect of omethoate, methidathion and malaoxon on the amperometric biosensor based on electric eel AChE covalently immobilized on magnetic microbeads.

The incubation time between the biosensor and pesticides was also tested. It was observed that an incubation time of 10 min was sufficient to reach the maximum inhibition rate whatever the pesticide concentration used. This incubation time was thus selected and used for all inhibition assays. Figure 3 presents the inhibition effect of the three pesticides on the biosensor. As expected the biosensor

displays a very low limit of detection for malaoxon and methidathion, while omethoate is detected with a very low sensitivity (Figure 3). The IC₁₀ and IC₅₀ values obtained for each pesticide are summarized in Table 2.

3.4. Application to Real Samples

The performance of the biosensors was tested using olive oil samples previously spiked with known concentrations of pesticides. In order to measure the efficiency of the extraction procedure, three olive oil samples were spiked to obtain 10⁻² M of omethoate as final concentration and extracted according to the method described in Section 2.7. The inhibition effect of the resulting extracts was measured after dilution in the working buffer, at a final concentration of 10⁻⁴ M. In these conditions, the average response of the sensors was 75 ± 7 nA, showing a good reproducibility of the extraction method. The recovery percentage for the three pesticides was calculated using the formula below:

$$\text{Recovery\%} = \% \text{ of inhibition in real samples} / \% \text{ of inhibition in buffer} \times 100$$

It was found that the recovery percentage for the three pesticides with both methods varies from 40% to 170%, as shown in Figures 4 and 5. The results showed a very satisfying correlation whatever the format used, *i.e.*, microplate assay (Figure 4) or biosensor (Figure 5).

Figure 4. Comparison of inhibition effects of omethoate, methidathion and malaoxon in olive oil real samples and buffer, detection by optical method.

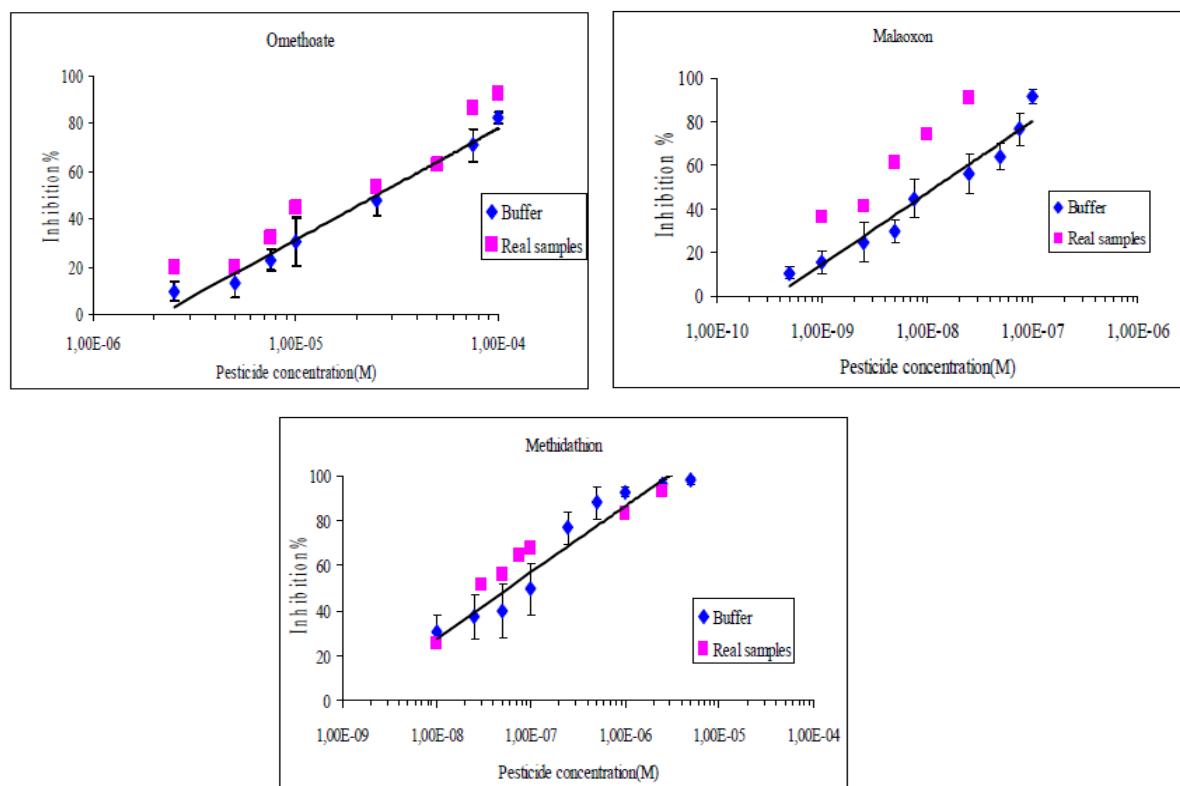
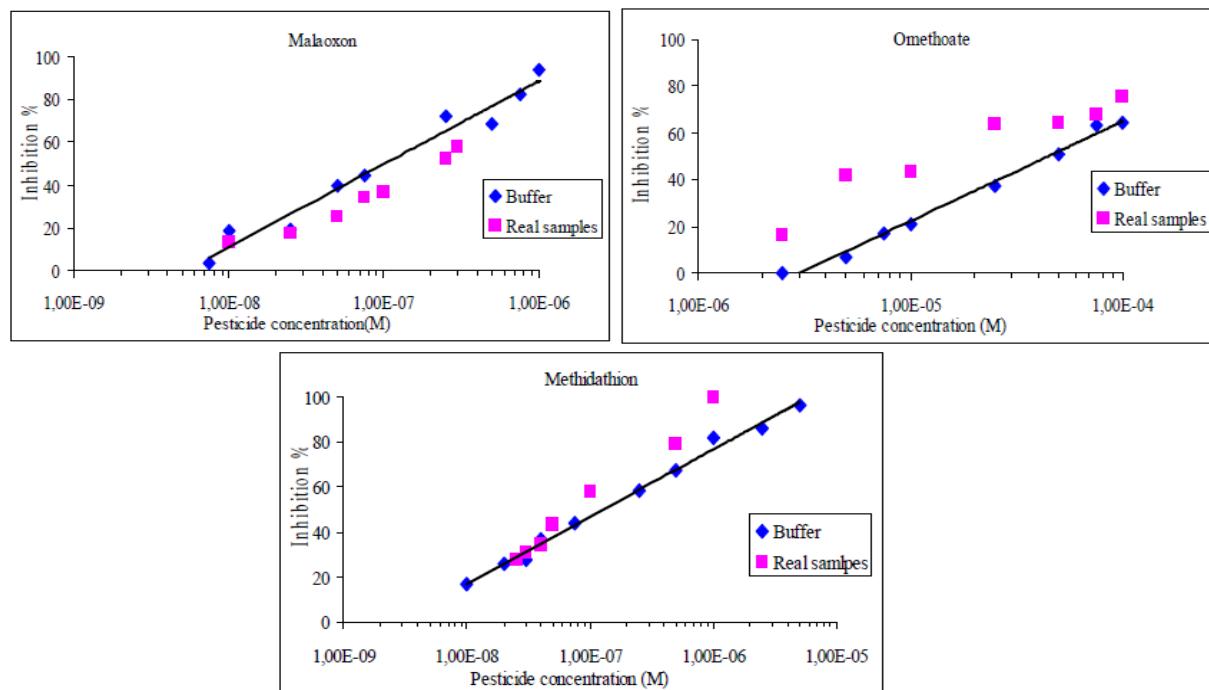


