

*REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE*

*MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR*

*ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE*

**UNIVERSITÉ DES FRÈRES MENTOURI – CONSTANTINE 1**

**FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES**

**DÉPARTEMENT DE CHIMIE**

N° d'ordre : 188/Ds/2017

Série : 28/Ch/2017

**THÈSE**

**PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE**

**DOCTORAT EN SCIENCES**

**CHIMIE**

**SPÉCIALITE : POLYMÈRES**

**THÈME :**

**PRÉPARATION ET ÉTUDE DE POLYMÈRES A EMPREINTES  
MOLÉCULAIRES POUR L'EXTRACTION DE PROTEINES**

**Présentée par :**

**HASSANE AYADI**

**Soutenue le: 26 / 10 /2017**

**Devant le jury :**

Président	Salah ROUATI	Professeur	Université Constantine 1
Rapporteur	Fayçal DJAZI	Professeur	Université de Skikda
Examineurs	Ali BELFAITEH	Professeur	Université Constantine 1
	Abdelaziz BOULKAMH	Professeur	Université Constantine 1
	Smail KHELILI	Professeur	Université de Jijel
	Mohamed Mehdi CHEHIMI	Directeur de recherche	ICMPE. Paris Est

## REMERCIEMENTS

*Ce travail a été mené en étroite collaboration entre le Laboratoire de Recherche sur la Physico-Chimie des Surfaces et Interfaces (LRPCSI) de l'université 20 août 1955 Skikda et le Laboratoire ITODYS (Interfaces, Traitements Organisation et Dynamique des Systèmes CNRS Université Paris 7).*

*Je tiens tout d'abord à exprimer mes sincères remerciements ainsi que ma profonde reconnaissance à Monsieur **Fayçal DJAZI**, Professeur au département de Pétrochimie et génie des procédés de l'Université 20 août 1955 - Skikda, d'avoir accepté de diriger mes recherches et de réaliser mon travail dans les meilleures conditions. Je lui adresse ma gratitude pour sa disponibilité, ses conseils, son encouragement, sa patience et son amabilité.*

*J'exprime toute ma gratitude à Monsieur **Mohamed Mehdi CHEHIMI** Directeur de Recherche à Institut de Chimie et des Matériaux Paris Est (ICMPE), pour m'avoir accueilli au sein de son équipe durant tous mes stages de courtes durées. Je lui témoigne toute ma reconnaissance pour m'avoir guidé et donné des précieuses remarques et conseils.*

*J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur **Salah ROUATI**, Professeur à l'université des frères Mentouri Constantine 1, qui a bien voulu accepter la présidence du jury de cette thèse.*

*Mes remerciements sont aussi adressés à Monsieur **Ali BELFAITEH**, Professeur à l'université des frères Mentouri Constantine 1, qui a acceptée d'honorer par sa présence le jury de cette thèse.*

*J'adresse mes respectueux remerciements à Monsieur **Abdelaziz BOULKAMH**, Professeur à l'université des frères Mentouri Constantine 1, pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.*

*Je tiens aussi à remercier Monsieur **Smail KHELILI**, Professeur à l'université de JIJEL, qui a bien voulu faire partie du jury de cette thèse.*

*Je présente mes remerciements les plus sincères à l'équipe du Laboratoire de Céramiques, Université Mentouri Constantine1 , l'équipe d'Optoélectronique et photonique au CRTI ainsi que le groupe de techniciens de l'université de Skikda.*

*Rien de tout cela n'aurait été possible sans le soutien de ma famille et de tous mes amis. Qu'ils sachent simplement qu'ils sont au fond de mon cœur chaque instant et en tout lieu.*

*J'ai certainement oublié des personnes qui m'ont aidé pendant les séjours en France, qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance tout spécialement Dr. Zakaria Salmi.*

*Je remercie aussi mes collègues de l'université de skikda Pr. Rachida Zegoudi, Dr. Sabrina HALLADJA, Hichem SEDRATI, Hamdani BENHACINE , Taher Mekhalif ,Bossaa Mohamed et Issam BOUDRAA qui m'ont encouragé et assisté lors de la réalisation de cette thèse.*

# ***TABLE DES MATIÈRES***

# Tableau de matières

<b>Introduction générale</b>	1
Bibliographie Introduction générale	4
<b>Chapitre I : Généralités sur les polymères à empreinte moléculaire</b>	
I.1.Principe générale de synthèse des MIPs	7
I.1.1.Les réactifs utilisés pour la préparation des MIPs	7
I.1.1.1.Molécules empreintes et monomères fonctionnels	7
I.1.1.2.Initiateurs de polymérisation	8
I.1.1.3. Les agents réticulants	9
I.1.1.4. Solvants	10
I.2. Les différentes approches pour la préparation des MIP	11
I.2.1. La méthode non covalente	11
I.2.2. La méthode covalente	12
I.2.3. La méthode semi-covalente	13
I.3. Polymérisation	14
I.3. 1. La polymérisation radicalaire contrôlée (PRC)	14
I.3.1.1. Polymérisation radicalaire en présence de nitroxydes (NMP)	15
I.3. 1.2. La polymérisation radicalaire par addition/fragmentation réversible (RAFT)	15
I.3.1.3 Polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP)	16
I.3. 1.4. Polymérisation radicalaire en présence d'iniferter	17
I.4. Greffage de polymères	19
I.4.1. Supports solides utilisés	19
I.4.1.1. Les supports inorganiques	19
I.4.1.2. Les supports organiques	19
I.4.2. Méthodes de greffage de polymères sur supports	20

I.4.2. 1. Méthode d'adsorption (physisorption)	20
I.4.2.2. La méthode « grafting to » (GT)	21
I.4.2.3. La méthode « grafting from » (GF)	21
I.4.3. Polymérisation radicalaire en présence d'iniferters sur supports solide	21
Bibliographie du chapitre I	23
<b>Chapitre II : Généralités sur les protéines</b>	
II.1. Les protéines	26
II.1.1 Structure des protéines	26
II.1.2. Acides aminés et liaison peptidique	27
II.1.2.1. Les acides aminés	27
II.1.2.2. La liaison peptidique	28
II.1.3. Rôles physiologiques	28
II.1.3.1. Protéines fibreuses	28
II.1.3.2. Protéines globulaires	28
II.1.4. Dénaturation des protéines	29
II.1.5. Lysozyme	30
II.1.6. L'impression des modèles macromoléculaires	30
II.1.6.1. Comparaison des MIPs avec les éléments naturels	31
II.1.6.2. Impression des protéines	32
II.1.6.3. L'impression en masse	32
II.1.6.3.1. Propriétés physiques et chimiques des hydrogels	33
II.1.6.3.2. Propriétés sélectives des hydrogels	34
II.1.6.3. Impression de surface	35
II.1.6.4. Impression protéine-l'épitope	36
II.2. Généralité sur l'adsorption	36

II.2.1. Définition	37
II.2.2. Types d'adsorption	37
II.2.3. Mécanisme d'adsorption	37
II.2.4. Les modèles des isothermes d'adsorption	38
II.2.4.1. Modèle de Langmuir	38
II.2.4.2. Modèle de Freundlich	40
II.2.4.3. Modèle de BET (Brunauer, Emmett, Teller)	41
II.2.5. Modélisation de la cinétique d'adsorption	42
II.2.5.1. Modèle cinétique du pseudo premier ordre (Lagergreen)	42
II.2.5.2. Modèle cinétique de pseudo second ordre	43
II.2.5.3. Modèle de diffusion intra-particulaire	43
Bibliographie du chapitre II	45
<b>Chapitre III : Synthèse et techniques de caractérisation</b>	
III.1. Réactifs utilisés	47
III.2. PVC utilisé comme support	47
III.3. Préparation des polymère à empreinte de lysozyme sur des supports granuleux de PVC	48
III.3.1. Fixation de l'amorceur iniferter (DEDTC) à la surface des billes de PVC	49
III.3.2. Avantage de l'utilisation de l'amorceur iniferter	49
III.3.3. Méthode de greffage	49
III.3.4. Protocole de préparation	50
III.4. Préparation de polymère à empreinte de lysozyme sur des billes de PVC	51
III.4.1. Méthode de synthèse du MIPs	51
III.4.2. Extraction de la molécule cible (lysozyme)	53
III.5. Tests Adsorption de lysozyme	53

III.6. Méthode de dosage de lysozyme	54
III.7. Techniques de caractérisation	55
III.7. 1 Spectroscopie de photoélectrons X (XPS)	55
III.7.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier	57
III.7.3. Spectrophotomètre Raman	57
III.7.4. Microscope électronique à balayage (MEB)	58
III.7.5. Détermination de la surface spécifique	58
Bibliographie du chapitre III	59
<b>Chapitre IV : Résultats et discussion</b>	
IV.1. Analyse par spectroscopie de photoélectrons X (XPS)	60
IV.2. Analyse par spectroscopie infrarouge	61
IV.3. Spectrophotomètre Raman	62
IV.4. Microscopie Electroniques à Balayage (MEB)	63
IV.5. Surface spécifique ( BET)	66
IV.6.Etude des performances des MIP	67
IV.6.1. Teste d'adsorption de lysozyme à partir d'une solution aqueuse.	67
IV.6.2. Effet de la température	67
IV.6.3. Détermination des Isothermes d'adsorption	68
IV.6.4. Linéarisation des isothermes d'adsorption	69
IV.7. Tests de sélectivité vis-à-vis de lysozyme	72
IV.8. Etude de la cinétique d'adsorption de Lysozyme sur les MIPs	74
IV.8.1. Cinétique de pseudo premier ordre : Modèle de Lagergren	75
IV.8.2. Pseudo second ordre : Modèle de Blanchard	75
IV.8.3.Détermination des paramètres de diffusion intraparticulaire :Modèle de Weber-Morris	77

IV.9. Détermination des paramètres thermodynamiques	80
Bibliographie du chapitre IV	83
Conclusion générale	84

## LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Acrylamide
BET	Brunauer Emmett et Teller
GPC	Chromatographie sur gel perméable
DEDTC	Diéthylldithiocarbamate de sodium,
IEP	Point isoélectrique
Iniferter	Transfert initiateur agent de terminaison
MBAA	N, N, methylenbisacrylamide
ME	Molecule empreinte (template)
MEB	Microscopie électronique à balayage
MIP	Polymère à empreintes moléculaires (Molecularly imprinted polymer)
PBS	Tampon phosphate salin
PPC	Complexe de prépolymérisation
PVC	Polychlorure de vinyle
PVC-I	Polychlorure de vinyle -Initiateur
PVC-MIP	Particules PVC imprimées
PVC-NIP	particules PVC non imprimées.
SDS	Dodécylsulfate de Sodium
SIP	Polymérisation initiée à la surface (Surface-Initiated Polymerization)
XPS	Spectroscopie à photoélectrons induites par rayons X

## LISTE DES FIGURES

Figure I.1	Schéma réactionnel de la préparation de MIP	06
Figure I.2	Les applications des polymères à empreintes moléculaires	06
Figure I.3.a	Approche non covalente à partir de Boc-phénylalanine en utilisant l'acide méthacrylique	12
Figure I.3.b	Approche covalente à partir de phényl-D-mannoside utilisant l'acide vinylphenylboronic	13
Figure I.3.c	Approche semi-covalente Approche semi-covalente	13
Figure I.4	Principe de la polymérisation contrôlée X : agent désactivant	14
Figure I.5	Equilibre d'activation/désactivation caractéristique de la NMP, avec $k_d$ la constante dissociation et $k_c$ celle de recombinaison	15
Figure I.6	Mécanisme de polymérisation radicalaire (RAFT)	16
Figure I.7	Mécanisme de Polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP)	17
Figure I.8	Mécanisme de polymérisation radicalaire «vivante» induite par Iniferter	18
Figure I.9	Exemples des iniferters utilisés	18
Figure I.10	Exemple de supports solides insolubles	19
Figure I.11	Méthodes de greffage de polymères sur supports	20
Figure I.12	Décomposition de l'iniferter sous irradiation UV	22
Figure II.1	Niveaux d'organisation structurale des protéines	26
Figure II.2	Structures des acides aminés	27
Figure II.3	Synthèse d'une liaison peptidique	28
Figure II.4	Exemple d'une fonction des protéines : Immunoglobuline avec 2 sites de fixation de l'antigène	29
Figure II.5	Structure tertiaire du lysozyme d'œuf de poule	30
Figure II.6	Le nombre d'articles sur l'empreinte macromoléculaire publiés depuis 1994.	31
Figure II.7	Synthèse de mip sous forme d'hydrogel (A) synthèse d'hydrogels (B) Gonflement	34
Figure II.8	Structure de l'ortho xylène (o-xylène)	35
Figure II.9	Protocole de l'impression d'une épitrope (protéine CyC)	36

Figure II.10	Étapes du processus d'adsorption sur un matériau poreux	38
Figure II.11	Modèle de monocouche	39
Figure II.12	Modèle d'adsorption de multicouche	40
Figure III.1	PVC utilisé comme support	48
Figure III.2	Fixation de l'amorceur iniferter sur la surface du PVC	50
Figure III.3	Montage de réaction de fixation de l'amorceur à la surface du PVC	50
Figure III.4	La stratégie générale de la procédure de préparation des couches de polymère à empreinte de lysozyme	51
Figure III.5.a	Mélange réactionnel pour la préparation du MIP.	52
Figure III.5b	Réacteur utilisé pour la réaction photo polymérisation	52
Figure III.6	Méthode d'Adsorption de lysozyme	54
Figure III.7	Représentation schématique de l'émission d'un photoélectron X	55
Figure III.8	Spectroscopie à Photoélectrons X (XPS)	56
Figure III.9	Schéma représentatif d'un Spectromètre Raman.	57
Figure IV.1	Spectres générales de PVC-I, PVC-MIP et PVC-MIPbx	60
Figure IV.2	Régions S2p du DEDTC et PVC-I	62
Figure IV.3	Spectre Infrarouge de PVC et PVC-MIP	63
Figure IV.4	Spectre Raman du PVC et PVC-MIP	64
Figure IV.5	Images MEB PVC, PVC- NIP et PVC-MIP	65
Figure IV.6	Influence de la température sur l'adsorption de lysozyme sur le PVC-MIP	68
Figure IV.7	Isotherme d'adsorption	69
Figure.IV.8	Linéarisation des isothermes d'adsorption par le modèle de Langmuir	70
Figure IV.9	Linéarisation des isothermes d'adsorption par le modèle de Langmuir	71
Figure IV.10	Courbes d'isotherme d'adsorption de lysozyme, cytochrome et myoglobine.	73
Figure IV.11	Cinétique d'adsorption de Lysozyme sur les MIP	75
Figure IV.12	Modélisation de la cinétique d'adsorption de Lysozyme sur les MIP : (a) Pseudopremier ordre, (b) Pseudo second ordre	76
Figure IV.13	Cinétique d'adsorption de Lysozyme sur les MIPs selon le modèle de Weber-Morris	77

Figure IV.14	Modèle cinétique diffusion intraparticulaire (Weber et Morris) pour l'adsorption du Lysozyme sur les MIPs	78
Figure IV.15	Détermination du coefficient de diffusion	79
Figure IV.16	Effet de la température sur la constante de distribution du phénomène d'adsorption	81

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1	Monomères fonctionnels commercialisés	8
Tableau I.2	Exemples sur les initiateurs utilisés dans la préparation des MIPs	9
Tableau I.3	Exemples sur les agents de réticulation utilisés dans la préparation des MIP	10
Tableau I.4	Les caractéristiques des principaux solvants utilisés dans la synthèse des Mips	11
Tableau II.1	Comparaison des MIPs et des éléments de reconnaissance naturelle.	32
Tableau II.2	Comparaison entre l'adsorption physique et l'adsorption chimique.	37
Tableau III.1	Produits utilisés pour la préparation des MIPs	47
Tableau IV.1	Composition chimique de surface	61
Tableau IV.2	Valeurs de surface spécifique	66
Tableau IV.3	Paramètres des modèles de Langmuir et Freundlich	71
Tableau IV.4	Paramètres cinétiques des modèles pseudo premier ordre et pseudo second ordre	76
Tableau IV.5	Paramètres des modèles cinétiques appliqués	80
Tableau IV.6	Paramètres thermodynamiques d'adsorption de lysozyme sur le MIP	81

# ***INTRODUCTION GÉNÉRALE***

Les techniques de séparation basées sur la reconnaissance moléculaire ont reçu beaucoup d'attention en chimie et en biologie en raison de leur grande sélectivité pour la macromolécule. Dans ce domaine, les polymères à empreintes moléculaires (MIPs) ont connu une croissance considérable au cours des dernières années [1-3], particulièrement lorsqu'ils sont préparés sous forme de films minces ou de matériaux de détection nanostructurés [4-6].

En effet, l'impression moléculaire est une technique bien établie pour produire des adsorbants sélectifs constitués de polymères organiques réticulés [7] et de matériaux sol-gel [8] préparés en présence de molécules de faible poids moléculaires [9,10] de bio-macromolécules [11,12] et même de microorganismes [13,14].

Avant de procéder à la polymérisation, la molécule empreinte est complexée avec le monomère fonctionnel via des interactions spécifiques telles que des liaisons hydrogène. Le système est appelé complexe de prépolymérisation (PCC). Lorsque le procédé est terminé, la molécule empreinte est retenue par la matrice polymère dans une conformation organisée par des interactions spécifiques avec les groupes fonctionnels. Lors de l'extraction par solvant, les molécules empreintes sont retirées de leurs places dans la matrice de polymère réticulé en laissant des empreintes moléculaires qui agissent comme des récepteurs artificiels pour relier la même molécule modèle. Pour cette raison, ces matériaux biomimétiques sont appelés "anticorps plastiques".

Les MIPs peuvent être produits soit en masse, soit des couches minces par plusieurs procédés chimiques, électrochimiques et photochimiques. Il est intéressant de noter que lorsque les MIPs sont préparés sous forme de films minces, ils peuvent être mis en œuvre dans des dispositifs optiques [15] piézoélectriques [16] ou électrochimiques [17] pour des applications de détection. La stratégie de film mince est attrayante car elle limite les effets de diffusion et rend les analyses très rapides.

Compte tenu de la polyvalence des applications des MIPs, la science et la technologie de ces matériaux polymères biomimétiques a connu une expansion spectaculaire au cours des dernières années; le nombre de publications est passé de 2 en 1990 à 77, 279,614 et 746 en 2000, 2006, 2012 et 2015, respectivement (Source: ISI Web of Science) . Ceci est dû au fait que les MIPs sont spécifiques, sélectifs et ultrasensibles vis-à-vis des analytes cibles. De plus, leur robustesse dans des conditions dures et leur réutilisation les a rendus exceptionnellement attrayants pour les analyses, le polymère et les matériaux scientifiques

Pour le cas particulier de l'impression de la protéine, le défi consiste à fabriquer des matériaux biomimétiques en masse ou des couches minces qui sont suffisamment souples

## Introduction générale

---

pour permettre à la protéine de rentrer et de sortir des sites artificiels au sein du MIP. Toutefois, les sites de reconnaissance doivent aussi conserver un certain degré de rigidité. Un équilibre entre la flexibilité et la rigidité pour conserver la forme des récepteurs artificiels dans le même MIP pourrait être réalisé avec les hydrogels.

En effet, plusieurs polymères connus pour former des hydrogels ont été proposés pour la fabrication de MIPs pour l'extraction des protéines. L'hydrogel le plus utilisé est le poly (acrylamide-co-N, N, méthylènebisacrylamide) qui a été proposé par Qin et al. [18].

Par exemple, les couches minces de ce polymère ont été greffées à la surface des particules d'un polystyrène chlorométhylé par la méthode iniferter (Initiator-transfer – termination). En effet, ce polymère peut être facilement modifié par la fixation du diéthylthiocarbamate DEDTC (l'iniferter) afin de réaliser une photopolymérisation radicalaire contrôlée (in situ). Cependant, il est bien connu que le copolymère qui constitue le support incurvé présente une étendue relativement faible des groupes réactifs de surface à modifier par le DEDTC. Une alternative est d'avoir un support dont la surface est riche en chlore.

Par exemple, Liu et Guo [19] ont utilisé des billes de PVC en milieu aqueux pour greffer les groupements de DEDTC (iniferter). Ils ont préparé des couches minces de polyacrylamide pour l'adsorption de métaux lourds toxiques. Dans ce travail nous établissons le lien entre les deux approches en raison de modifier les particules de PVC par le DEDTC pour la fabrication d'un macroiniferter capable d'initier la photo polymérisation radicalaire de l'acrylamide et du N, N, méthylènebisacrylamide en présence de lysozyme pris comme protéine modèle.

En effet, dans des diagnostics biomédicaux, le lysozyme permet de suivre diverses maladies telles que la tuberculose et la méningite fongique en plus de son activité anti-inflammatoire à l'intérieur du corps. En revenant à la technique d'impression moléculaire, notre approche proposée est originale, simple et facile à mettre en œuvre. Elle permet de fabriquer des particules biomimétiques de PVC modifiées par une couche de MIP pour l'adsorption spécifique et sélective de lysozyme. Les particules ont été caractérisées en termes de composition chimique de surface par XPS, de liaisons chimiques caractéristiques (par transmission IR) et de spectroscopie Raman.

Les couches de polymères non imprimées sur le PVC (PVC-NIP) ont été préparées dans les mêmes conditions, cependant en l'absence de lysozyme.

## Introduction générale

---

Pour les MIPs et après extraction du lysozyme de la matrice polymère, les particules de PVC ont été incubées dans une solution de lysozyme afin de déterminer des isothermes d'adsorption. La sélectivité des particules de MIP vis-à-vis du lysozyme a été testée en utilisant le cytochrome et les myoglobines dont la taille est similaire à celle du lysozyme.

Le premier chapitre de cette thèse s'appuie sur des travaux publiés afin d'expliquer les différentes étapes de la préparation des MIP. Le choix des réactifs de synthèse, les procédés de polymérisation et les méthodes de greffage des MIP sur des supports solides.

Le deuxième chapitre comporte une étude sur les propriétés et les caractéristiques des protéines, ainsi que leurs structures, le rôle et l'importance de ces derniers dans la vie de la cellule et l'organisme tout entier. La deuxième partie de ce chapitre portera sur les techniques de caractérisation utilisées dans ce travail.

Le troisième chapitre est présente la synthèse et la caractérisation des films de polyacrylamide à empreinte de lysozyme sur des particules granuleux de PVC. La préparation se fait de façon générale en trois étapes : greffage de l'amorceur inferter à la surface du PVC, la photo polymérisation et l'extraction de la molécule empreinte.

Le dernier chapitre est consacré à la présentation et la discussion des résultats de synthèse et les tests d'adsorption spécifique et sélective du MIPs préparée vis-à-vis de lysozyme.

### Bibliographie Introduction générale

- [1] Haupt, K.; Linares, A.V.; Bompart, M.; Bui, B. T. S. *Top.Curr.Chem.* 2012, 325, 1.
- [2] Ambrosini, S.; Beyazit, S.; Haupt, K.; Bui, B.T.S. *Chem. Commun.* 2013, 49, 6746.
- [3] Whitcombe, M.J.; Kirsch, N.; Nicholls, I. A.J. *Mol. Recognit.* 2014, 27, 297.
- [4] Lépinay, S.; Khémara, K.; Millot, M. C.; Carbonnier, B. *Chem. Pap.* 2012, 66, 340.
- [5] Marchyk, N.; Maximilien, J.; Beyazit, S.; Haupt, K.; Bui, B.T.S. *Nanoscale* 2014, 6, 2872.
- [6] Ahmad, R.; Griffete, N.; Lamouri, A.; Felidj, N.; Chehimi, M.M.; Mangeney, C. *Chem. Mater.* 2015, 27, 5464.
- [7] Ali, W.H.; Derrien, D.; Alix, F.; Pérollier, C.; Lépine, O.; Bayouhd, S.; Hugon, F.C.; Pichon, V. *J.Chromatogr. A* 2010, 1217, 6668.
- [8] Xu, X.; Zhou, G.; Li, H.; Liu, Q.; Zhang, S., Kong, J. *Talanta* 2009, 78, 26.
- [9] Yu, J.C.C.; Lai, E.P.C. *Toxins* 2010, 2, 1536.
- [10] Khlifi, A.; Gam-Derouich, S., Jouini, M.; Kalfat, R.; Chehimi, M. M. *Food Control* 2013, 31, 379.
- [11] Yoshimatsu, K. ; LeJeune, J. ; Spivak, D. A. ; Ye, L. *Analyst* 2009, 134, 719.
- [12] Li, Q.; Yang, K.; Liang, Y.; Jiang, B.; Liu, J.; Zhang, L.; Liang, Z.; Zhang, Y. *ACS Appl. Mater.Interfaces* 2014, 6, 21954.
- [13] Bolisay, L.D. ; Kofinas, P. *Macromol. Symp.* 2010, 291, 302.
- [14] Polreichova, M.; Latif, U.; Dickert, F.L. *Aust. J. Chem.* 2011, 64, 1256.
- [15] Ng, S.M.; Narayanaswamy, R. *Sens. Actuat. B* 2009, 139, 156.
- [16] Prasad, B.B.; Pandey, I. *Sens. Actuat. B* 2013, 181, 596.
- [17] Kan, X.; Xing, Z.; Zhu, A.; Zhao, Z.; Xu, G.; Li, C.; Zhou, H. *Sens. Actuat. B* 2012, 168, 395.
- [18] Qin, L.; He, X.W.; Zhang, W.; Li, W.Y.; Zhang, Y.K. *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 807.
- [19] Liu, P.; Guo, J.J. *Appl. Polym. Sci.* 2006, 102, 3385.

***CHAPITRE I***  
***GÉNÉRALITÉS SUR LES***  
***POLYMÈRES A EMPREINTES***  
***MOLECULAIRES***

En 1931, le groupe de Polyakov de Kiev [1] a introduit pour la première fois le caractère «empreinte» d'un polymère. Polykov a remarqué des propriétés inhabituelles de l'adsorption par des particules de silice des dérivés benzéniques utilisés lors de leur synthèse.

Dans les années 1940, Linus Pauling a émis l'hypothèse qu'un processus similaire à l'empreinte moléculaire pourrait être responsable de la sélectivité des anticorps contre leurs antigènes respectifs. Les premières applications n'apparaissent cependant que dans les années cinquante pour la séparation chirale des énantiomères de l'acide mantélique et de l'acide camphorsulfonique, en utilisant des particules de silice imprimées comme phase stationnaire en chromatographie [2].

Le concept d'empreinte moléculaire a été relancé dans les années 1970 lorsque Günter Wulff a découvert que des polymères organiques hautement réticulés pourraient également être utilisés pour rendre les empreintes moléculaires hautement spécifiques [3].

Depuis les années 1990, les polymères à empreintes moléculaires (MIP) (Molécular Imprinted Polymers) sont devenus des supports de reconnaissance moléculaire de plus en plus utilisés. Ces polymères, intelligents, présentent des propriétés de reconnaissances spécifiques et sont capables d'identifier, d'isoler et de capturer un composé cible présent même à l'état de traces. Il s'agit d'un véritable outil d'analyse et de diagnostic.

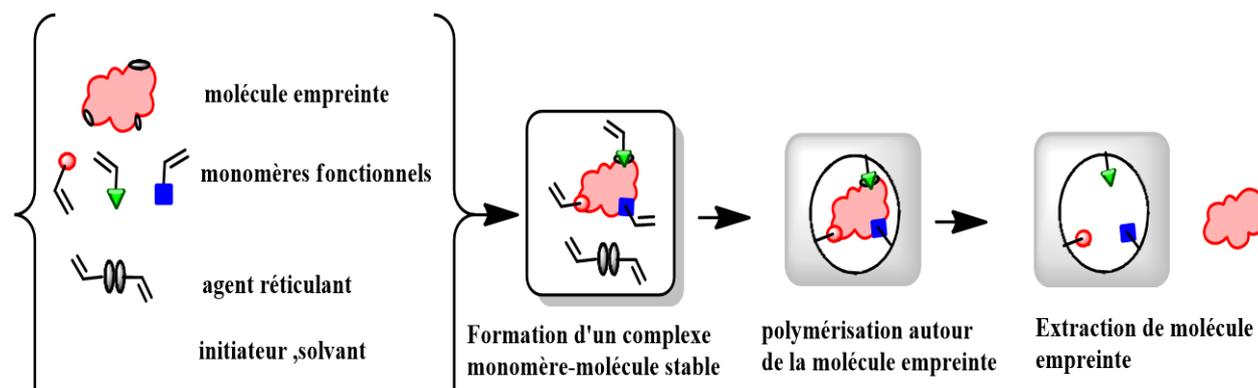
La technologie d'impression moléculaire (MIP) est aujourd'hui une approche synthétique stable pour concevoir des matériaux de reconnaissance moléculaire puissants capables d'imiter les entités de reconnaissance naturelle, tels que les anticorps et les récepteurs biologiques [4,5].

La conception des matériaux synthétiques, capables d'imiter les processus de reconnaissance dans la nature, est devenue un domaine de recherche important et actif au cours de ces dernières années, l'empreinte moléculaire étant l'une des stratégies suivies pour créer des matériaux avec une capacité de reconnaissance comparable aux systèmes naturels.

Le MIP est basé sur la formation d'un complexe entre une molécule empreinte (modèle) et un monomère fonctionnel. En présence d'un excès d'agent de réticulation, un réseau de polymère tridimensionnel [6] est formé. Après le procédé de polymérisation, le modèle est retiré du polymère, laissant apparaître des sites de reconnaissance spécifiques de forme, de taille et de fonctionnalité chimique à la molécule modèle (figure I.1).

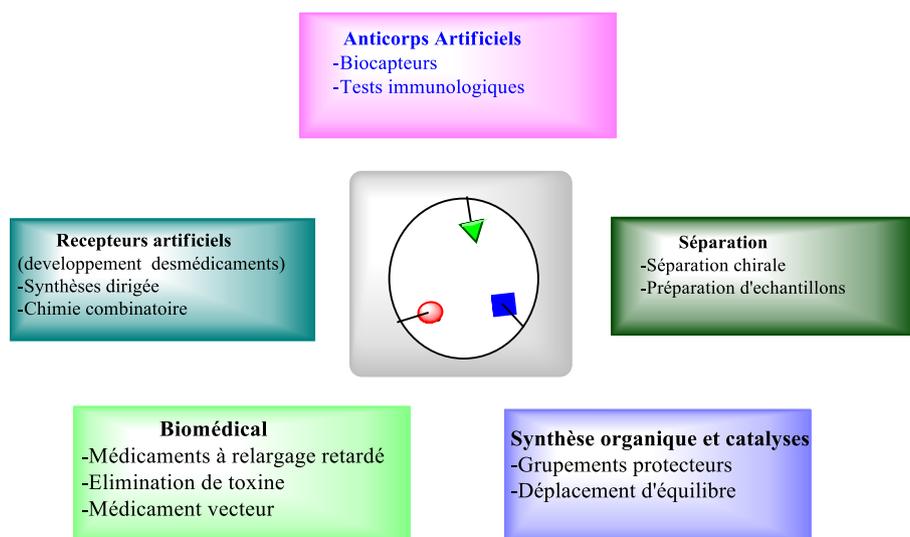
Habituellement, les interactions intermoléculaires comme les liaisons hydrogène, les interactions dipôle-dipôle et ionique entre la molécule modèle et les groupes fonctionnels

présents dans la matrice polymère entraînent les phénomènes de reconnaissance moléculaire. Ainsi, le polymère résultant reconnaît et ne se lie de manière sélective que des molécules modèles.



**Figure I.1.** Schéma réactionnel de la préparation de MIP

La méthode de polymère à empreinte moléculaire est considérée comme une technique polyvalente et prometteuse capable de reconnaître à la fois les molécules biologiques et chimiques, y compris les acides aminés et les protéines [7,8], les dérivés nucléotidiques [9], les polluants [10], les médicaments et les aliments [11,12]. En outre, les domaines d'application (figure I.2) comprennent : les sciences de séparation et de purification [13], les capteurs chimiques [14], la catalyse [15], la vectorisation des médicaments [16], les anticorps biologiques et le système des récepteurs [17].



**Figure I.2.** Les applications des polymères à empreintes moléculaires

## **I.1. Principe général de synthèse des MIPs**

Dans la synthèse des MIP en utilisant un initiateur thermique ou photochimique, les monomères polymérisent autour de la molécule empreinte induisant la création de cavités spécifiques à l'image complémentaire de cette molécule. Une fois la polymérisation achevée, la molécule empreinte est éliminée de la matrice polymérique ce qui conduit à la formation d'un polymère macroporeux renfermant de cavités spécifiques.

Si pour les anticorps les interactions dépendent de la molécule cible et des acides aminés impliqués dans le site de reconnaissance, dans le cas des MIPs, la nature des interactions est définie par la nature des monomères et du solvant de polymérisation utilisé pour la synthèse ce qui implique une optimisation de la procédure d'extraction pour favoriser le développement d'interactions spécifiques dans les cavités.

### **I.1.1. Les réactifs utilisés pour la préparation des MIPs**

La préparation des polymères à empreinte moléculaire emploie une variété de composants, comme les monomères fonctionnels, les agents de réticulation, les solvants et les initiateurs. Le procédé commence par la dissolution de la molécule empreinte (ME), des monomères fonctionnels et de l'agent de réticulation dans le solvant. Le choix de ces composants est important car ils ont une influence directe sur la performance du polymère imprimé final.

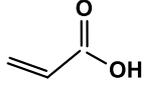
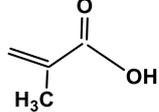
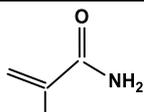
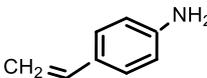
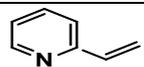
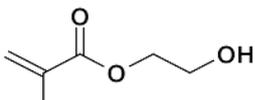
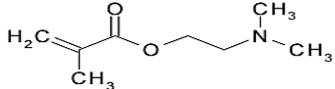
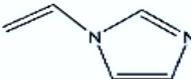
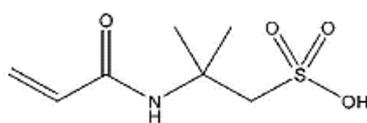
#### **I.1.1.1. Molécules empreintes et monomères fonctionnels**

Une large gamme de molécules empreintes comme les médicaments, les acides aminés, les glucides, les protéines, les bases nucléotidiques, les hormones, les pesticides et les enzymes ont été utilisées avec succès [18-23].

Le choix du monomère est très important pour créer des cavités très spécifiques. La nature des interactions est définie par la nature de ces monomères. Le choix des monomères fonctionnels est primordial pour avoir une complémentarité des interactions avec la molécule empreinte.

Les monomères fonctionnels (tableau I.1.) sont des acides carboxyliques (acide acrylique, acide méthacrylique, acide vinylbenzoïque), acides sulfoniques (acide 2-acrylamido-2 méthylpropane sulfonique), bases hétéroaromatiques (vinylpyridine, vinylimidazole). Dans l'approche non covalente, ils sont utilisés en excès par rapport à l'empreinte modèle pour favoriser la formation d'assemblages de modèle-monomère.

**Tableau I.1.** Monomères fonctionnels commercialisés

Nom du monomère	Formule
Acide acrylique	
Acide methacrylique	
Methacrylamide	
4- vinylaniline	
4- vinylpyridine	
Hydroxyéthylméthacrylate	
Méthacrylate du (N,N-diméthylamino) éthyle	
1-Vinylimidazole	
Acide 2-Acrylamido-2-méthylpropane sulfonique	

Dans le cas de la voie covalente, la cible est liée de manière covalente au monomère fonctionnel pour former une cible polymérisable.

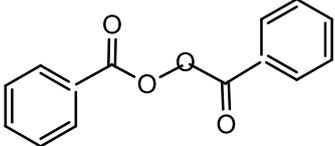
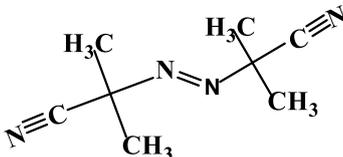
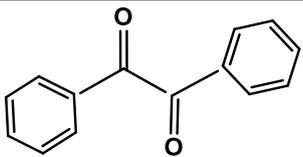
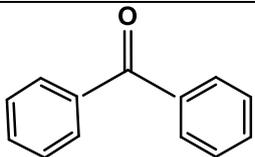
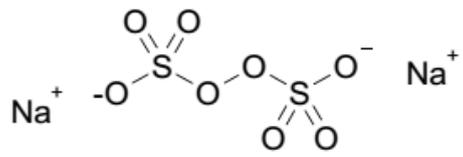
### I.1.1.2. Initiateurs de polymérisation

L'initiation de la polymérisation se fait par voie thermique ou photochimique. Plusieurs procédés de production de radicaux sont utilisables. On distingue :

- Les amorceurs thermiques, générant les radicaux par décomposition thermique, par exemple l'AIBN (azobisisobutyronitrile) ;
- Les amorceurs photochimiques, générant des radicaux sous l'action d'un rayonnement lumineux ou UV, par exemple le 1,2 diphényléthanedione (benzile).

L'inconvénient de ce type d'initiateur est qu'il forme des radicaux stables avec l'oxygène qui inhibent la polymérisation. Pour favoriser une bonne propagation de la polymérisation, il est nécessaire d'éliminer l'oxygène du milieu réactionnel, en faisant barboter le milieu avec un gaz inerte. Le tableau I.2 regroupe quelques initiateurs utilisés dans la polymérisation à empreinte moléculaire.

**Tableau I.2 :** Exemples sur les initiateurs utilisés dans la préparation des MIPs

Nom de l'initiateur	Formule
Peroxyde de dibenzoyle	
Azobisisobutyronitrile	
1,2-diphényléthanedione	
Benzophénone	
Sodium persulfate	

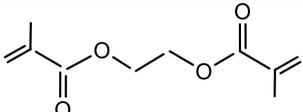
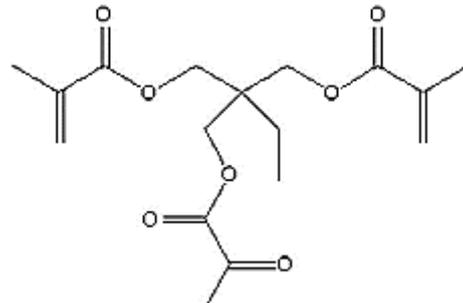
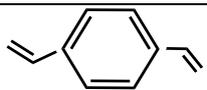
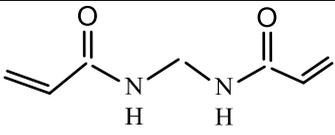
### I.1.1.3. Les agents réticulants

Dans la synthèse des polymères imprimés, Les agents de réticulation sont aussi importants que les monomères fonctionnels. Ils contrôlent la morphologie de la matrice polymère, sert à stabiliser les sites de liaison imprimés et confère une stabilité mécanique à la matrice polymère afin de conserver sa capacité de reconnaissance moléculaire [24]. Différents agents de réticulation ont été utilisés (tableau I.3).

Des rapports de réticulation élevés sont généralement utilisés dans le but d'obtenir des matériaux poreux (macroporeux) avec une stabilité mécanique adéquate. Ethylène glycol

diméthacrylate (EGDMA) et le triméthylolpropanetriméthacrylate (TRIM) sont les plus couramment utilisés. Certains auteurs ont constaté que le réticulant a un impact majeur sur les caractéristiques physiques des polymères et beaucoup moins d'effet sur les interactions spécifiques entre le modèle et les monomères fonctionnels [25,26].

**Tableau I.3 :** Exemples sur les agents de réticulation utilisés dans la préparation des MIPs

Nom de l'agent réticulant	Formule
Ethylène glycol diméthacrylate	
Triméthylolpropane triméthacrylate	
Divinylbenzene	
N,N-méthylenbisacrylamide	

#### I.1.1.4. Solvants

Le rôle des solvants, est de rassembler les monomères et la molécule empreinte, l'agent de réticulation en une seule phase durant la polymérisation et est responsable des pores dans le MIP. Un bon solvant doit pouvoir produire des cavités. Une augmentation du volume de solvant augmente aussi la taille des pores dans le MIP. Dans l'approche non-covalente, le solvant joue un rôle important, car il doit promouvoir la formation du complexe monomère-analyte. Les solvants moins polaires aident à faciliter les interactions polaire non-covalente, comme les ponts hydrogène.

L'emploi d'un solvant polaire tend à dissocier les interactions non-covalentes monomères-molécule empreinte, dans la phase de formation du complexe. L'action devient encore plus prononcée si un solvant protéique est employé, car il perturbe les liaisons hydrogène. Les solvants les plus utilisés sont le toluène, le chloroforme, le dichlorométhane et

l'acétonitrile (tableau I.4). Même si les solvants polaires sont contre-indiqués, une autre possibilité d'avoir de fortes interactions entre la molécule empreinte et le monomère peut passer par leur utilisation, avec comme exemple de l'eau. La complexation passe alors par des liaisons de coordination qui sont catalysées par un chélate métallique.

**Tableau I.4.** Les caractéristiques des principaux solvants utilisés dans la synthèse des MIPs

Solvant	Constante diélectrique	Formation de liaison hydrogène
Toluène	2.4	P*
Dichlorométhane	8.9	P
chloroforme	4.8	P
Acétonitrile	37.5	P
Éthanol	32.7	F*
Eau	80	F*

\*P : pauvre caractère donneur ou accepteur de liaison H

\*F : fort caractère donneur ou accepteur de liaison H

## I.2. Les différentes approches pour la préparation des MIPs

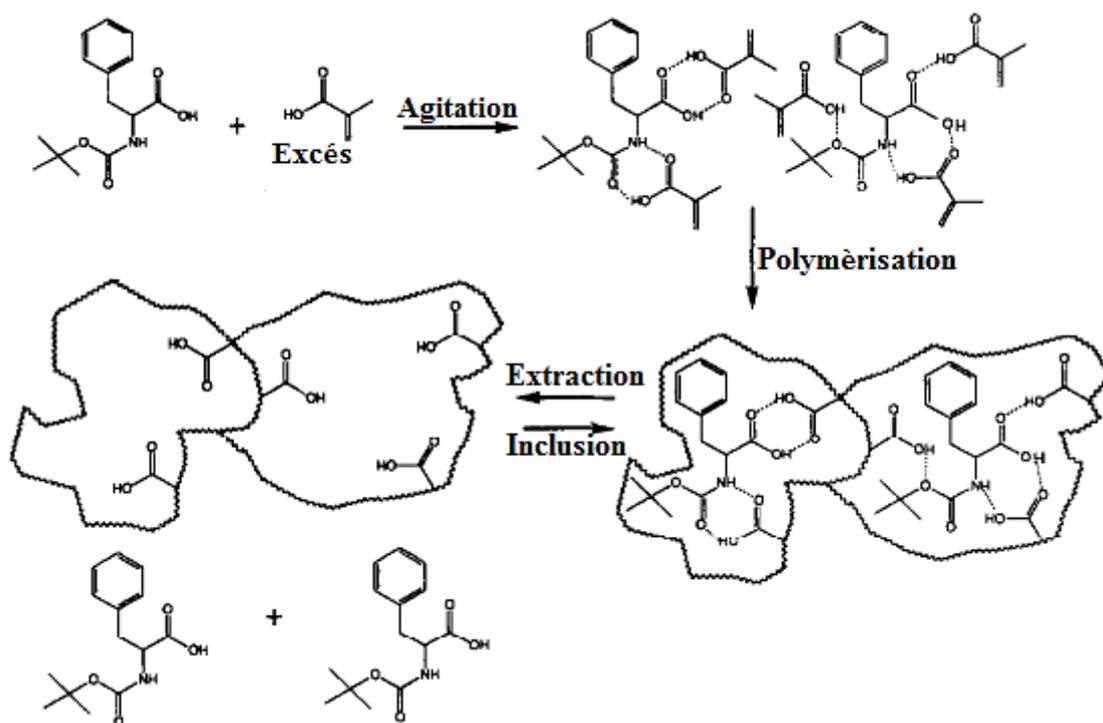
L'impression moléculaire consiste à créer des images complémentaires des « empreintes moléculaires » d'une molécule cible dans un polymère synthétique. Afin de lier la molécule empreinte, trois approches différentes sont actuellement utilisées : l'approche covalente réversible, non-covalente (pont hydrogène, force de van der Waals, force ionique, etc.) et une combinaison des deux.