Figure 5. Comparison of inhibition effects of omethoate, methidathion and malaoxon in buffer or olive oil real samples, detection by amperometric method.



Despite that, a small increase of the inhibition effect was observed whatever the pesticide studied, especially when using the microplate assay. These small discrepancies could be attributed to matrix effects. In order to evaluate these interferences, a blank assay was carried out using an olive oil sample that was previously extracted and then spiked to obtain 10^{-2} M of omethoate. It was found that the matrix effect was responsible of a 5.5% supplementary loss of the sensor response, which can explain the increase in inhibition ratios observed using real samples. Additional blank assays were performed to verify that the inhibition was not due to pesticides already present in the olive oil, these tests showed very low inhibition rates, lower than 4%. The inhibition effect of olive oil samples containing NBS has also been studied, it was shown that NBS did not affect the measurement.

4. Conclusions/Outlook

In this work we have developed and optimised the immobilisation of acetylcholinesterase on magnetic microbeads by covalent coupling. The modified beads have been used in two configurations, using either microplates or screen-printed electrodes supports. Depending on the configuration, colorimetry or amperometry have been applied as detection methods and the devices have been tested on standard and real samples for the determination of three pesticides commonly used for the treatment of olive trees: omethoate, malaoxon and methidathion. The results showed a good performance of the developed devices with reasonable limits of detection, as well as good reproducibility and stability. These last two criteria were however weaker for the colorimetric method due to the difficulty in

handling small volumes in the microplate assay. On the other hand, this configuration had the advantage of being faster and more economical. This study highlighted the low sensitivity of the electric eel acetylcholinesterase for omethoate compared to malaoxon and oxidized methidathion, which lead to detection limits as low as 10^{-10} M. The application on the spiked olive oil samples showed very satisfactory results, comparable with those obtained using standard solutions.