### I.2.1. La méthode non covalente

La molécule empreinte (Template) est mise en contact avec un mélange de monomères portant des groupements fonctionnels capables de la complexer par exemple par liaisons hydrogène, liaisons ioniques ou interactions hydrophobes figure (I.3.a).

La polymérisation conduite en présence d'un monomère réticulant, permet d'obtenir un réseau polymères rigide qui après élimination de la molécule empreinte, porte des sites complémentaires de cette dernière, capables de la reconnaître de manière spécifique [27,28].

La présence d'un solvant porogène dans le mélange de polymérisation permet de créer une structure méso ou macroporeuse qui facilite l'élimination de la molécule cible après la synthèse et son accès aux sites lors de l'utilisation très souple dépend peu de la nature de la molécule cible [29]. De plus, elle est proche des systèmes biologiques dont elle s'inspire.

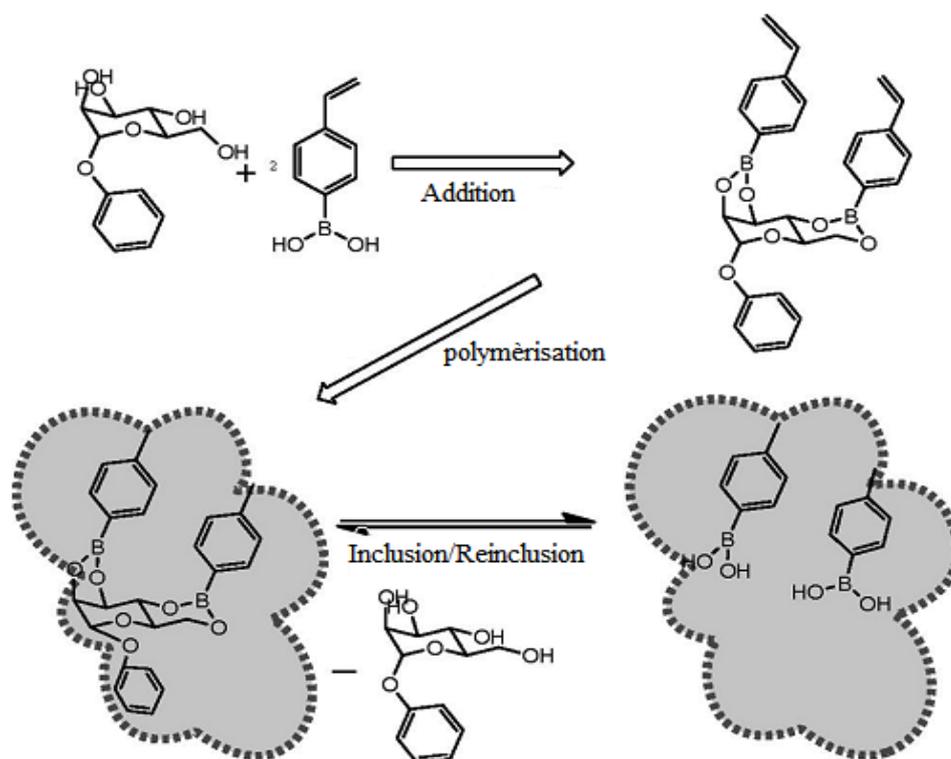


*Figure I.3.a. Approche non covalente à partir de Boc-phénylalanine en utilisant l'acide méthacrylique [29]*

### I.2.2. La méthode covalente

Dans cette approche des dérivés polymérisables de la molécule empreinte sont tout d'abord synthétisés pour libérer les sites, les liaisons entre les monomères et la molécule empreinte doivent être clivées par voie chimique figure (I.3.b). Lors de l'utilisation du polymère imprimé, les liaisons covalentes ou non covalentes peuvent être établies entre celui-ci et la molécule cible. Cette approche a été introduite par le groupe de Wulff [28].

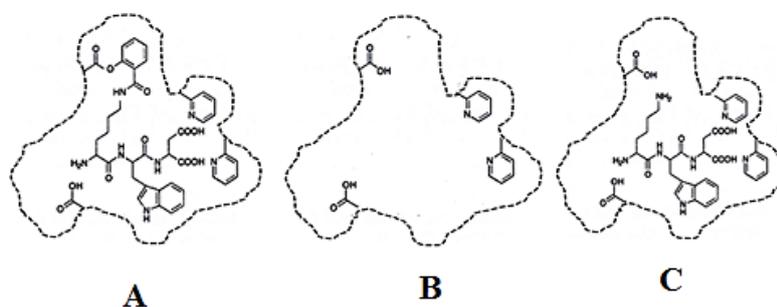
Les polymères à empreintes moléculaires (MIPs) ont en général une très haute sélectivité pour leur molécule cible, comparable à celle des anticorps pour leurs antigènes. Ils ont été surnommés pour cette raison «antibody mimics» [30]. Ils peuvent être utilisés, entre autres, comme matrice d'affinité en séparation comme récepteurs artificiels pour le ciblage des bibliothèques combinatoire, comme éléments de reconnaissance dans les capteurs, ainsi qu'en immunoanalyse, ou en synthèse et catalyse.



**Figure I.3.b.** Approche covalente à partir de phényl-D-mannoside utilisant l'acide vinylphénylboronic [29].

### I.2.3. La méthode semi-covalente

L'approche semi-covalente (figure I.3.c) est un cumule des deux méthodes précédentes. Des liaisons covalentes sont établies entre la molécule cible et les monomères fonctionnels avant la polymérisation. La fonction formée lors de la coupure de cette liaison covalente sera utilisée pour la reconnaissance.



**Figure I.3.c.** Approche semi-covalente

Empreinte moléculaire du tri peptide Lys-Trp-Asp créée dans un réseau polymère en utilisant à la fois des interactions covalentes et non covalentes A : site d'adsorption après polymérisation ; B : site d'adsorption après hydrolyse et extraction de la molécule cible ; C : reconnaissance de la molécule cible lors de l'utilisation du polymère imprimé.

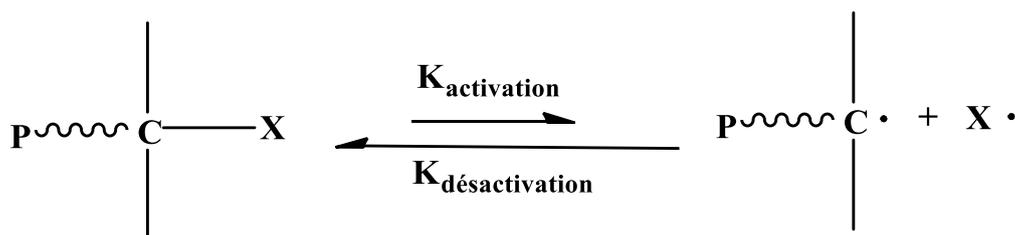
### I.3. Polymérisation

Différents modes de polymérisation existent pour la conception d'un polymère à empreintes moléculaires. Ainsi, suivant la synthèse, le MIP résultant peut se présenter sous la forme d'un monolithe ou de particules sphériques poly- ou mono-disperses [31].

#### I.3. 1. La polymérisation radicalaire contrôlée (PRC)

Plusieurs méthodes de polymérisations existantes (cationique, anionique, polycondensation, ...), la polymérisation radicalaire est un processus très souvent utilisé car elle ne nécessite pas de purification poussée des réactifs et est tolérante vis-à-vis de l'eau contrairement aux polymérisations ioniques. Cependant, la polymérisation radicalaire classique présente certains inconvénients. En effet, cette méthode n'assure aucun contrôle des masses molaires et de leur distribution. Ceci est dû à la forte réactivité des radicaux propageant entraînant de nombreuses réactions secondaires de transfert de chaîne et de terminaison. De plus, l'amorçage se fait tout au long de la polymérisation.

L'architecture des chaînes formées est mal définie et est difficilement contrôlable. Ces réactions sont intrinsèques au mécanisme de polymérisation radicalaire, c'est pourquoi elles pourront tout au mieux être minimisées. C'est le principe de la polymérisation radicalaire contrôlée qui est basée sur un équilibre dynamique rapide entre des espèces actives propageant (radicaux) présentes en faible quantité et une majorité d'espèces dormantes (Figure.4). En effet, cet équilibre est fortement déplacé vers la formation des espèces dormantes ce qui permet de réduire l'impact des réactions de terminaison et de transferts irréversibles sur la structure des chaînes.



*Figure I.4. Principe de la polymérisation contrôlée X : agent désactivant*

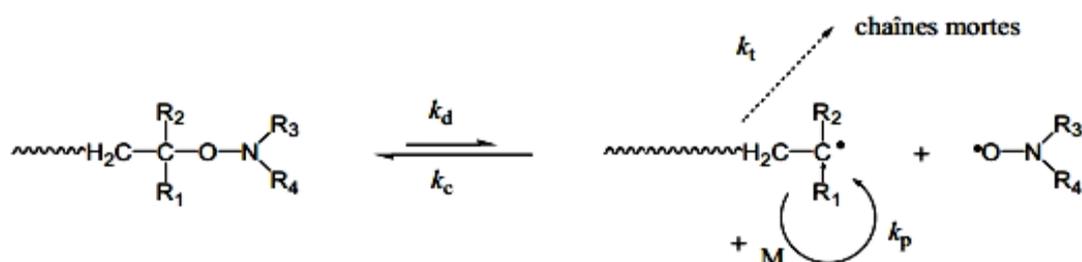
Les processus de polymérisation radicalaire contrôlée les plus étudiés sont :

- ✓ La polymérisation radicalaire en présence de nitroxydes (NMP) ;
- ✓ La polymérisation radicalaire par addition/fragmentation réversible (RAFT) ;
- ✓ La polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP) ;
- ✓ La polymérisation radicalaire en présence des iniferters.

### I.3.1.1. Polymérisation radicalaire en présence de nitroxydes (NMP)

La polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxydes repose sur un équilibre de terminaison réversible entre le radical de la chaîne en croissance et un radical nitroxyde [32] (figure I.5). Les nitroxydes (R1)(R2)N-O· sont des radicaux stables, du fait de la délocalisation de l'électron libre sur l'azote et l'oxygène, donnant naissance à deux formes mésomères.

Les nitroxydes sont ainsi trop stables pour pouvoir se coupler entre eux ou amorcer une polymérisation. Cependant, ils peuvent se coupler avec des radicaux carbonés beaucoup plus réactifs pour former des alcoxyamines. La liaison C-O de l'alcoxyamine peut se rompre homolytiquement sous l'action de la température.



**Figure I.5.:** Équilibre d'activation/désactivation caractéristique de la NMP, avec  $k_d$  la constante dissociation et  $k_c$  celle de recombinaison

### I.3.1.2. La polymérisation radicalaire par addition/fragmentation réversible (RAFT)

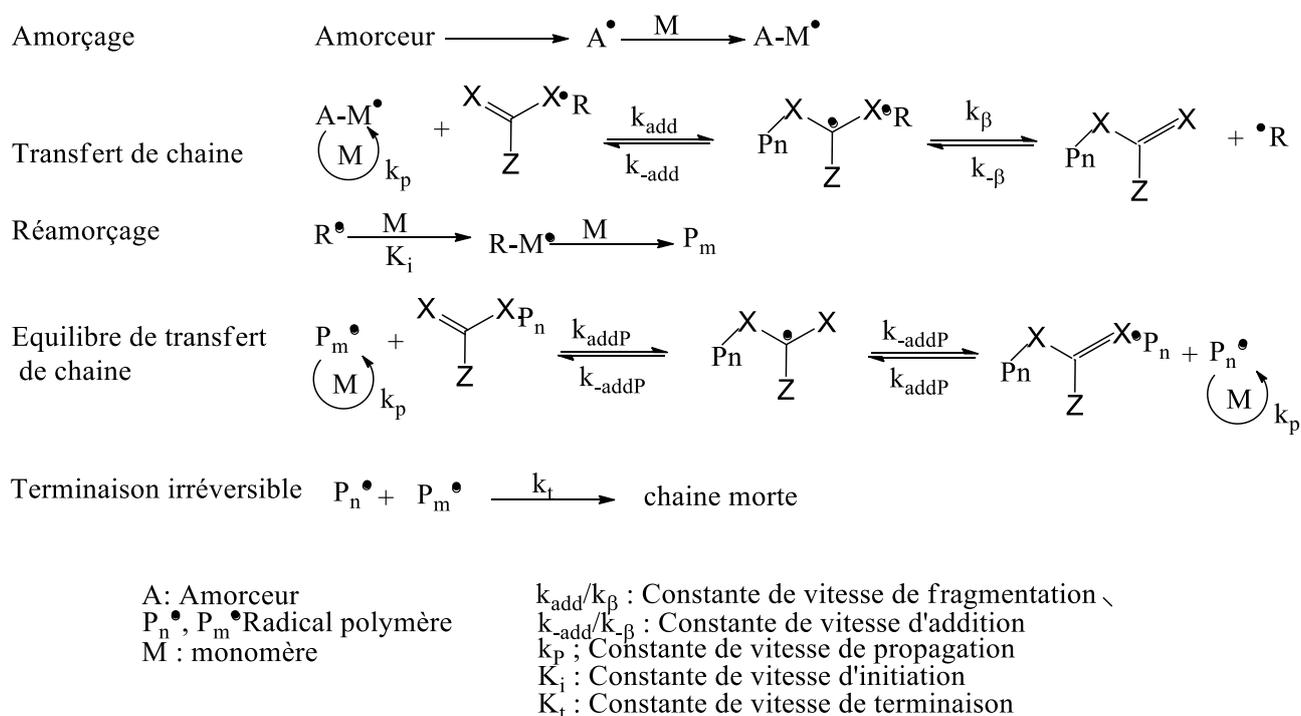
La polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (en anglais : Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT)) est une technique de polymérisation radicalaire contrôlée.

La polymérisation de type RAFT permet de synthétiser des polymères d'architecture contrôlée (polymères à blocs, étoiles, peignes, etc) de faible polydispersité et de haute fonctionnalité. Les applications de ces polymères sont, parmi d'autres, l'encapsulation de principes actifs de médicaments, la production de revêtements et peintures de nouvelles génération, la microfluidique, les tensioactifs, les adhésifs et les membranes.

La RAFT (figure I.6.) repose sur un mécanisme de transfert de chaîne réversible qui se compose de deux équilibres d'addition-fragmentation mettant en jeu un agent de transfert de type thiocarbonylthio (agents de transfert les plus utilisés). L'initiation ainsi que la terminaison entre radicaux sont les mêmes qu'en polymérisation radicalaire classique.

Après décomposition de l'amorceur (type AIBN: azobisisobutyronitrile) en radicaux, la première espèce radicalaire produite s'additionne au monomère pour former un radical carboné qui va ensuite réagir rapidement avec l'agent de transfert pour former l'entité radicalaire correspondante.

Cette dernière va se fragmenter en un amorceur et en un nouveau radical capable de réamorcer une polymérisation. La polymérisation RAFT vise à minimiser les réactions de terminaison irréversible grâce à la présence d'un nombre limité de radicaux dans le milieu réactionnel. Toutefois, il est possible qu'une telle réaction se produise entre deux espèces actives et notamment lorsque la concentration en amorceur est trop élevée (le rapport entre la concentration initiale en amorceur et la concentration initiale en agent de transfert doit être suffisamment basse).



**Figure I.6.** Mécanisme de polymérisation radicalaire (RAFT)

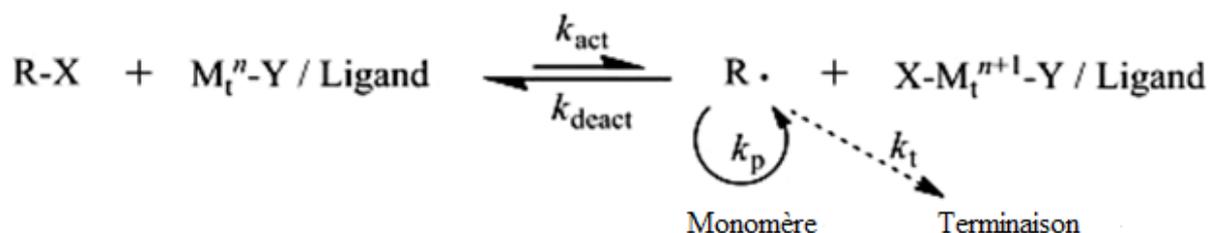
### I.3.1.3. Polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP)

Depuis sa première découverte en 1995 ATRP a attiré l'attention des communautés académiques et industrielles en raison de sa polyvalence dans la synthèse des polymères avec des poids moléculaires prévisibles, des dispersités et des fonctionnalités spécifiques, la disponibilité facile de nombreux types d'initiateurs et de catalyseurs et son applicabilité

générale pour une large gamme de monomères (tels que (méth) acrylates, styrène et ses dérivés, 2- / 4-vinylpyridine, acrylamides, etc.).

Dans un système ATRP contrôlé, on établit un équilibre rapide et dynamique entre les espèces dormantes (par exemple les halogénures d'alkyle) et les espèces actives (radicaux), les complexes de métaux de transition agissant en tant que réactifs de transfert d'atomes d'halogène réversibles (figure I.7.), faible concentration radicale dans le système et entraîne une terminaison radicale négligeable et une polymérisation contrôlée.

Jusqu'à présent, de nombreux métaux de transition tels que Cu, Ru, Ni et Fe, ainsi que divers ligands (Ex. 2,2'-bipyridine et ses dérivés, N, N, N', N''-pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDETA) et la tris (2- (diméthylamino) éthyl) amine (Me-TREN)) ont été utilisés avec succès pour initier l'ATRP contrôlée, où les complexes Cu/ligand sont les plus utilisés. Les polymères préparés via l'ATRP contiennent normalement un groupe terminal d'halogénure "vivante", qui permet leur modification ultérieure en utilisant des procédures organiques standard (par exemple, une substitution nucléophile) ou par leur réinitialisation avec l'ATRP d'autres monomères



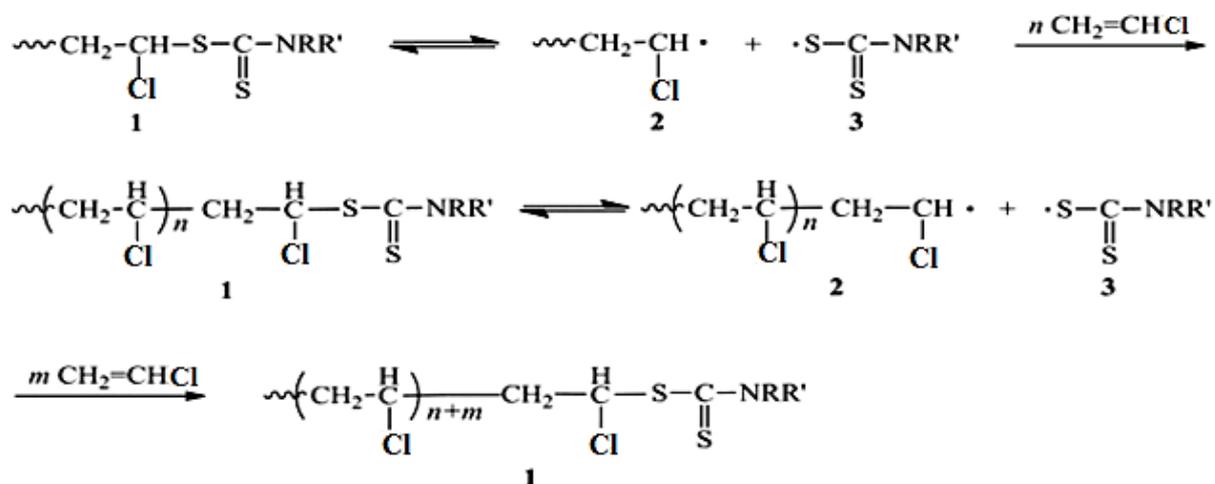
*Figure I.7. Mécanisme de Polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP)*

#### I.3.1.4. Polymérisation radicalaire en présence d'iniferters

Les iniferters sont des molécules qui se décomposent en deux radicaux libres sous l'effet de la chaleur (60-100°C), ou sous irradiation UV. Ils sont capables d'amorcer la polymérisation en donnant lieu à des réactions de transfert et de terminaisons réversibles. En 1982, Ostu et al. [33] ont été les premiers à étudier la polymérisation radicalaire «vivante» induite par l'iniferters, où un iniferters a été défini comme un composé qui peut simultanément agir comme initiateur, agent de transfert et agent de terminaison dans le processus de polymérisation radicalaire.

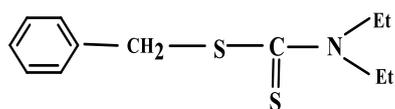
La maîtrise de la polymérisation radicalaire «vivante» induite par l'iniferters est basée sur l'utilisation d'un iniferters (dithiocarbamates) et de l'équilibre dynamique résultant entre les

espèces dormantes (Iniferters) 1 et les espèces actives (radicaux propageurs) 2, avec des radicaux "stables" 3 (radicaux dithiocarbamate) agissant comme agents importants pour les radicaux de propagation (figure I.8).

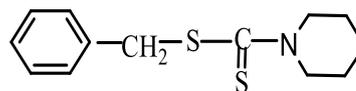


**Figure I.8.** Mécanisme de polymérisation radicalaire «vivante» induite par Iniferters

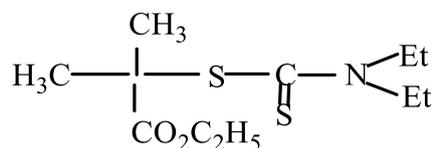
Les iniferters qui ont été utilisés, figure I.9, sont généralement des molécules asymétriques et leur activation donne un premier radical amorceur ( $X^*$ ) et un second, plus stable n'intervenant que lors des réactions de terminaison réversibles ( $Y^*$ ). L'activation de la liaison labile des iniferters C-S peut se faire par voie photochimique ou par voie thermique [34,35]. De plus, dans le cas d'iniferters, les radicaux peuvent être réactivés une fois la polymérisation terminée, on parle dans ce cas d'une polymérisation vivante.



N,N,diéthylthiocarbamate de benzyle



N-pipéridinodithiocarbamate de benzyle



N,N,diéthylthiocarbamate isobutyrate d'éthyle

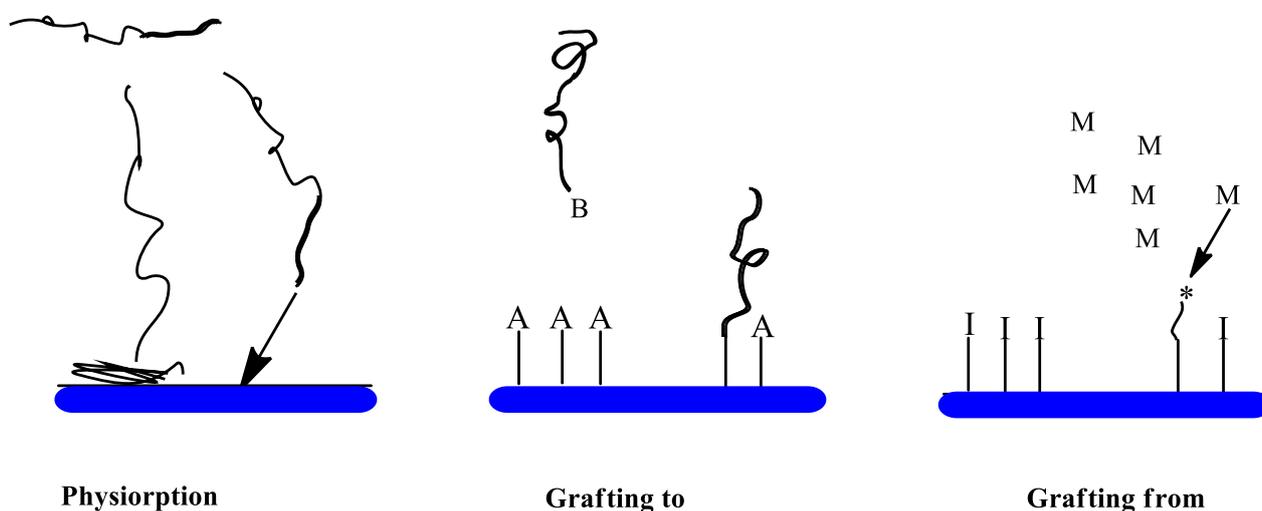
**Figure I.9.** Exemples des iniferters utilisés



1. La résine de Merrifield et la résine de Wang [36,37] qui sont des copolymères polystyrène-co-divinylbenzène (PS-co-DVB) ou PS-co-DVB fonctionnalisés, respectivement, par un chlore et un alcool benzylique ;
2. Les résines Tenta-Gel et Argo-Gel [38,39] qui sont des copolymères PS-co-DVB greffés par le poly(éthylène glycol) ou PEG.

#### I.4.2. Méthodes de greffage de polymères sur supports

Le greffage de polymères sur un support solide est une méthode largement utilisée pour la modification de surfaces solides. Ce greffage (figure I.11.) peut se faire par plusieurs méthodes : méthodes physiques ou physisorption, soit par greffage de manière covalente du polymère sur le support (stratégies "grafting to" et "grafting from"[40,41]).



*Figure I.11. Méthodes de greffage de polymères sur supports*

##### I.4.2.1. Méthode d'adsorption (physisorption)

Dans cette méthode de greffage le polymère est lié à la surface du support par des interactions de Van der Waals ou des liaisons hydrogène. Dans le cas de copolymères à blocs, l'un des blocs du copolymère est adsorbé préférentiellement à la surface [42].

L'inconvénient de cette méthode est l'instabilité thermique et chimique du système à cause des faibles interactions entre le polymère et le support, mais également dans le mauvais contrôle de la densité de greffage. Cette méthode de greffage n'est pas la plus utilisée pour greffer des co-polymères, néanmoins plusieurs études ont été menées avec des supports inorganiques [43].

#### **I.4.2.2. La méthode « grafting to » (GT)**

Dans cette méthode, les chaînes de polymère sont amorcées en solution et réagissent ensuite avec des groupements fonctionnels sur la surface immobilisés dans une étape préalable. Les techniques de GT sont donc limitées par la diffusion des chaînes de polymères et la difficulté de celles-ci à s'intercaler au travers des chaînes déjà accrochées sur le substrat. De ce fait, la méthode de GT mène, généralement, à de faibles densités de greffage des couches de polymère.

#### **I.4.2.3. La méthode « grafting from » (GF)**

La méthode «grafting from » permet la croissance de greffons préparés in situ à partir d'un amorceur préalablement immobilisé sur le substrat ; c'est-à-dire dans cette méthode la polymérisation est amorcée à la surface à partir d'un précurseur moléculaire précédemment fixé. Cette méthode, aussi appelée Surface-Initiated Polymerization (SIP), conduit, le plus souvent, à la formation de brosses de polymère, c'est-à-dire des chaînes de polymère linéaires densément greffées au substrat par une des extrémités de chaîne. L'avantage du GF réside dans le fait que n'importe quelle technique de polymérisation en chaîne peut être adaptée à la SIP.

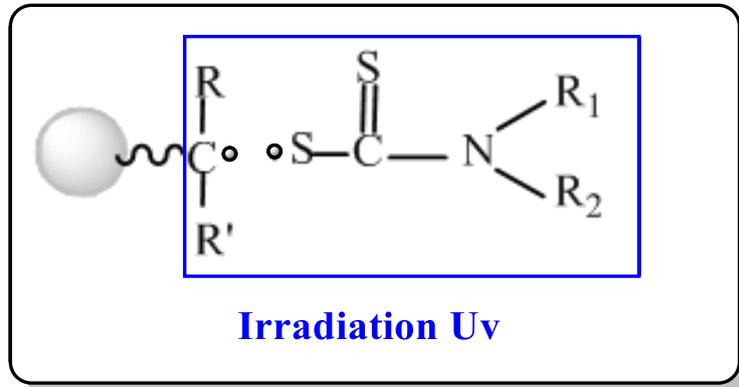
#### **I.4.3. Polymérisation radicalaire en présence d'iniferter sur supports solide**

La polymérisation radicalaire en présence d'iniferter sur supports a été proposée comme nouvelle technologie d'impression de surface pour la synthèse d'un polymère à empreinte moléculaire ayant une morphologie particulière et une meilleure accessibilité aux sites de liaison spécifique [44]. Malheureusement, la polymérisation en solution et la gélification résultante sont difficiles à éviter en utilisant la surface initiée par polymérisation radicalaire traditionnelle.

Le polymère supplémentaire en solution conduirait à des sites de reconnaissance hétérogènes et traînée de pic lorsqu'il est utilisé comme phase stationnaire [45]. Une solution à cette lacune est d'utiliser l'iniferter (transfert initiateur agent de terminaison) qui est un type d'initiateurs de polymérisation radicalaire vivante initié à partir d'une surface (SIP).

L'iniferter a été utilisé avant sous forme dissoute, mais ici la polymérisation en solution pourraient être évitée en fixant l'amorceur iniferter à la surface du support avant qu'il ne soit activé [46]. Sous irradiation ultraviolet, l'iniferter (figure I.12.) se décompose en radicaux actifs et non actifs où le radical actif liée à la surface du support initie la

polymérisation radicalaire tandis que le non-actif en solution réagit avec les radicaux pour former une "espèce dormantes" de croissance.



*Figure I.12. Décomposition de l'iniferteur sous irradiation UV*

## Bibliographie du Chapitre I

- [1] Polyakov, M.V.; Zhur. Fiz. Khim. 1931, 2S, 799.
- [2] Curti, R.; Colombo, U. J. Am. Chem. Soc 1952, 74, 3961.
- [3] Wulff, G.; Vesper, W.; Grobe-Einsler, R. ; Sarhan, A. ; Makromol. Chem. 1977, 178, 2799.
- [4] Mosbach, K.; Ramström, O. Nature Biotechnology 1996, 14, 163.
- [5] Poma, A.; Turner, A.P.F.; Piletsky, S.A. Trends Biotechnol. 2010, 28, 629.
- [6] Ramstrom, O.; Mosbach, K.; Curr. Opin. Chem. Biol. 1999, 3, 759.
- [7] Bergmann, N.M; Peppas, N .A. Prog. Polym. Sci. 2008, 33, 271.
- [8] Scorrano, S.; Mergola, L.; Del Sole, R. ; Vasapollo, G. Int. J. Mol. Sci. 2011, 12, 1735.
- [9] Longo, L.; Vasapollo, G. Org. Chem. 2008, 5, 163.
  
- [10] Shi, X.; Wu, A.; Qu, G.; Li, R.; Zhang, D. Biomaterials 2007, 28, 3741.
- [11] Puoci, F. ; Cirillo, G. ; Curcio, M.; Iemma, F.; Spizzirri, U.G.; Picci, N. Anal. Chim. Acta 2007, 593, 164.
- [12] Cunliffe, D. ; Kirby, A.; Alexander, C. adv. Chim. Acta 2007, 591, 29.
- [13] Pichon, V.; Chapuis-Hugon, F. Anal. Drug. Deliv. Rev 2002, 57, 1836.
- [14] Piletsky, S.A.; Turner, N.W.; Laitenberger, P. Med. Eng. Phys. 2006, 28, 971.
- [15] Li, W. ; Li, S. Adv. Polym. Sci. 2007, 206, 191.
- [16] Iemma, F. ; Picci, N. Curr. Drug Deliv. 2008, 5, 85.
- [17] Ge, Y.; Turner A. P. F. Chem. Eur. J. 2009, 15, 8100.
- [18] Bossi, A.; Bonini, F.; Turner, A.P.F.; Piletsky, S.A. Biosens. Bioelectron. 2007, 22, 1131.
- [19] Morelli, I.; Chiono, V.; Vozzi, G.; Ciardelli, G.; Silvestri, D.; Giusti, P. Sensors and Actuators B: Chemical 2010, 150, 394.
- [20] Scorrano, S.; Mergola, L.; Del Sole, R.; Vasapollo, G. Int. J. Mol. Sci. 2011, 12(3), 1735.
- [21] Liang, C.; Peng, H.; Bao, X.; Nie, L.; Yao, S. Analyst 1999, 124, 1781.
- [22] Tamayo, F.G.; Casillas, J.L.; Martin-Esteban, A. Anal. Bioanal. Chem. 2005, 381, 1234.
- [23] Baggiani, C.; Anfossi, L.; Giovannoli, C. Anal. Chim. Acta 2007, 591, 29.

- [24] Sellergren, B. Trends Anal. Chem. 1999, 18, 164.
- [25] Molinelli, A.; O'Mahony, J.; Nolan, K.; Smyth, M.R.; Jakusch, M.; Mizaikoff, B. Anal. Chem. 2005, 77, 5196.
- [26] Navarro-Villoslada, F.N.; San Vicente, B.; Moreno-Bondi, M. Anal. Chim. Acta 2004, 504, 149.
- [27] Takeuchi, T.; Haginaka, J. J. chromatogr. B 1999, 728, 1.
- [28] wulff, G. Angew, chem. inter. Ed. Engl. 1995, 34, 1812.
- [29] Mayes, A.G; Mosbah, K. Trends Anal. Chem. 1997, 16, 321.
- [30] Vlatakis, G. ; Andersson, LI. ; Muller, R. ; Mosbah, K. ; Nature, 1993, 361, 645.
- [31] Selergren, B.; Molecularly Imprinted Polymers : Man-made Mimics of Antibodies and their Applications in Analytical Chemistry, 1<sup>st</sup> edition , Elsevier, 2001.
- [ 32] Hawker, C.J.; Bosman, A.W.; Harth, E. Chem. Rev. 2001, 101, 3661.
- [33] Otsu, T. ; Yoshida, M. ; Taraki, T. Makromol. Chem., Rppid Comrnun. 1982, 3,133.
- [34] Bertin, D.; Boutevin, B.; Gramain, P.; Fabre, J-M. and Montginoul, C. Eur. polym. J. 1998, 34, 85.
- [35] Jagur-Grodzinski, J. react. Funct. Polym. 2001, 49, 1.
- [36] Merrifield, R.B. J. Am. Soc, 1963, 85, 2149.
- [37] Sieber, P. Tetrahedron.lett. 1987, 28, 6147.
- [38] Bayer, E. Angew, chem. int. ed., 1999, 30,113.
- [39] Gooding, G.; Baudart, WS.; Deegan, T.L.; Heisler, K.; Labadie, J.W.; Newcomb, W.S. porcoJr, J.A.; Van Eikeren, P. J. Comb. Chem. 1999, 1,113.
- [40] Minko, S.; Patil, S.; Datsyuk, V.; Simon, F.; Eichhorn, K-J. ; Motornov, M. ; Usov, D. ; Tokarev, I. ; Stamm, M. ; Langmuir, 2002, 18, 289.
- [41] Sidorenko, A. ; Minko, S. ; Schenk-Meuser, K. ; Duschner, H. ; Stamm, M. Langmuir, 1999, 15,8349.
- [42] Halperin, A.; Tirrell, M.; Lodge, T.P.; Adv. polym. sci. 1992, 100, 31.
- [43] Motschmann, H. ; Stamm, M. ; Toprakcioglu, C. Macromolécules 1991, 24, 3681.
- [44] Sulizky, C.; Rueckert, B.; Hall, A.J.; Lanza, F.; Unger, K.; Sellergren, B. Macromolecules 2002, 45, 79.
- [45] Fairhurst, R.E.; Chassaing, C.; Venn, R.F.; Mayes, A.G. Biosens. Bioelectron. 2004, 20, 1098.

- [46] Qin, L.; He, X.W.; Zhang, W.; Li, W.Y.; Zhang, Y.K.; J. chromatogr. A 2009, 1216, 807.

***CHAPITRE II***  
***GÉNÉRALITÉS SUR***  
***L'ADSORPTION ET***  
***L'ADSORPTION DES PROTEINES***

## Introduction

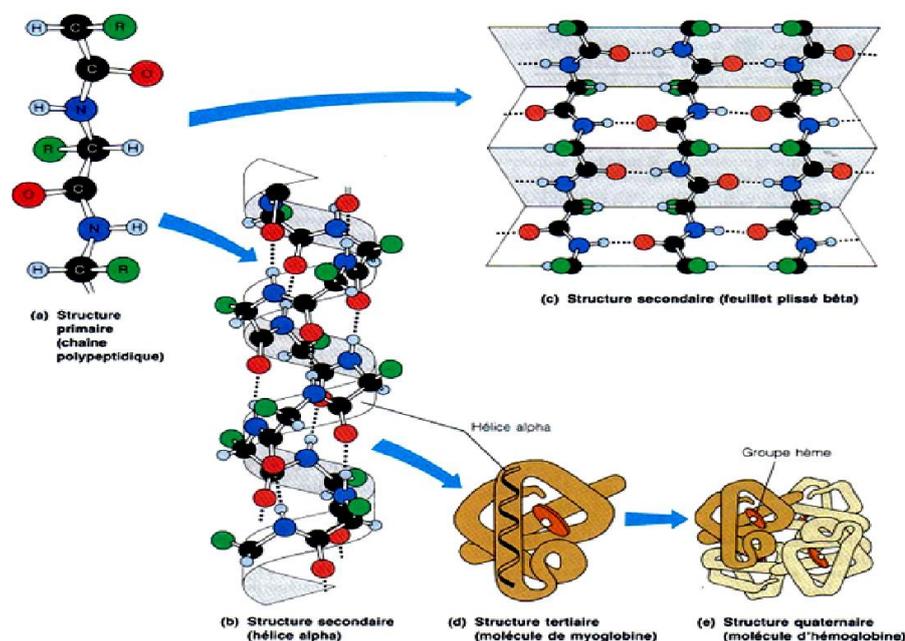
Ce chapitre comporte une étude sur les protéines en présentant leurs propriétés et leurs caractéristiques, ainsi que leurs structures qui jouent un rôle important dans la cellule et l'organisme. La seconde partie portera sur le phénomène d'adsorption et les paramètres influençant ce phénomène.

### II.1. Les protéines

Les protéines constituent le principal matériau de construction des êtres vivants. Elles jouent un rôle actif et vital dans le fonctionnement des cellules (enzymes, anticorps, antigènes, toxines ...). Toutes les protéines contiennent du carbone, de l'oxygène, de l'hydrogène et de l'azote. Plusieurs contiennent aussi du soufre et du phosphore [1,2].

#### II.1.1. Structure des protéines

Les protéines présentent différents niveaux d'organisation structurale au sein de l'organisme (figure II.1). Ces niveaux varient suivant le type de protéine (i.e. suivant la séquence en acides aminés de la protéine définissant sa fonctionnalité), le niveau de maturation d'une protéine, ou encore suivant le milieu dans lequel la protéine se trouve.



*Figure II.1. Niveaux d'organisation structurale des protéines*

On distingue, ainsi, quatre niveaux de structure :

- ✓ **La structure primaire** correspond à la séquence en acides aminés qui se lient pour former des protéines ou des polypeptides.

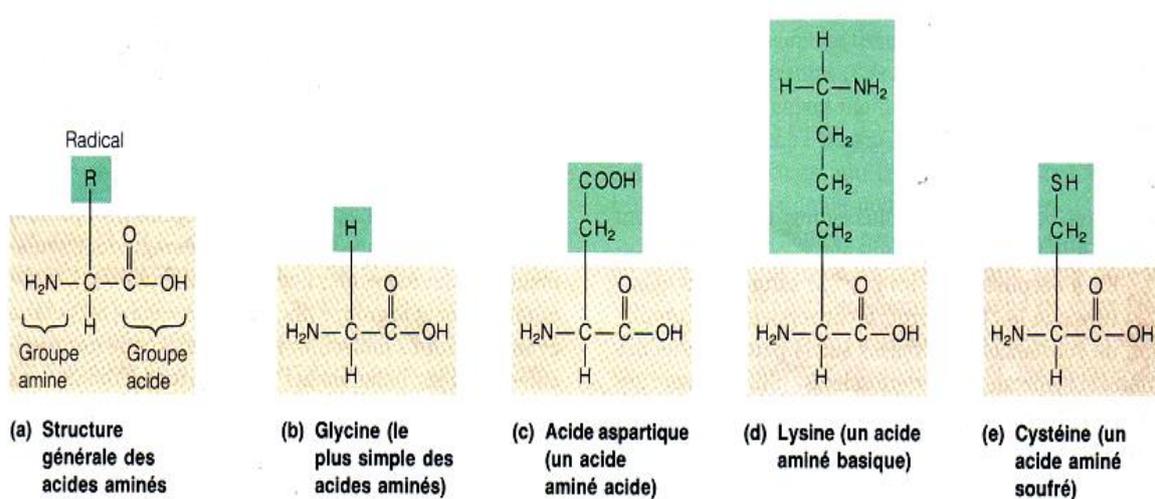
- ✓ **La structure secondaire** est relative au premier niveau de compaction des protéines ; deux structures sont observés les hélices  $\alpha$  et les feuillets  $\beta$ .
- ✓ **La structure tertiaire** correspond à la compaction des structures secondaires entres elles.
- ✓ **La structure quaternaire** est caractérisée par l'assemblage de plusieurs sous – unités protéiques (présentant chacune une structure tertiaire) entre elles. L'exemple se prêtant le mieux est l'hémoglobine [3].

## II.1.2. Acides aminés et liaison peptidique

### II.1.2.1. Les acides aminés

Les acides aminés sont des molécules qui rentrent dans la composition des protéines grâce à leur assemblage par des liaisons que l'on appelle peptidiques. Il existe vingt acides aminés importants, tous dotés de deux groupements fonctionnels : un groupe aminé ( $\text{—NH}_2$ ) et un groupe acide organique ( $\text{—COOH}$ ). Un acide aminé peut donc se comporter comme une base (accepteur de proton) ou comme un acide (donneur de proton).

Tous les acides aminés sont identiques sauf pour leur troisième groupe, appelé radical R. Chaque acide aminé doit son comportement chimique particulier ainsi que son acidité ou son alcalinité relative aux particularités de l'arrangement des atomes de son groupe R (figure II.2).