Acknowledgments

Ben Oujji Najwa would like to express gratitude to the Averroes Programme (EC programme Erasmus Mundus, Action 2) for financially supporting this work.

References

1. Kandylis, P.; Vekiari, A.S.; Kanellaki, M.; Grati, K.; Msallem, M.; Kourkoutas, Y. Comparative study of extra virgin olive oil flavor profile of Koroneiki variety (*Olea europaea* var. *Microcarpa alba*) cultivated in Greece and Tunisia during one period of harvesting. *LWT-Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 1333–1341.
2. Mazomenos, B.E.; Pantazi-Mazomenou, A.; Stefanou, D. Attract and kill of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* in Greece as a part of an integrated control system. *IOBC - WPRS Bull.* **2002**, *25*, 137–146.
3. Luchetti, F. Importance and future of olive oil in the world market—An introduction to olive oil. *Eur. Lipid J. Sci. Technol.* **2002**, *104*, 559–563.
4. Lentza-Rizos, C.; Avramides, E.J. Pesticide residues in olive oil. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **1995**, *141*, 111–134.
5. Istamboulie, G.; Cortina-Puig, M.; Marty, J.-L.; Noguer, T. The use of Artificial Neural Networks for the selective detection of two organophosphate insecticides: Chlorpyrifos and chlorfenvinfos. *Talanta* **2009**, *79*, 507–511.
6. Istamboulie, G.; Andreescu, S.; Marty, J.L.; Noguer, T. Highly sensitive detection of organophosphorus insecticides using magnetic microbeads and genetically engineered acetylcholinesterase. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 506–512.
7. Fest, C.; Schmidt, K.-J. References. In *The Chemistry of Organophosphorus Pesticides, Reactivity, Synthesis, Mode of Action, Toxicology*; Springer-Verlag Heidelberg: New York, NY, USA, 1973; pp. 122–124.
8. Ballantyne, B.; Marrs, T.C. Overview of the Biological and Clinical Aspects of Organophosphates and Carbamates. In *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*; Ballantyne, B., Marrs, T.C., Eds.; Butterworth-Heinemann Elsevier Ltd.: Oxford, UK, 1992; pp. 3–14.
9. Eldefrawi, A.T. References. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*; Kerkut, G.A., Gilbert, L.I., Eds.; Pergamon Press: Oxford, UK, 1985; pp. 115–130.
10. Gulla, K.C.; Gouda, M.D.; Thakur, M.S.; Karanth, N.G. Reactivation of immobilized acetylcholinesterase in an amperometric biosensor for organophosphorus pesticide. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1597*, 133–139.

11. Wang, J.; Musameh, M.; Laocharoensuk, R. Magnetic catalytic nickel particles for on-demand control of electrocatalytic processes. *Electrochim. Commun.* **2005**, *7*, 652–656.
12. Katz, E.; Willner, I. Magneto-stimulated hydrodynamic control of electrocatalytic and bioelectrocatalytic processes. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *124*, 10290–10291.
13. Katz, E.; Baron, R.; Willner, I. Magnetoswitchable electrochemistry gated by alkyl-chainfunctionalized magnetic nanoparticles: Controlling of diffusional and surface-confined electrochemical process. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4060–4070.
14. Stanciu, L.; Won, Y.-H.; Ganesana, M.; Andreescu, S. Magnetic particle-based hybrid platforms for bioanalytical sensors. *Sensors* **2009**, *9*, 2976–2999.
15. Andreescu, S.; Barthelmebs, L.; Marty, J.-L. Immobilisation of AChE on screen-printed electrodes: Comparative study between three immobilisation methods; Applications to the detection of organophosphorus insecticides. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *464*, 171–180.
16. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharm.* **1961**, *7*, 88–95.
17. Aldridge, W.N. Some properties of specific cholinesterases with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues. *Biochem. J.* **1950**, *46*, 451–456.
18. Boublík, Y.; Saint-Aguet, P.; Lougarre, A.; Arnaud, M.; Villatte, F.; Estrada-Mondaca S. Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues. *Protein Eng.* **2002**, *15*, 43–50.
19. Rhouati, A.; Istamboulie, G.; Cortina-Puig, M.; Marty, J.L.; Noguer, T. Selective spectrophotometric detection of insecticides using cholinesterases, phosphotriesterase and chemometric analysis. *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46*, 212–216.
20. Rossi, L.M.; Quach, A.D.; Rosenzweig, Z. Glucose oxidase-magnetite nanoparticles biconjugate for glucose sensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *380*, 606–613.
21. Barthelmebs, L.; Hayat, A.; Wis, A.; Marty, J.-L.; Noguer, T. Electrochemical DNA aptamer-based biosensor for OTA detection, using superparamagnetic nanoparticles. *Sens. Actuators B Chem.* **2011**, *156*, 932–937.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).