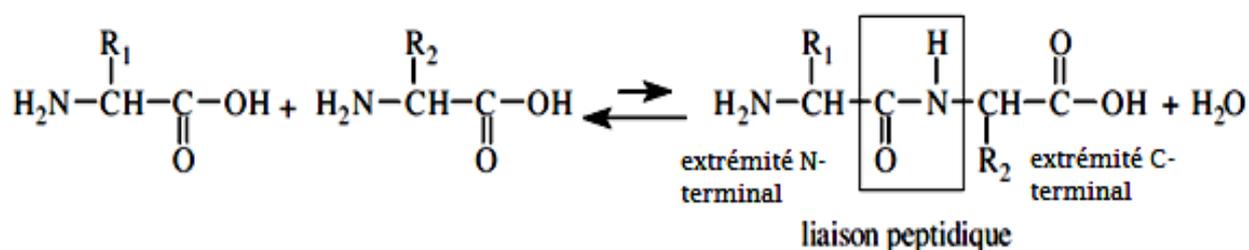


*Figure II.2. Structures des acides  $\alpha$  aminés*

Il est à noter que la présence des groupes (carboxyle, amine, sulfhydryle) dans le radical R indique que ces acides aminés sont présents dans les liaisons intramoléculaires protiques.

### II.1.2.2. La liaison peptidique

Une liaison peptidique est une liaison covalente qui s'établit entre la fonction carboxyle portée par le carbone  $\alpha$  d'un acide aminé et la fonction amine portée par le carbone  $\alpha$  de l'acide aminé suivant dans la chaîne peptidique. Cette liaison forme l'arrangement d'atomes caractéristiques de la liaison peptidique (figure II.3.). Cette synthèse s'accompagne de la perte d'une molécule d'eau. Les liaisons peptidiques se rompent lorsque de l'eau s'y ajoute (hydrolyse des polypeptides). Les molécules contenant plus de 50 acides aminés sont des protéines. La plupart des protéines sont cependant des macromolécules, c'est-à-dire de grosses molécules complexes formées de 100 à 1000 acides aminés.



*Figure II.3. Formation d'une liaison peptidique*

### II.1.3. Rôles physiologiques

La structure tridimensionnelle de la protéine lui confère ses propriétés distinctes et dicte sa fonction biologique. on distingue deux grandes catégories de protéines suivant leur forme générale protéines fibreuses et protéines globulaires.

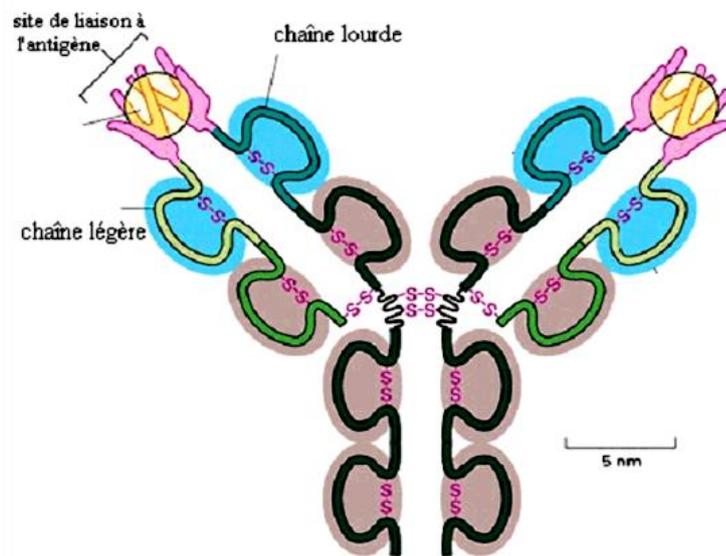
#### II.1.3.1. Protéines fibreuses

Les protéines fibreuses sont insolubles dans l'eau, allongées avec des chaînes polypeptidiques étendues le long d'un axe au lieu d'être enroulées en une forme globulaire. Elles ont un rôle structural ou de protection. Les principales protéines fibreuses sont le collagène, la kératine, le fibrinogène et les protéines musculaires.

#### II.1.3.2. Protéines globulaires

Contrairement aux protéines fibreuses, les protéines globulaires sont sphériques et hautement solubles. Elles jouent un rôle important dans le métabolisme. Les albumines, les globulines, la caséine et les hormones protéiques sont des protéines globulaires. Les albumines et les globulines sont abondantes dans les cellules animales, le sérum sanguin, le lait et les œufs.

Les principales fonctions des protéines globulaires chez l'homme sont : la catalyse, le transport, la régulation du pH, la régulation du métabolisme, et la défense de l'organisme (figure II.4.).



**Figure II.4.** Exemple d'une fonction des protéines : Immunoglobuline avec 2 sites de fixation de l'antigène

#### II.1.4. Dénaturation des protéines

La dénaturation est le changement de la forme tridimensionnelle de la protéine qui quitte l'état natif ; elle se "déroule ou se déplie" et perd peu à peu ses structures quaternaires, tertiaires et secondaires. Son activité est alors souvent atténuée voire annulée. La dénaturation est parfois réversible, le retour à l'état natif est alors possible et son activité est restaurée.

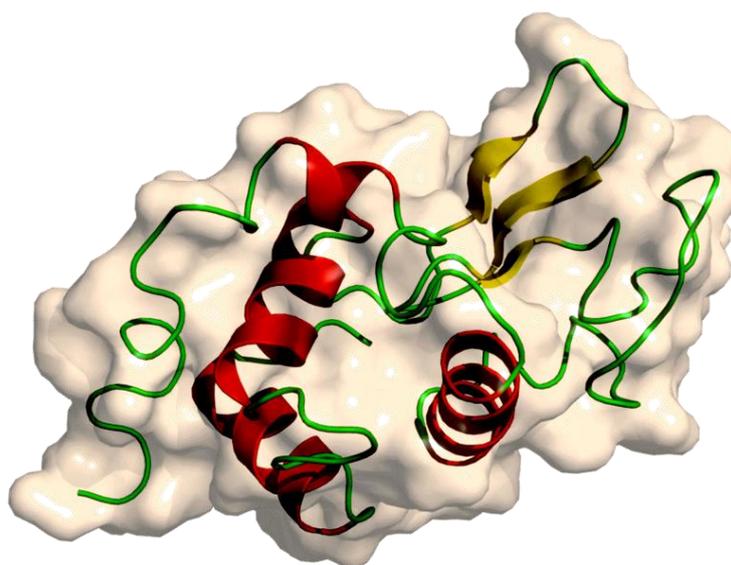
La dénaturation est due à la sensibilité des protéines en fonction de leur environnement physico-chimique. Elle se dénature lorsque les interactions entre résidus sont perturbées par un agent dénaturant physique (la température et le rayonnements UV), ou chimique comme le pH et les Solvants organiques miscibles à l'eau. La dénaturation est une propriété qui peut provoquer les modifications suivantes [4] :

- ✓ la perte des propriétés biologiques spécifiques : enzymatiques, hormonales, de transport et immunologiques ;
- ✓ la diminution de la solubilité résulte de modifications dans la distribution des groupements polaires et apolaires. Elle est accompagnée d'une augmentation de la sensibilité aux attaques enzymatiques (cuisson) ; les forces ioniques.

- ✓ Température : la température augmente la vibration et la rotation des molécules et augmente l'instabilité des liaisons faibles. Elle est réversible jusqu'à une certaine limite ;
- ✓ Rayonnements UV : ionisants, souvent irréversibles.

### II.1.5. Lysozyme

Le lysozyme (figure II.5.) est une protéine globulaire longue d'une centaine d'acides aminés (130 chez l'être humain) qui est impliquée dans la défense contre les infections bactériennes. Elle est présente chez de nombreuses espèces d'animaux (vertébrés, insectes, acariens<sup>2</sup> et certains mollusques). On le trouve en particulier dans un certain nombre de sécrétions (larmes, salive, lait maternel, mucus...) et dans le blanc d'œuf (129 acides aminés chez la poule).

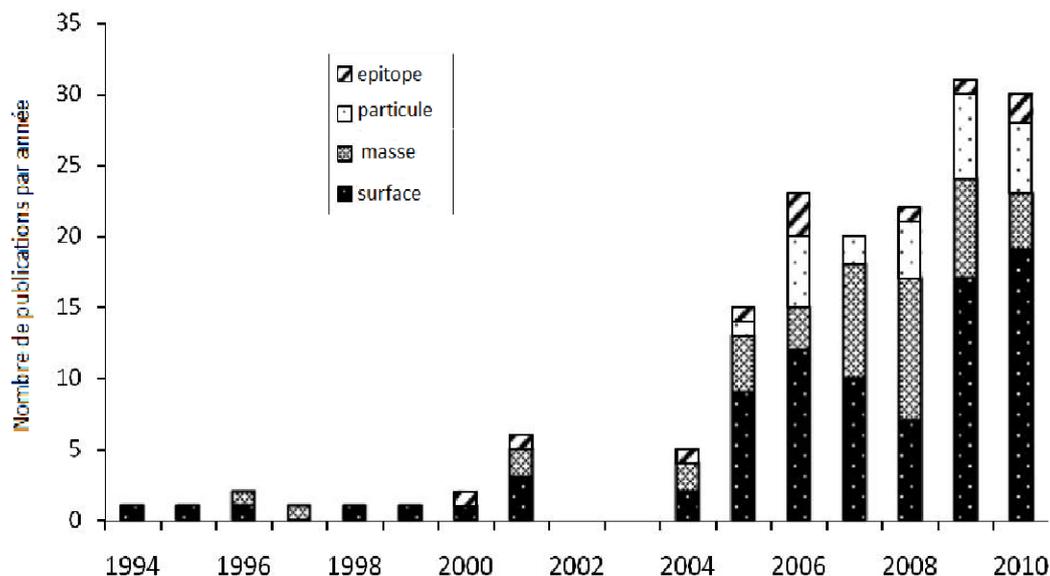


*Figure II.5. Structure tertiaire du lysozyme d'œuf de poule*

### II.1.6. L'impression des modèles macromoléculaires

Les polymères à empreinte moléculaire synthétisés en présence de modèles macromoléculaires, ont reçu un intérêt important pour la communauté scientifique au cours des dernières années, en particulier depuis 2005 [5]. La Figure II.6 montre que l'intérêt dans le domaine de l'impression macromoléculaire a considérablement augmenté depuis. Il est également clair que le champ a été dominé par l'empreinte de surface, avec environ 60% de tous les articles publiés décrivant cette approche.

En raison de leur importance, les protéines sont le modèle le plus étudié dans l'impression macromoléculaire.



*Figure II.6. Le nombre d'articles sur l'empreinte macromoléculaire publiés depuis 1994.*

### II.1.6.1. Comparaison des MIPs avec les éléments naturels

La comparaison des MIPs et des éléments de reconnaissance naturelle est présentée dans le tableau II.1. Il est à noter que les MIPs présentent de nombreux avantages par rapport aux anticorps en termes de stabilité globale, de facilité de synthèse et d'utilisation, ainsi qu'une intégration facile avec les transducteurs. Cependant, à ce stade, les MIP ne sont pas capables de répondre directement à l'affinité et à la sélectivité présentée par les éléments de reconnaissance naturelle, en particulier pour les applications actuelles où les anticorps sont utilisés sous leur forme soluble.

Néanmoins, les systèmes synthétiques présentant la capacité de reconnaître sélectivement des macromolécules spécifiques dans un milieu complexe seraient avantageux par rapport aux homologues naturels pour diverses applications. Dans le cadre du laboratoire, le faible coût, la réutilisabilité et la robustesse globale seraient utiles dans l'isolement, l'extraction ou la purification des protéines dans les dosages. Plus précisément, les techniques qui utilisent actuellement des anticorps liés à un support solide - immunoas -, chromatographie contre l'immunoaffinité et immunosensors - bénéficieraient des éléments solides de reconnaissance synthétique.

Les applications potentielles des MIPs macromoléculaires au-delà du laboratoire comprennent la bio sensibilité, l'élimination ou la neutralisation des bios macromolécules toxiques dans le corps ainsi que les thérapies ciblées.

**Tableau II.1.** Comparaison des MIPs et des éléments de reconnaissance naturelle.

	Éléments de reconnaissance naturelle	MIPs
Affinité	Haute affinité / spécificité	Varie (en particulier pour les modèles macromoléculaires)
Généralité	Un récepteur par analyte	Les MIPs peuvent être développés pour n'importe quel modèle
Robustesse	Stabilité limitée (chaque élément a son propre fonctionnement exigences)	Stable dans diverses conditions (pH, T, force ionique, solvants)
Coût	Synthèse coûteuse mais rentable	Peu coûteux
Stockage	Quelques jours à température ambiante	Stockage à long terme sans perte de performance (plusieurs mois à années)
Synthèse / préparation	Temps lent	Facile
Intégration des capteurs	Mauvaise compatibilité avec les surfaces des transducteurs	Entièrement compatible
Infrastructure requise	Des appareils d'analyse coûteux	Détection sans étiquette

### II.1.6.2. Impression des protéines

L'impression de la protéine a été largement étudiée par des différentes approches qui peuvent être classées par plusieurs catégories telles que l'impression en masse, en surface, en particules et en épitope. A partir de 2005 de plus en plus de travaux ont porté sur l'empreinte des protéines [5], plus de la moitié de l'empreinte de la protéine est basée sur la stratégie de l'empreinte de surface.

Le sérum-albumine bovine (BSA), le lysozyme (Lyz) et l'hémoglobine bovine (BHB) sont des modèles les plus utilisés. Acrylamide (AA), l'acide méthacrylique (MA), acide acrylique, l'acide aminophénylboronique (APBA) et de N-isopropylacrylamide (NIPAAm) représentent près de 60% de monomères utilisés pour l'impression de la protéine. Plus de 80% d'agents de réticulation sont le N, N'-méthylènebisacrylamide (MBAA) et le diméthacrylate d'éthylène glycol (EGDMA).

### II.1.6.3. L'impression en masse

Malgré les difficultés rencontrées lors de la préparation, L'impression en masse a été largement appliquée surtout avec la petite empreinte moléculaire et elle est considérée comme l'approche la plus simple dans la préparation des empreintes de protéines. Cependant

l'avantage de cette méthode est les sites de liaisons formés en (3D) pour la totalité de la protéine, ce qui est typique à la petite empreinte moléculaire.

Cette stratégie est limitée par la faible mobilité de la protéine, mais il est primordial que pour toute procédure d'impression la protéine peut librement être retirée de la matrice puis reliée aux sites imprimés. Pour surmonter ce problème, il est important d'augmenter la porosité et la taille des pores par l'impression en masse via la réduction du taux de réticulation, ceci conduit à un déclin de la propriété de la reconnaissance de la protéine.

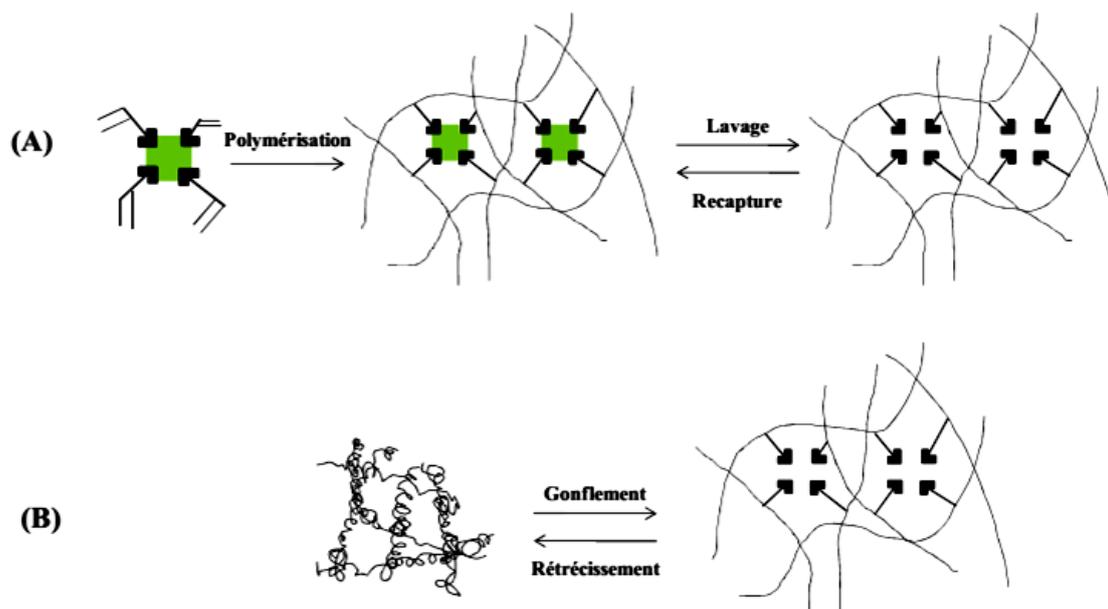
En tenant compte de la limitation de la diffusion, la solubilité et la flexibilité conformationnelle des protéines, la technologie de gel est l'approche typique pour l'impression de protéine en masse. Cette dernière est synthétisée dans une solution aqueuse en présence d'un faible taux de réticulant en vue d'améliorer la diffusion des protéines dans le réseau polymérique, toutefois la structure imprimée ne peut être maintenir pendant une longue période. En outre, dans le cas inverse (taux de réticulant élevé), l'extraction de la molécule modèle peut également affecter la structure du gel imprimé et par conséquent réduire la propriété de reconnaissance.

#### **II.1.6.3.1. Propriétés physiques et chimiques des hydrogels**

Depuis 1998, la recherche sur les mécanismes de synthèse et les applications des hydrogels s'est considérablement développée [6]. Les hydrogels sont des polymères hydrophiles capables d'adsorber une grande quantité d'eau. Ils sont très peu réticulés : la quantité molaire de réticulant est le plus souvent comprise entre 0.1 et 3 % de la quantité molaire de monomères, même si certaines études ont augmenté ce taux à 13 % [7].

Ces valeurs sont de loin plus faibles que celles des MIPs monolithiques où la quantité molaire de réticulant est cinq fois plus grande que celle des monomères. Par ailleurs, les hydrogels présentent une grande flexibilité au niveau de leurs chaînes de polymères et des groupes fonctionnels qui sont présents.

Ces propriétés de flexibilité et de capacité d'adsorption d'une grande quantité d'eau confèrent aux hydrogels une similitude avec les tissus naturels de l'organisme, qui peuvent eux aussi adsorber une quantité d'eau importante entraînant une modification de leurs propriétés. Le principe de la synthèse des hydrogels est schématisé à la figure II.7.



**Figure II.7.** Synthèse de mip sous forme d'hydrogel  
(A) synthèse d'hydrogels (B) Gonflement [6]

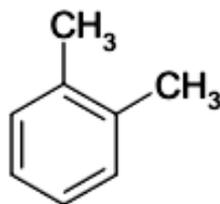
### II.1.6.3.2. Propriétés sélectives des hydrogels

Les molécules jusqu'ici imprimées par le biais d'hydrogels sont des modèles hydrophiles tels que des ions ou des molécules de faible poids moléculaire. On note, toutefois, des développements récents sur l'impression de protéines [8] et de fragments d'ADN par cette technique.

Lorsque des interactions non covalentes sont mises en jeu, les interactions entre le modèle et les monomères fonctionnels sont généralement ioniques pour permettre une forte recapture en milieu aqueux. Dans la mesure où les chaînes des hydrogels peuvent augmenter de volume selon les conditions utilisées (pH, température, force ionique...), le choix des conditions expérimentales permet ainsi de contrôler la recapture et la libération des molécules d'intérêt.

Par ailleurs, on pourrait penser que la flexibilité des chaînes des hydrogels augmenterait les possibilités d'associations au sein des cavités et conduirait alors à une perte drastique de la sélectivité comparée aux MIPs classiques très réticulés. Cependant, de nombreux travaux ont montré l'existence d'une sélectivité entre l'hydrogel imprimé et le non imprimé. Ce fut ainsi le cas lors de l'impression moléculaire du glucose où l'hydrogel montrait une sélectivité par rapport au non-imprimé mais aussi une capacité très élevée et une

reconnaissance plus importante du glucose par rapport au fructose [9]. De même, la présence de cavités spécifiques de reconnaissance au sein du MIP a été démontrée dans le cas de protéines comme l'hémoglobine, [10] d'analogues de polluants organiques tels que l'ortho xylène (o-xylène) [11] (figure II.8.).



**Figure II.8.** Structure de l'ortho xylène (o-xylène)

En conclusion, du fait de leur faible taux de réticulation, les hydrogels présentent un intérêt quant à l'impression de molécules polaires dans un solvant aqueux et à l'augmentation de l'accessibilité des sites de reconnaissance. Ils ont aussi l'avantage de pouvoir mimer des conditions biologiques notamment au niveau de leur propriété d'adsorption, d'où leur utilisation pour des composés bioactifs. Cependant, malgré l'obtention d'hydrogels sélectifs et retentis, leur application à des niveaux industriels reste pour l'instant limitée du fait d'un format peu approprié.

Aujourd'hui dans le même objectif de diminuer le taux de réticulation des MIPs, d'autres formats de MIP, associant la flexibilité des gels et la rigidité des polymères très réticulés sont développés : les cristaux liquides. En effet, les cristaux liquides imprimés sont synthétisés à partir de mésogènes, molécules contenant une partie rigide et une partie flexible. Cela conduit à des matériaux très peu réticulés (5 à 10 % molaire) et ayant par conséquent des capacités importantes, comme ce fut le cas pour la théophylline [12]. De plus, cette flexibilité n'altère pas les propriétés de reconnaissance des MIPs cristaux liquides puisque ceux-ci peuvent présenter des propriétés énantiosélectives grâce à l'affinité importante du modèle pour la matrice mésomorphe de cristaux liquides [13].

### II.1.6.3. Impression de surface

Dans l'impression de surface, les sites d'impression synthétisés sont situés au niveau de la surface du polymère. Par ailleurs, La synthèse d'un film mince de polymère est une simple stratégie pour la préparation de l'empreinte de surface en utilisant la même approche de l'impression en masse. L'orientation du modèle de protéine à la surface d'un substrat, en utilisant par la suite une polymérisation, est un procédé prometteur pour préparer l'empreinte

de surface. L'impression de surface permet un accès direct aux sites de liaison par la protéine, ce qui minimise les obstacles dus à la taille du modèle. En raison de la présence du support, la structure imprimée est physiquement plus robuste et facilement intégrable avec d'autres capteurs. Cependant, seule la partie de la surface de la protéine (point d'ancrage) est imprimée, une réduction de la spécificité ne peut pas être évitée [14].

#### II.1.6.4. Impression protéine-l'épitope

Dans la nature, les interactions anticorps-antigène dépendent de la reconnaissance entre l'anticorps et un site antigénique de la protéine de l'épitope. Celle-ci est une séquence d'acides aminés courte complémentaire au site de liaison d'anticorps. Dans le domaine de l'impression moléculaire, Rachkov et Minoura [15] ont appliqués cette stratégie pour développer l'empreinte d'épitope pour la reconnaissance de la protéine.

Au lieu de la protéine entière, une séquence peptidique courte, souvent exposée à la surface de la protéine, a été utilisée comme matrice pendant le processus d'impression. Une fois que la matrice a été polymérisée à la matière imprimée résultante doit être capable de reconnaître et de lier la protéine entière.

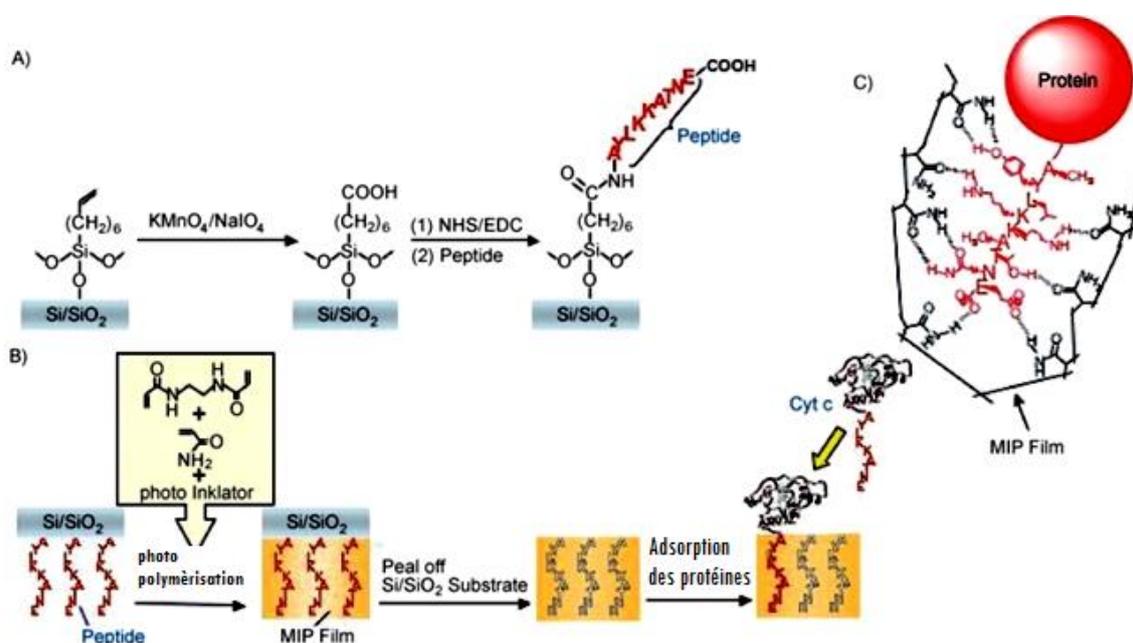


Figure II.9. Protocole de l'impression d'une épitope (protéine CyC) [16]

## II.2. Généralité sur l'adsorption

Les molécules, ions ou atomes formant la surface d'un solide sont soumis à des forces dissymétriques qui se traduisent par un champ de force attractif. Ce champ à une portée

limitée de l'ordre de  $1^{\circ}\text{A}$ , mais il est suffisant pour attirer les molécules de gaz ou de liquide situées au voisinage immédiat de l'interface. Ce sont ces forces qui provoquent la fixation des molécules à la surface. Ce phénomène est appelé adsorption.

### II.2.1. Définition

L'adsorption est le processus suivant lequel des molécules contenues dans un fluide (gaz ou liquide) appelées adsorbat se fixent à la surface d'un solide appelé adsorbant. Les sites où se fixent les molécules d'adsorbat sont appelés sites actifs. Selon les catégories des forces attractives, l'énergie et la nature des liaisons mises en jeu, on peut distinguer deux types d'adsorption : l'adsorption physique ou physisorption et l'adsorption chimique ou chimisorption [17].

### II.2.2. Types d'adsorption

Selon les forces intervenant entre les molécules de l'adsorbat et la surface d'adsorption, on distingue, en général, deux types d'adsorption.

*Tableau II.2. Comparaison entre l'adsorption physique et l'adsorption chimique [18]*

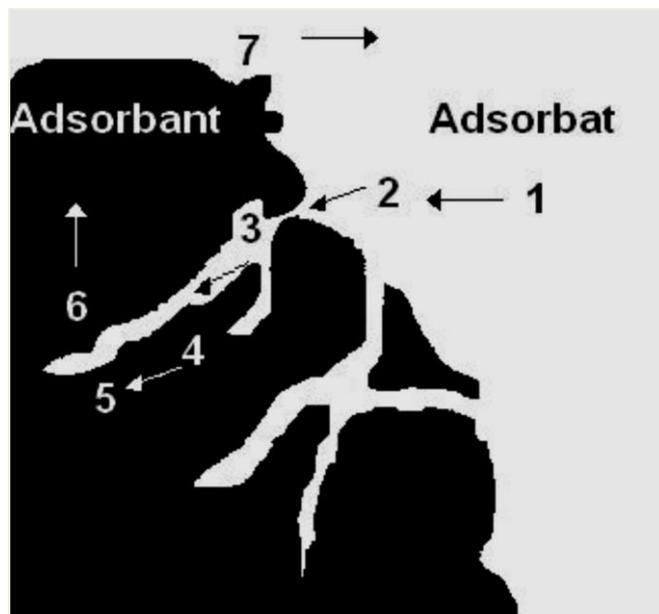
	<b>Adsorption chimique</b>	<b>Adsorption physique</b>
<b>Nature des interactions</b>	Liaisons fortes (grande affinité adsorbant/adsorbat)	Types de liaison)
Quantité adsorbée	Détermination par le nombre de sites de la surface (monocouche au maximum)	Possibilité de superposition de plusieurs couches d'atomes adsorbés
Caractère de la surface	Hétérogène : les sites ne sont pas équivalents de point de vue énergétique	Plus ou moins homogène
Caractéristique du Phénomène	Spécifique	Non spécifique
Chaleur d'adsorption	De 100 à 1000 Kj/mol	Environ 50 Kj/mol
Réversibilité du phénomène	Limitée	Très marquée
Mobilité des espèces Adsorbées	Limitée	Très grande
Influence de l'élévation de la température	Faible et parfois favorable suite à l'activation de la surface	Diminue avec l'augmentation de la température

### II.2.3. Mécanisme d'adsorption

L'adsorption est une interaction entre une molécule adsorbable (adsorbat) et la surface d'un solide (le catalyseur hétérogène). Elle est due à des phénomènes de diffusion et à des interactions entre la surface de l'adsorbant et les molécules adsorbables. Elle est donc favorisée sur des matériaux ayant d'importantes surfaces spécifiques. Les réactions

d'adsorption sont souvent exothermiques. De façon générale, le phénomène d'adsorption se décompose en plusieurs étapes [19] décrites sur la figure II.10.

1. Diffusion de la molécule d'adsorbat du fluide vers la couche limite ;
2. Transfert à travers la couche limite (diffusion externe) ;
3. Diffusion dans le volume poreux ;
4. Adsorption en surface ;
5. Diffusion de l'adsorbat en surface ;
6. Conduction thermique dans la particule d'adsorbant due au corrélation de la réaction ;
7. Conduction thermique dans la couche limite puis dans le fluide.



*Figure II.10. Étapes du processus d'adsorption sur un matériau poreux*

#### **II.2.4. Les modèles des isothermes d'adsorption**

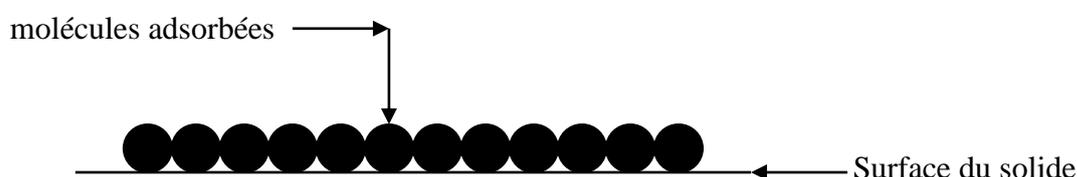
Il existe plusieurs équations mathématiques qui permettent de modéliser les isothermes d'adsorption. Elles représentent la quantité de soluté adsorbé par un adsorbant en fonction de la concentration à l'équilibre du soluté en solution à une température constante. Nous allons, décrire maintenant les équations d'isothermes utilisées dans ce travail.

##### **II.2.4.1. Modèle de Langmuir**

L'isotherme de Langmuir est proposée en 1918. Ce modèle est resté de nos jours, l'un des modèles formellement le plus simple pour décrire la physisorption et la

chimisorption. L'équation de Langmuir est une équation semi-empirique repose sur les hypothèses suivantes [20] :

- ✓ On admet que seule une couche mono moléculaire se forme sur le solide (figure II.11) ;
- ✓ L'adsorption s'effectue sur des sites bien définis uniformément distribués sur la surface du solide ;
- ✓ Chaque site ne peut fixer qu'une seule molécule ;
- ✓ Il n'y a aucune interaction entre deux particules adsorbées sur des sites voisins ;
- ✓ Tous les sites sont énergétiquement identiques.



*Figure II.11. Modèle de monocouche*

L'équation empirique donnée par Langmuir est représentée par la relation suivante :

$$\frac{X}{m} = \frac{Q_m \cdot b \cdot C_e}{(1 + b \cdot C_e)} \quad (\text{II.1})$$

$X/m$  : Quantité de soluté adsorbée par unité de masse de l'adsorbant (mg/g) ;

$Q_m$  : Capacité maximale d'adsorption (mg/g) ;

$C_e$  : Concentration du soluté dans la phase liquide à l'équilibre (mg/L) ;

$b$  : Constante d'équilibre caractéristique de l'adsorbant, elle indique également l'affinité de l'adsorbant pour l'adsorbant (L/mg).

Pour obtenir les paramètres d'équilibre du modèle de Langmuir ( $Q_m$  et  $b$ ), on peut exploiter la relation (II.1) sous la forme linéaire suivante :

$$\frac{1}{\left(\frac{X}{m}\right)} = \frac{1}{(Q_m \cdot b \cdot C_e)} + \frac{1}{Q_m} \quad (\text{II.2})$$

### II.2.4.2. Modèle de Freundlich

C'est une équation empirique largement utilisée pour la représentation pratique de l'équilibre d'adsorption. Elle se présente sous la forme [21] :

$$\frac{X}{m} = K_f C_e^n \quad (\text{II.3})$$

$X/m$  : Quantité de soluté adsorbée par unité de masse de l'adsorbant (mg/g) ;

$C_e$  : Concentration de l'adsorbât à l'équilibre d'adsorption ;

$K_f$  et  $n$  : Constantes de Freundlich caractéristiques de l'efficacité d'un adsorbant donné vis-à-vis d'un soluté donné.

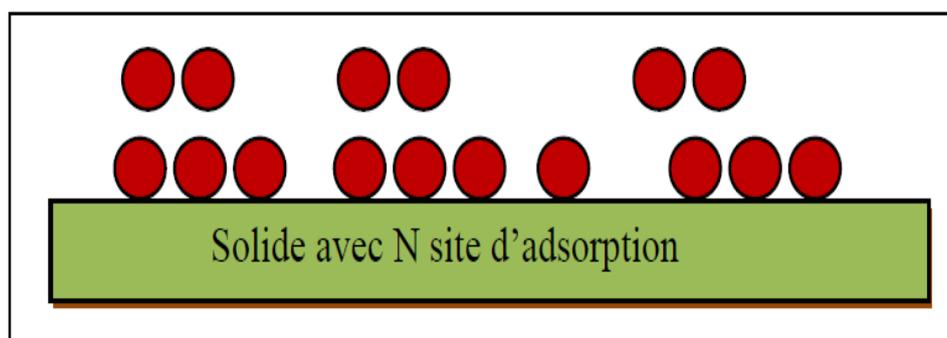
La transformée linéaire permettant de vérifier la validité de cette équation est obtenue par passage en échelle logarithmique :

$$\ln \frac{X}{m} = \ln K_f + n \ln C_e \quad (\text{II.4})$$

En traçant  $\ln X/m$  en fonction de  $\ln C_e$ , on obtient une droite de pente  $n$  et d'ordonnée à l'origine  $\ln K_f$ .

A ce modèle, l'adsorption est localisée sur des sites bien définis qui possèdent la même énergie, les molécules adsorbées n'ont pas d'interaction entre elles.

L'adsorption s'effectue dès le début en plusieurs couches, les molécules adsorbées dans la première couche servent de sites d'adsorption pour les molécules de la deuxième couche et ainsi de suite (Figure II.12).



**Figure II.12.** Modèle d'adsorption de multicouche

### II.2.4.3. Modèle de BET (Brunauer, Emmett, Teller)

Le modèle de Brunauer, Emmett et Teller est fondé sur les hypothèses suivantes :

- Il s'agit d'une adsorption physique donc régie par les forces de van der Waals ;
- Le nombre de couches adsorbées tend vers l'infini quand la pression d'équilibre tend vers la pression de vapeur saturante ;
- La première couche est adsorbée selon le modèle de Langmuir. Il s'agit donc de sites énergétiquement identiques et sans interactions latérales entre molécules adsorbées ;
- Les molécules adsorbées formant une couche donnée constituent des sites d'adsorption pour les molécules de la couche suivante ;
- L'énergie d'adsorption des couches au-delà de la première est supposée égale à l'énergie de liquéfaction du gaz.

À partir des relations exprimant les équilibres condensation-évaporation dans chacune des couches on obtient la relation BET :

$$\frac{P/P_0}{V(1 - P/P_0)} = \frac{C - 1}{V_m C} \cdot \frac{P}{P_0} + \frac{1}{V_m C} = A \cdot \frac{P}{P_0} + B \quad (\text{II.5})$$

V : Volume adsorbé à la pression d'équilibre P

V<sub>m</sub> : Volume adsorbé au complètement de la monocouche

P<sub>0</sub> : pression de vapeur saturante du gaz à la température de l'expérience

Le premier terme de l'équation est donc une fonction linéaire de P/P<sub>0</sub>. La détermination du volume adsorbé au complètement de la monocouche est déduite à partir de la droite correspondante appelée transformée BET. Cette courbe n'est dans la plupart des cas linéaire que dans un domaine de pressions relatives restreint ( $0.05 \leq P/P_0 \leq 0.35$ ).

La critique de cette théorie porte essentiellement sur deux points : les hypothèses de départ et le domaine d'application. En ce qui concerne la première couche adsorbée, les critiques sont celles émises pour la théorie de Langmuir. De plus, en ce qui concerne les couches supérieures, si on néglige les interactions latérales, il est difficile d'admettre la condensation de l'adsorbat sous forme liquide, ce qui impliquerait obligatoirement des interactions latérales.

D'autre part, si l'adsorption est confondue à la condensation, il n'y aurait pas de raison pour qu'elle se produise à  $P < P_0$ . Par ailleurs, la diminution de l'énergie d'adsorption avec la distance à la surface est négligée. Le deuxième type de critique concerne le recours à cette théorie pour la caractérisation des solides poreux. En effet, cette théorie suppose que l'adsorption ait lieu sur une surface plane, et la porosité modifie considérablement les conditions de formation de la couche adsorbée, qu'il s'agisse d'une augmentation du potentiel d'adsorption dans les pores de faibles dimensions ou de la condensation capillaire dans les mésopores.

La condensation capillaire n'influe pas considérablement sur la détermination de  $V_m$ , dans la mesure où elle se manifeste généralement à des pressions proches de  $P_0$  ( $P/P_0 \geq 0.4$ ) et donc en dehors du domaine de mesure de  $V_m$ . En revanche, le volume adsorbé au complètement de la monocouche peut être fortement surestimé à cause du remplissage des micropores qui se fait à très faible pression. Néanmoins, cette technique constitue une méthode universelle et incontournable pour la détermination des aires spécifiques. Plusieurs modèles ont été élaborés afin de remédier aux faiblesses de cette théorie en tenant compte notamment des interactions latérales et de la diminution des énergies des couches successives en fonction de la distance à la surface.

### II.2.5. Modélisation de la cinétique d'adsorption

La cinétique d'adsorption représente la variation de la quantité de soluté adsorbé par un adsorbant en fonction du temps de contact soluté/adsorbant. Cette étude a permis de contrôler la capacité d'adsorption et de déterminer le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre d'adsorption. Il existe plusieurs modèles cinétiques pour étudier le mécanisme d'adsorption, ceux que nous avons testés dans notre étude sont les suivants :

#### II.2.5.1. Modèle cinétique du pseudo premier ordre (Lagergreen)

En 1898 Lagergreen [22] a proposé un modèle cinétique dit de pseudo premier ordre où la vitesse d'adsorption est proportionnelle à  $(Q_e - Q_t)$  et est exprimé par la relation suivante :

$$\frac{dQ_t}{dt} = k_1 (Q_e - Q_t) \quad (\text{II.6})$$

Où :

$k_1$  : Constante de vitesse, en  $\text{min}^{-1}$

$t$  : Temps (min)

$Q_e$  et  $Q_t$  sont les quantités adsorbées, en mg / g, à  $t = 0$  et  $t$ , respectivement.

En intégrant de l'équation (II.6) entre les instants  $t=0$  et  $t$  on obtient la relation suivante :

$$\text{Ln} (Q_e - Q_t) = \text{Ln} Q_e - k_1 t \quad (\text{II.7})$$

La détermination de la constante cinétique et de la capacité d'adsorption à l'équilibre de saturation se fait en traçant  $\text{Ln} (Q_e - Q_t) = f(t)$

### II.2.5.2. Modèle cinétique de pseudo second ordre

La vitesse de réaction de pseudo-second-ordre dépend de la quantité adsorbée sur la surface de l'adsorbant et de la quantité adsorbée à l'équilibre. Ce modèle de pseudo second ordre permet de caractériser les cinétiques d'adsorption en prenant en compte le cas d'une fixation rapide de solutés sur les sites les plus réactifs et celui d'une fixation lente sur les sites d'énergie faible [23]. L'équation de pseudo second ordre est la suivante :

$$\frac{dQ_t}{dt} = k_2 (Q_e - Q_t)^2 \quad (\text{II.8})$$

Où :  $k_2$  est la constante de vitesse, en  $\text{g.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$

L'intégration et la linéarisation de l'équation donne:

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 Q_e^2} + \frac{1}{Q_e} \cdot t \quad (\text{II.9})$$

La détermination de la constante cinétique et de la capacité d'adsorption à l'équilibre de saturation se fait en traçant  $t/Q_t = f(t)$ .

### II.2.5.3. Modèle de diffusion intra-particulaire

Le modèle de diffusion intra-particulaire est proposé par Weber et Morris [24,25]. Ils établissent expérimentalement que lorsque l'adsorption est contrôlée par la diffusion intraparticulaire, la fraction de soluté adsorbée varie proportionnellement avec la racine carrée du temps ( $t^{1/2}$ ) durant l'étape initiale de la cinétique d'adsorption, pendant laquelle la quantité adsorbée reste inférieure à 20 % de la capacité maximale. L'équation de diffusion intra-particulaire est sous la forme suivante :

$$Q_t = k_d \cdot t^{1/2} + C_{WM} \quad (\text{II.10})$$

Où :

$k_d$  est la constante de vitesse de diffusion intraparticulaire, en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1/2}$  ;

$C_{WM}$  est la constante de Weber-Morris, en  $\text{mg/g}$ . (ordonnée à l'origine, qui renseigne sur l'épaisseur de la couche limite. Une forte valeur de  $C_{WM}$  correspond à une couche limite épaisse).

## Bibliographie du chapitre II

- [1] Branden, C.; Tooze, J. Introduction to protein structure, second edition, Garland Publishing, New York, 1999.
- [2] Yu, C. ; Xu, M. ; Svec, F. ; Fréchet, J.M.J. J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. 2002, 40, 755.
- [3] Anderson, N.L.; Anderson, N.G. Mol. Cell. Proteomics 2002, 1, 845.
- [4] Grossin, N. ; Wautier, J.L. J. Soc. Biol. 2007, 201 (2), 175.
- [5] Yongqin, Lv. ; Tianwei, T.; Frantisek, S. Biotechnology Advances 2013, 31, 1172
- [6] Byrne, M. E.; Salian, V. Int. J. Pharm. 2008, 364 (2), 188.
- [7] Henry, N. Conception de polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction de principes actifs de produits naturels. Thèse de doctorat de l'Université d'Orléans, Orléans, 2012.
- [8] Cutivet, A.; Schembri, C.; Kovensky, J.; Haupt, K. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131 (41), 14699.
- [9] Parmpi, P.; Kofinas, P. Biomaterials 2004, 25 (10), 1969.
- [10] Xia, YQ.; Guo, TY.; Song, MD.; Zhang, BH.; Zhang, BL. Biomacromolecules 2005, 6 (5), 2601.
- [11] Espinosa-García, BM.; Argüelles-Monal, WM.; Hernández, J.; Félix-Valenzuela, L.; Acosta, N.; Goycoolea, FM. Biomacromolecules 2007, 8(11), 3355.
- [12] Marty, J. D.; Mauzac, M.; Lavabre, D. Mol. Cryst. Liq. Cryst. 2005, 437 (1), 63.
- [13] Marty, J. D.; Gornitzka, H.; Mauzac, M., Eur. Phys. J. E 2005, 17 (4), 515.
- [14] Kryscio, D. R.; Peppas, N. A. Acta Biomater 2012, 8, 461.
- [15] Rachkov, A.; Minoura, N. J. Chromatogr A 2000, 889, 111.
- [16] Nishino, H.; Huang, C.S.; Shea, K. J. Angew. Chem. Int. Ed 2006, 45, 2392.
- [17] Chitour, C.E. ; Physico-chimie des surfaces. Les interfaces gaz-solide et liquide-solide, Edition OPU, Alger, 462 (1992).
- [18] Edeline, F. L'épuration physico-chimique des eaux, Edition Cebedoc sprl, Liège (1992).
- [19] Robel, L. Opération unitaire (adsorption), Technique d'ingénieur, J2.J2730 (1989).
- [20] Cheung, W.H. ; Szeto, Y.S. ; McKay, G. Bioresour. Technol. 2007, 98, 2897–2904.
- [21] Chatterjee, S.; Chatterjee, S.; Chatterjee, B.P.; Guha, A.K. Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. 2007, Asp.299, 146–152.

- [22] Meçabih, Z. ; Kacimi, S. ; Bouchikhi, B. *Revue des Sciences de l'Eau*. 2006, 19, 23-31.
- [23] Langmuir, I. *J. Am. Chem. Soc.* 1917, 40, 1361.
- [24] Brinker, J.C. *J. Non-Cryst. Solids* 1988, 100, 31.
- [25] Jacoby, J. ; Pasc, A. ; Carteret, C.; Dupire, F.; Stébé, M.J.; Coupard, V. ; Blin, J.L. *Process Biochem*, 2013, 48, 831.

***CHAPITRE III***  
***PRÉPARATION DES MIPs ET***  
***TECHNIQUES DE***  
***CARACTÉRISATION***

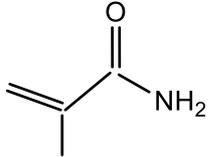
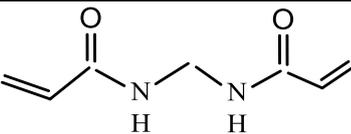
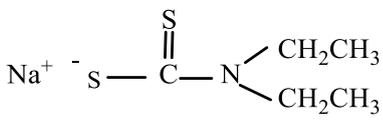
Les techniques séparatives basées sur la reconnaissance moléculaire ont reçu beaucoup d'attention dans la chimie et la biologie en raison de leur grande sélectivité pour les molécules cibles. Dans ce domaine les polymères à empreintes moléculaires (MIPs) ont connu ces dernières années un essor considérable, notamment quand ils sont fabriqués sous forme de film mince.

L'objectif de cette étude est de préparer des couches minces de polymère à empreinte de lysozyme sur des supports granuleux de polymère polychlorure de vinyle PVC. Qui est réalisée de façon générale en trois étapes : greffage de l'amorceur iniferter à la surface du PVC, la polymérisation et l'extraction de la molécule empreinte.

### III.1. Réactifs utilisés

Les réactifs utilisés dans ce travail sont : L'acrylamide (AA) qui a été choisi comme monomère fonctionnel, le N, N, méthylène bis-acrylamide (MBAA) comme agent réticulant et lysozyme (lys, Mw 14.6 kDa, pI11.2) comme molécule empreinte (ME) (sont tous fournis par sigma).Leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau III.1.

*Tableau III.1. Produits utilisés pour la préparation des MIPs*

produit et rôle	Formule	Masse (g/mole)
Acrylamide(99%) (Monomère fonctionnel)		71.08
N,N-méthylènebisacrylamid(99%) (Agent réticulant)		154.17
Diéthylcarbomodithioate de sodium (Photo initiateur (iniferter))		171.25
Lysozyme (Molécule empreinte)	Nombre de résidus 148 acides aminés	14600

### III.2. PVC utilisé comme support

Le PVC est l'un des polymères commerciaux les plus importants en raison de ses faibles coûts de production et son excellente stabilité aux acides et bases.

Le PVC utilisé comme support dans notre travail est une poudre commercial obtenue de l'Entreprise Nationale de Pétrochimie ENIP (Skikda Algérie, de type 4000M, Kwert=65-

66), et son poids moléculaire moyen a été déterminé par chromatographie sur gel perméable (GPC):  $M_w = 149000$  g/mol et  $M_n = 71700$  g/mol. Les particules ont une forme globulaire irrégulière affichée dans la figure III.1. Les billes ont été lavées avec de l'éthanol absolu et séchées pendant 24 h.



*Figure III.1. PVC utilisé comme support*

### **III.3. Préparation du polymère à empreinte de lysozyme sur des supports granuleux de PVC**

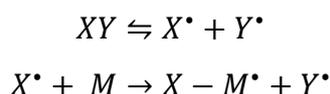
La méthode utilisée dans cette préparation est la méthode «grafting from» où la polymérisation est amorcée à la surface du support utilisé (PVC) à partir d'un amorceur précédemment fixé (iniferter).

Cette méthode, aussi appelée polymérisation initiée à la surface ou Surface-Initiated polymerisation (SIP), conduit, le plus souvent, à la formation de brosses de polymère, c'est-à-dire des chaînes de polymère linéaires densément greffées au substrat par une des extrémités de chaîne. L'avantage de cette méthode réside dans le fait que n'importe quelle technique de polymérisation en chaîne peut être adaptée à la SIP.

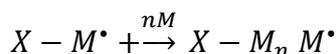
### III.3.1. Fixation de l'amorceur iniferter (DEDTC) à la surface des billes de PVC

Comme nous l'avons montré dans la partie théorique, les iniferters sont des composés capables d'amorcer la polymérisation comme initiateurs, et donner lieu à des réactions de transfert et de terminaisons réversibles, comme le montre le mécanisme suivant :

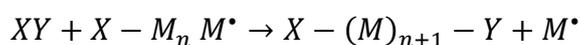
#### Amorçage



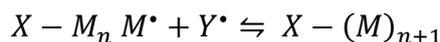
#### Propagation



#### Transfert



#### Terminaison



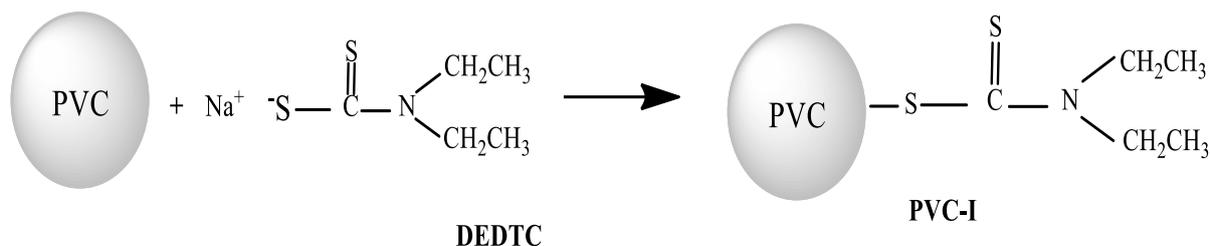
### III.3.2. Avantage de l'utilisation de l'amorceur iniferter

Le polymère formé en solution lors de l'utilisation d'une surface initiée par la méthode traditionnelle de polymérisation radicalaire est difficile à éviter. Ce polymère supplémentaire qui se produit conduirait à des sites de reconnaissance hétérogènes.

La solution à ce problème est d'utiliser l'initiation avec un amorceur iniferter (initiator-transfer-termination) ou (transfert initiateur agent de terminaison). Ce dernier est un type d'initiateur de polymérisation radicalaire vivante initiée à partir d'une surface (SIP), qui doit être fixé à la surface du support avant qu'il ne soit activé.

### III.3.3. Méthode de greffage

Afin de confiner la polymérisation sur la surface des grains de PVC, nous avons fixé l'amorceur iniferter (diéthylthiocarbamate de sodium, DEDTC) sur la surface des billes de PVC, comme le montre la figure III.2.



**Figure III.2.** Fixation de l'amorceur iniferters sur la surface du PVC

### III.3.4. Protocole de préparation

Les particules macroiniferters, diethyldithiocarbamyl poly (chlorure de vinyle), PVC-DEDTC ont été préparées par la réaction à la surface des groupes C-Cl avec N, N-diéthylthiocarbamate de sodium.

Dans un tricol de 250 mL muni d'un réfrigérant, d'un agitateur et d'un régulateur de température, on introduit 3 g de PVC, 120 ml d'éthanol et 0,5 g (environ 2,22 mmol) de diethyldithiocarbamate de sodium figure III.3.

La réaction est soumise sous agitation pendant 6 heures à 60°C. Après avoir refroidi le mélange réactionnel à température ambiante, les particules de polymère ont été filtrées et lavées avec de l'eau et l'éthanol pour éliminer le reste du sel de sodium. Enfin, les macroiniferters ont été séchés sous vide à 40°C.

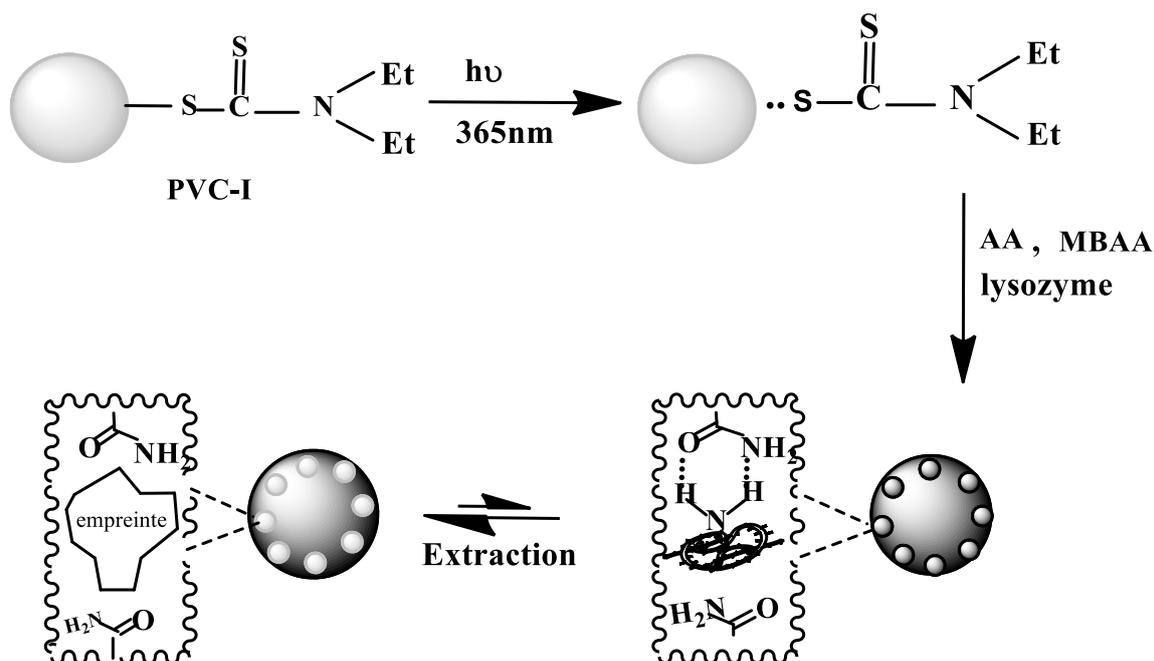


**Figure III.3** Montage de réaction de fixation de l'amorceur à la surface du PVC

### III.4. Préparation de polymère à empreinte de lysozyme sur des billes de PVC

Les particules de PVC-Initiateur (PVC-I), préalablement préparé, ont été mises en contact avec l'acrylamide, le N, N, méthylène Bisacrylamide et la molécule empreinte (lysozyme) pour préparer une couche de polymère à empreinte moléculaire.

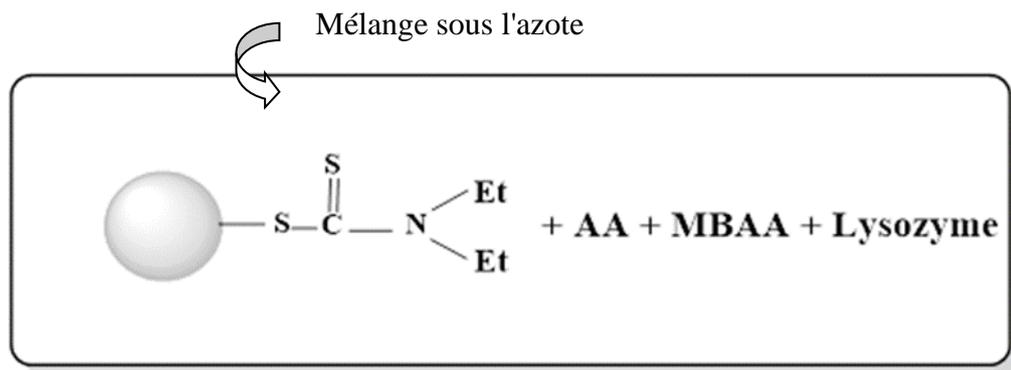
La stratégie générale de la procédure de préparation des couches de polymère à empreinte de lysozyme sur des billes de PVC est représentée sur la figure III.4.



**Figure III.4.** La stratégie générale de la préparation des couches de polymère à empreinte de lysozyme

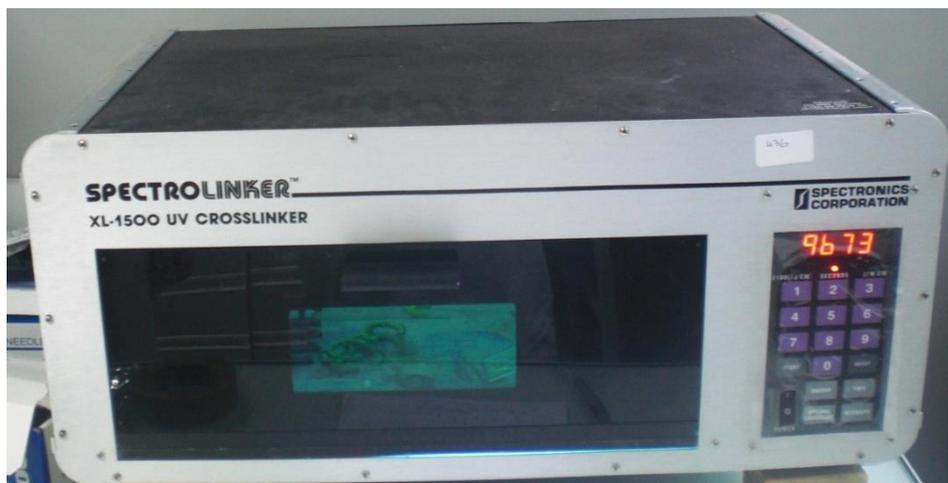
#### III.4.1. Méthode de synthèse du MIPs

1,5 g des billes modifiées (PVC-I) ont été mis en suspension dans le mélange de pré-polymérisation contenant 45 mg lysozyme, 1,4 g acrylamide (AA) et 0,17 g N,N, méthylène bis-acrylamide (MBAA). Le mélange a été dissout dans 30 mL d'un tampon phosphate salin (PBS) de PH égale à 7.4 puis purgé à l'azote et scellé. (figure III.5.a).



*Figure III.5.a. Mélange réactionnel pour la préparation du MIP.*

Le mélange réactionnel de polymérisation a été amorcé par un rayonnement ultraviolet dans un réacteur type Spectrolinker XL 1500 UV (Spectronics Corp.), (figure III.5.b). Ce réacteur UV est équipé de six tubes (15 W), ayant une longueur d'onde 365 nm et une densité de puissance de 5 mW/cm<sup>2</sup>.



*Figure III.5.b. Réacteur utilisé pour la réaction photo polymérisation*

La réaction de photopolymérisation est mise sous agitation pendant 12 heures. A la fin de la réaction, les couches de polymère à empreinte de lysozyme formées sur les billes de PVC ont été soigneusement lavées avec l'eau distillée pour éliminer les monomères non transformés.

De la même manière que pour les particules PVC-MIP, les couches polymères non imprimées (PVC-NIP) ont été préparées mais en l'absence de lysozyme de la matrice.

Sous irradiation ultraviolette (figure III.6), l'inifertère se dissocie en radicaux actifs et non actifs où le radical actif lié à la surface du support initie la polymérisation radicalaire tandis que le radical non actif en solution réagit avec d'autres radicaux pour former une "espèce dormantes" de croissance.

#### **III.4.2. Extraction de la molécule cible (lysozyme)**

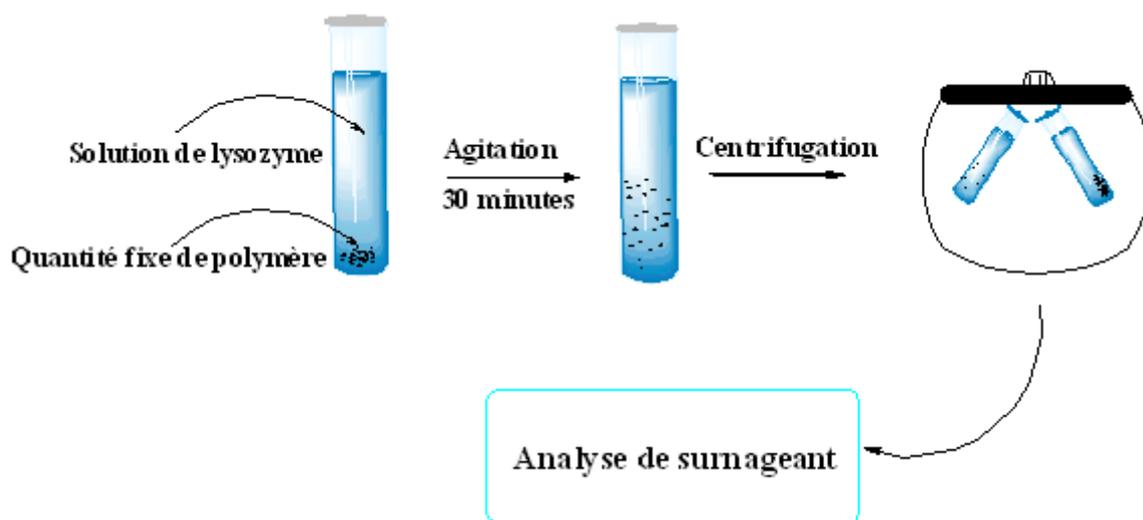
Après l'élaboration de la couche de MIPs sur les particules de PVC, le matériau subit plusieurs lavages pour extraire la molécule cible. Cette étape va nous permettre de déterminer le nombre de lavage appropriés pour réaliser le maximum de l'extraction de la molécule empreinte utilisée.

Le solvant utilisé dans ce lavage est constitué d'une solution d'acide acétique à 10 % (V/V) et d'une solution de dodécylsulfate de Sodium (SDS) à 10 % (m/V). Au cours des lavages, le matériau est agité dans des flacons remplis par la solution préalablement préparée pendant 2 heures. Enfin, la solution de lavage est ensuite analysée par spectrophotométrie UV-visible et cette opération est répétée en changeant la solution de lavage toutes les 2 heures.

#### **III.5. Tests d'adsorption de lysozyme**

La caractérisation des MIPs consiste à mettre en évidence la formation des empreintes et à évaluer l'affinité pour la molécule empreinte. La méthode d'évaluation par les tests d'adsorption est la plus utilisée pour apprécier l'affinité des MIPs à la molécule empreinte. La même étude se fait avec un polymère non imprimé (NIP) c'est-à-dire ne contenant pas de molécule empreinte.

Pour effectuer ces tests d'adsorption des solutions de concentrations variables de lysozyme sont mises en contact avec une quantité fixe de MIP sec à pH égale à 7,4. Les mélanges ont été agités pendant 30 minutes (temps d'équilibre) puis les particules ont été séparées par centrifugation (figure III.6). Enfin, la quantité de protéine dans le surnageant est ensuite déterminée par UV.



*Figure III.6. Méthode d'Adsorption de lysozyme*

### III.6. Méthode de dosage de lysozyme

Avant toute procédure de dosage, le lysozyme qui se trouve sous forme de particule solide, est dissoute dans une solution tampon de phosphate qui sert à maintenir le pH des solutions constant à 7,4. La méthode utilisée pour doser la concentration de lysozyme est la colorimétrie en moyennant le réactif de Bradford comme colorant [1].

Tout d'abord, on procède à la détermination de la courbe d'étalonnage qui consiste à préparer plusieurs solutions filles de la protéine à différentes concentrations connues. Pour tester l'affinité de cette protéine vis à vis des MIP préparés, une solution de lysozyme à différentes concentration est mise en contact avec une quantité fixe de MIP pendant 30 minutes.

La quantité de protéine dans le surnageant est déterminée en utilisant le réactif de Bradford et en employant un spectrophotomètre type Cary 500, thermostaté, réglée à 25°C. La lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde égale à 595 nm.

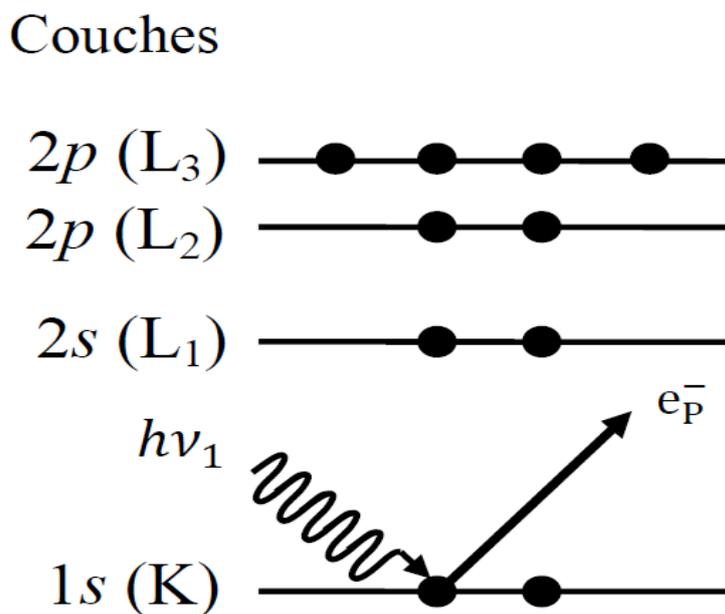
### III.7. Techniques de caractérisation

#### III.7.1. Spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

Les changements dans la composition élémentaire des surfaces ont été analysés par spectroscopie à photoélectrons induites par rayons X (XPS).

L'XPS est une technique d'analyse de surface qui permet de déterminer la composition chimique du matériau étudié. Cette technique donne également des informations sur l'état d'oxydation de certains éléments et sur la nature des liaisons. Elle nous permet également de suivre les modifications chimiques de surface induites par l'irradiation.

L'échantillon est placé dans une chambre d'analyse contenant la source de rayonnement X et un analyseur. L'enceinte est maintenue sous ultravide ( $10^{-7} - 10^{-8}$  Pa) de façon à s'assurer que l'analyse ne concerne que la surface et non l'atmosphère environnante adsorbée. L'échantillon est bombardé par les rayons X. Il en résulte l'émission d'un photoélectron appartenant à la première couche électronique des atomes (couche 1s) (Figure.III.7).



**Figure III.7.** Représentation schématique de l'émission d'un photoélectron X [2]

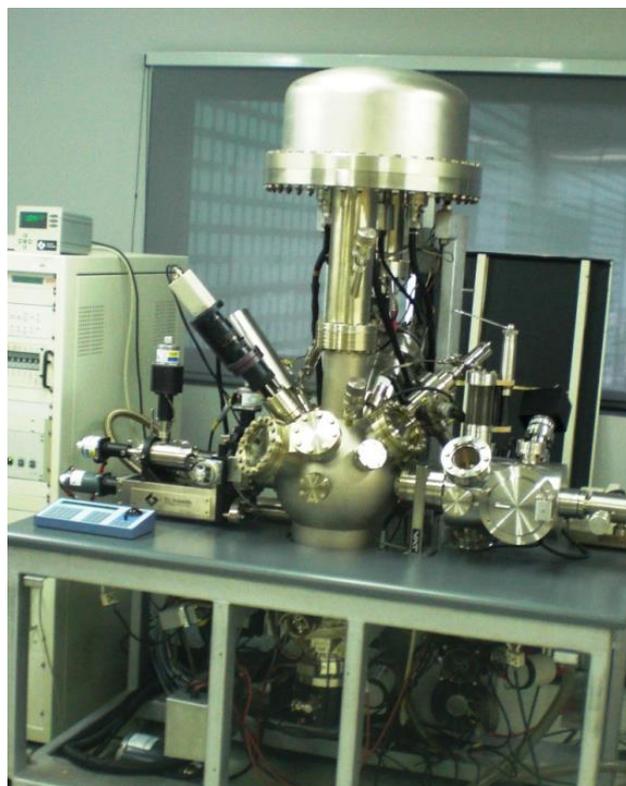
L'ensemble de ces électrons est collecté par un analyseur et traité en fonction de son énergie cinétique ( $E_c$ ). L'énergie cinétique ( $E_c$ ) des photoélectrons est liée à leur énergie de liaison ( $E_L$ ) par la relation d'Einstein :

$$E_L = h\nu - E_C - \Phi \quad (\text{III.1})$$

Où  $h\nu$  est l'énergie d'un photon du rayon X et  $\Phi$  la fonction de travail liée à l'appareillage.

L'énergie de liaison permet l'identification de l'ensemble des éléments à l'exception de l'hydrogène. L'intensité des pics permet de calculer la concentration relative des atomes dans l'échantillon sur la profondeur analysée, moyennant l'application d'un facteur de sensibilité [2].

Les spectres ont été enregistrés sur un Thermo VG Scientific ESCALAB 250 (figure III.8) en utilisant une source monochromatique Al ka X-ray ( $h\nu = 1486,6$  eV, taille du faisceau = 400 microns). Les échantillons ont été pressés sur des porte-échantillons à l'aide de bandes adhésives double face et dégazé dans le 'sas' d'entrée rapide pendant au moins 1 heures et plus ou moins  $5.10^{-7}$  mbar.



*Figure III.8. Spectroscopie à Photoélectrons X (XPS)*

L'avantage du logiciel, version 4.67, est utilisé pour l'acquisition numérique et le traitement des données. Les spectres ont été étalonnés contre le carbone 1s, C1s, pic principal du composant C-C/C-H établi à 285 eV. La composition de surface a été déterminée en considérant, pour chaque élément (excepté H), la zone de pic respective et les facteurs de sensibilité Scofield corrigés pour l'analyseur de transmission.

Les analyses XPS ont été effectuées au sein du Laboratoire ITODYS, UMR CNRS 7086, Université Paris Diderot ; France

### III.7.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

La spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) est une technique couramment utilisée pour la caractérisation des polymères. Dans ce travail, nous avons utilisé un spectrophotomètre infrarouge type Nicolet Magna-IR 860 dont la gamme est comprise entre 500 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  dans un mode de transmission avec une technique de KBr [3,4].

### III.7.3. Spectrophotomètre Raman

La spectroscopie Raman est utilisable quel que soit l'état physique du matériau : solide amorphe ou cristallisé, liquide ou gazeux. L'étude peut être faite à l'échelle microscopique. L'information obtenue est principalement qualitative. Les groupements des molécules donnent des vibrations caractéristiques en Raman dans des zones étroites et clairement identifiables. À l'instar de l'infrarouge, il existe des tables de corrélation rassemblant les groupements fonctionnels et les fréquences caractéristiques correspondantes.

Dans notre travail, le spectre Raman est obtenu à température ambiante en utilisant un spectromètre de type Lab Ram-HR Horiba Jobin-Yvon Raman, équipé d'azote liquide refroidi et un détecteur CCD. La longueur d'onde du laser est la ligne d'un laser  $\text{Ar}^+$  d'émission à 532 nm. L'irradiation laser a été maintenue à faible intensité pour éviter tout effet de chauffage.

La figure III.9, illustre un schéma descriptif représentant les différents composants d'un spectromètre Raman

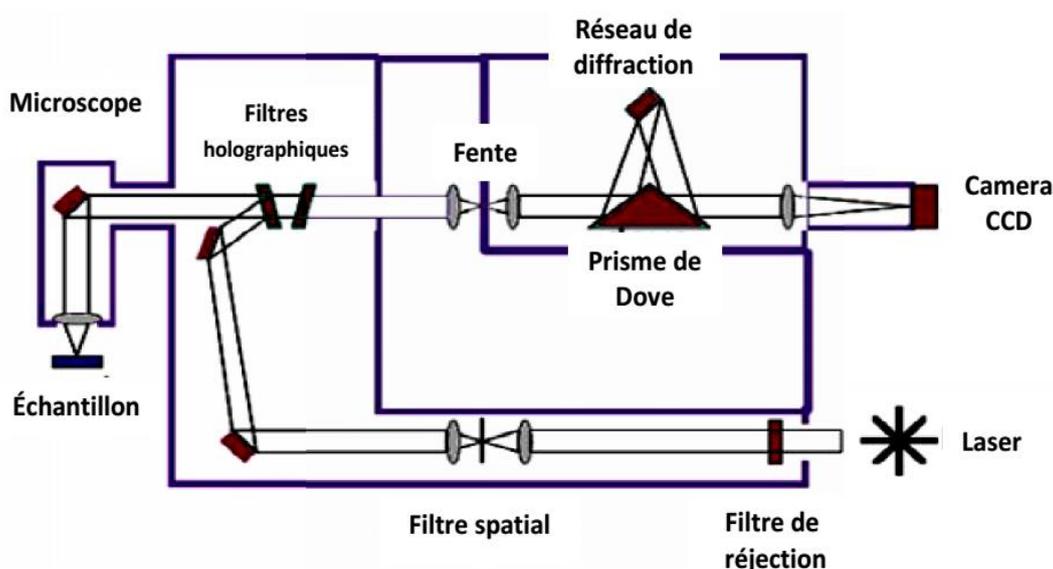


Figure III.9. Schéma représentatif d'un Spectromètre Raman [5]

#### III.7.4. Microscope électronique à balayage (MEB)

Le microscope électronique à balayage permet d'obtenir pratiquement des images de surfaces de tous les matériaux solides, à des échelles allant de la loupe (x10) à celles du microscope électronique en transmission (x500.000 ou plus). Le MEB conventionnel fonctionne dans un vide ordinaire ( $10^{-5}$  à  $10^{-6}$  mbar); les échantillons peuvent être massifs, de dimension allant de quelques microns (particules) à une dizaine de centimètres de diamètre, voire plus (prélèvements industriels). Ils doivent supporter le vide sans le polluer et être conducteurs [6].

Dans le présent travail nous avons utilisé un microscope électronique à balayage MEB de type Jeol à canon thermoélectronique, équipé d'un spectromètre EDX (microanalyse élémentaire).

#### III.7.5. Détermination de la surface spécifique

La surface spécifique des polymères PVC -MIP et PVC-NIP ont été évalués par des isothermes d'adsorption d'azote auxquelles le modèle mathématique BET a été appliqué (expériences réalisées au Laboratoire de Céramiques, Université Mentouri Constantine1),

Les surfaces spécifiques ont été mesurées à l'aide d'un appareil ASAP 2020 analyseur d'adsorption volumétrique (Micrometrics). La mesure est liée à l'adsorption d'azote à sa température de liquéfaction ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) par le polymère. Une masse de 200 à 300 mg de produit est introduite dans la cellule BET puis l'échantillon est dégazé pendant 30 minutes (sous balayage à l'azote à une température de  $90^{\circ}\text{C}$ ) et pesé à nouveau pour déterminer la masse perdue lors du dégazage.

Après le dégazage, la mesure se déroule en deux étapes : l'adsorption et la désorption au cours desquelles la variation de la conductivité thermique d'un mélange gazeux constitué de 30% d'azote (gaz adsorbé) et de 70% d'hélium (gaz vecteur) est mesurée.

L'adsorption se déroule à la température de l'azote liquide ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Cette température permet à l'azote d'être physisorbé. Lorsque cette étape est terminée, l'échantillon est ramené à température ambiante ce qui induit une désorption de l'azote. L'azote désorbé est quantifié par un catharomètre ce qui permet de calculer la valeur de l'aire spécifique en  $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ . La détermination de la surface spécifique par la méthode BET a été réalisée pour les deux polymères MIP et NIP.

### **Bibliographie du chapitre III**

- [1] Bradford, M. M. A. Anal. Biochem. 197672:248
- [2] Glaris,P. Ingénierie de surface de matériaux composites pour l'aéronautique, Chimie et topographie de surface, une aide au démoulage, Thèse de doctorat, Université du Maine (2013).
- [3] Lambert, J. B.; Shurvell, H. F.; Lightner,D. A. and Cooks, R. G. Organic Structural Spectroscopy, Prentice-Hall Inc. 1998.
- [4] <http://mathias.borella.fr/2-1-La-spectroscopie-infrarouge.html>.
- [5] Begum,N.; Bhatti, A. S.; Jabeen, F.; Rubini,S. and Martelli, F. "Nanotechnology and Nanomaterials: Nanowires", Chapitre 13, Intech (2010).
- [6] <http://www.cea.fr/technologies/les-microscopes/le-microscope-electronique-a-balayage-meb>.

***CHAPITRE IV***  
***RÉSULTATS ET DISCUSSION***

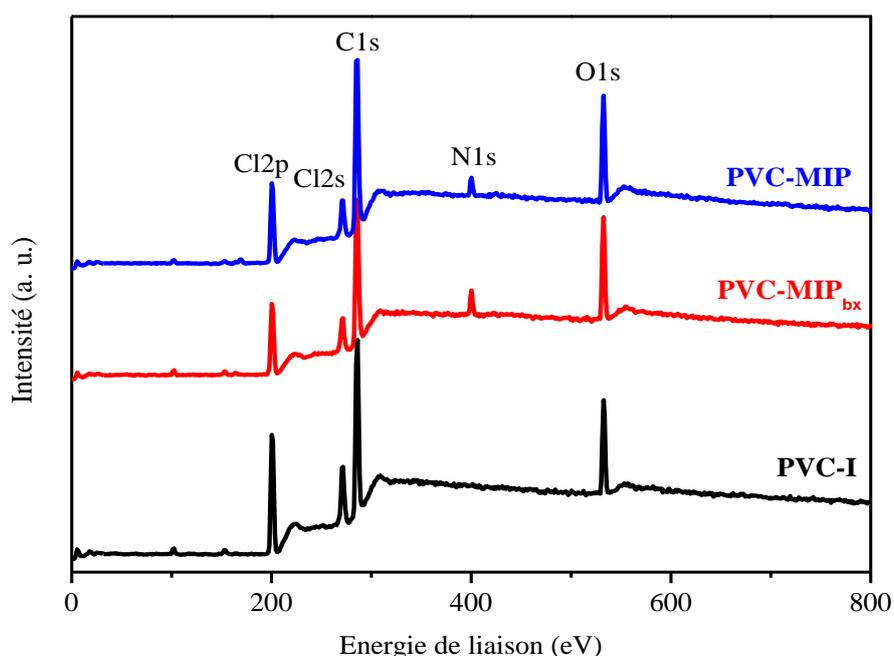
Ce chapitre est consacré à la discussion des résultats de caractérisation des MIPs préparés par les différentes méthodes telles que la spectroscopie IR, spectroscopie Raman, l'analyse par Microscopie électronique à balayage (MEB) et la spectroscopie à photoélectron par rayons X (XPS). La dernière partie est consacrée aux tests d'adsorption spécifique et sélective de lysozyme.

#### IV.1. Analyse par spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

La Figure IV.1 montre le spectre général de PVC-I, PVC-MIP et PVC-MIP<sub>bx</sub> (PVC-MIP avant l'extraction de la protéine). La composition chimique de surface correspondante est rapportée dans le tableau IV.1.

Le spectre général de PVC-I montre des pics peu intenses caractéristiques S2p et N1s de l'amorceur ; cependant le degré de l'agent d'iniferteur fixé à la surface est suffisamment élevé pour amorcer la photo-polymérisation de l'acrylamide et du bis-acrylamide en surface des billes de PVC. En effet, le PVC-MIP<sub>bx</sub> présente un pic N1s attribué aux motifs acrylamide et au lysozyme.

Après extraction de la protéine, le PVC-MIP subit une légère diminution de la quantité d'azote, confirmée par une diminution du rapport d'intensités N1s/Cl2p.



*Figure IV.1. Spectres généraux XPS du PVC-I, PVC-MIP et PVC-MIP<sub>bx</sub>.*

**Tableau IV.1.** Composition chimique de surface

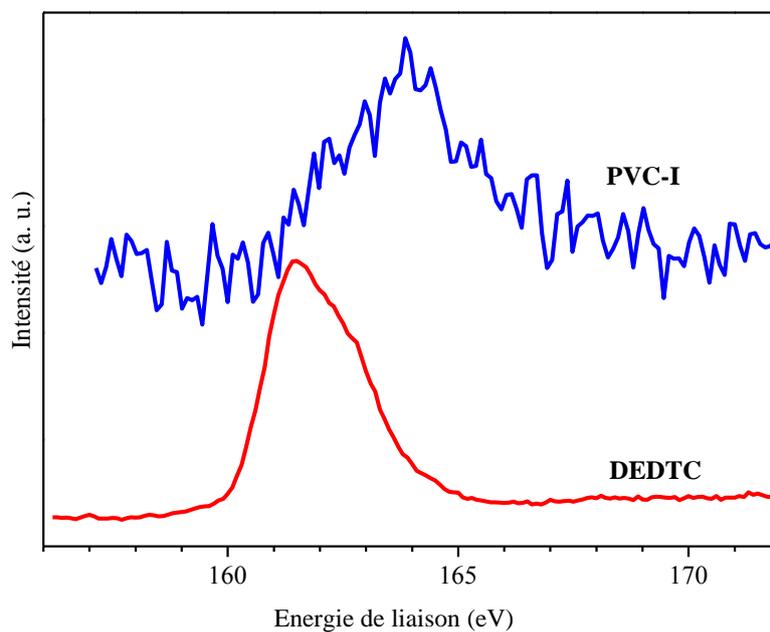
<b>Materials</b>	<b>C</b>	<b>Cl</b>	<b>O</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>Na</b>
PVC	60.3	33.4	6.29			-
DEDTC	54.2	-	11.5	3.26	10.3	20.7
PVC-I	63.3	20.4	12.0	0.18	0.44	-
PVC-MIP <sub>bx</sub>	65.2	13.9	15.1	5.19	0.50	-
PVC-MIP	67.2	13.3	14.2	3.92	0.42	-

Le Tableau IV.1 montre que la teneur en carbone augmente relativement en raison de la contribution de l'amorceur et le polymère greffé. Le rapport S/N est légèrement supérieur à 2 pour l'échantillon de PVC-I, ce qui est conforme avec la structure de l'amorceur. On remarque également qu'après greffage de la couche de MIP que la teneur en soufre reste faible (<0,5%), alors que la teneur en azote augmente de manière significative grâce à l'apport du polymère.

Comme le polyacrylamide et la protéine sont riches en oxygène, ils induisent une augmentation de la quantité d'oxygène (% at.) à la surface. Une autre caractéristique du Tableau IV.1 est la diminution de Cl (% at.) pour tous les échantillons par rapport au PVC. On observe, aussi, une diminution importante de DEDTC après réaction avec les billes du PVC indiquant la substitution des atomes de chlore par le DEDTC.

Après la formation d'une couche de MIP, il y a une autre diminution de la teneur en chlore en raison du revêtement des billes par le polymère. Cependant, la raie Cl2p est toujours détectée indiquant que la double couche iniferter-MIP est plus mince que ~ 10 nm, qui est la profondeur d'échantillonnage sondée par XPS. Celle-ci est une épaisseur très fine qui permet de minimiser la résistance de transfert. On note aussi qu'il est difficile d'évaluer l'épaisseur en raison de la forme irrégulière des billes (voir Figure IV.1).

Le déplacement chimique est la pierre angulaire (the cornerstone) de la technique XPS ; on peut utiliser cette caractéristique pour contrôler la liaison covalente du DEDTC avec le PVC. En effet, les pics S2p de DEDTC et PVC-I montrés dans la Figure IV.2 sont centrés sur des positions nettement distinctes. La première est à 161,6 eV et peut être affectée aux charges négatives des atomes de soufre, tandis que ce dernier le pic est centré à 164,2 eV, une position compatible avec les atomes de soufre neutres dans l'environnement chimique C-S, comme illustré sur la Figure IV.2 après la réaction de DEDTC avec le PVC.

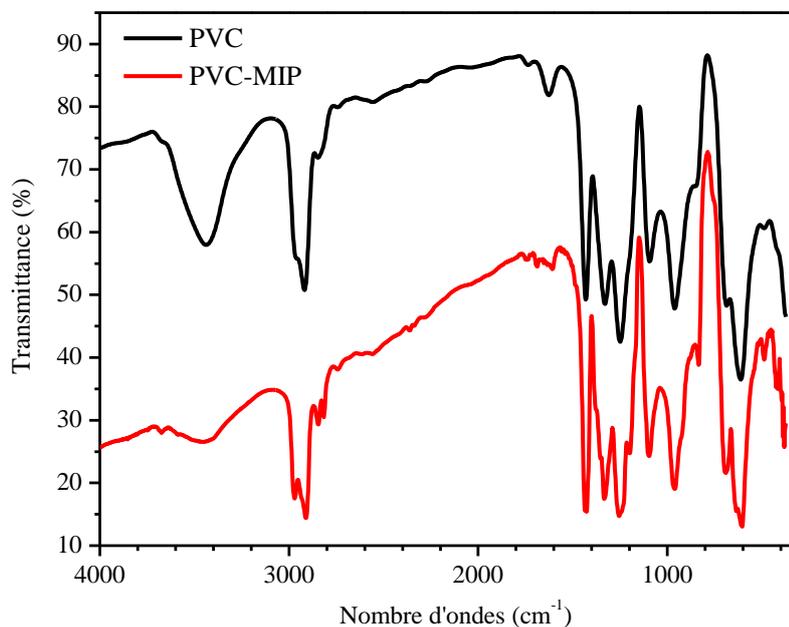


*Figure IV.2. Régions S2p du DEDTC et de PVC-I.*

La technique XPS nous a donc permis de suivre pas à pas la modification chimique de surface des billes de PVC dans le processus de fabrication de billes à empreintes de protéines.

## IV.2. Analyse par spectroscopie infrarouge

La figure IV.3 montre le spectre infrarouge de PVC et PVC-MIP. Les spectres infrarouge sont dominées par les bandes du PVC. Cependant, un pic à  $\sim 1689 \text{ cm}^{-1}$  du PVC-MIP peut être attribué à la vibration des groupes carbonyle du polyacrylamide. Les petites bandes autour de  $2836 \text{ cm}^{-1}$  pourraient être attribuées à des bandes de vibration d'élongation symétrique de CH et  $\text{CH}_2$  dans les unités répétées d'acrylamide et de bis acrylamide.

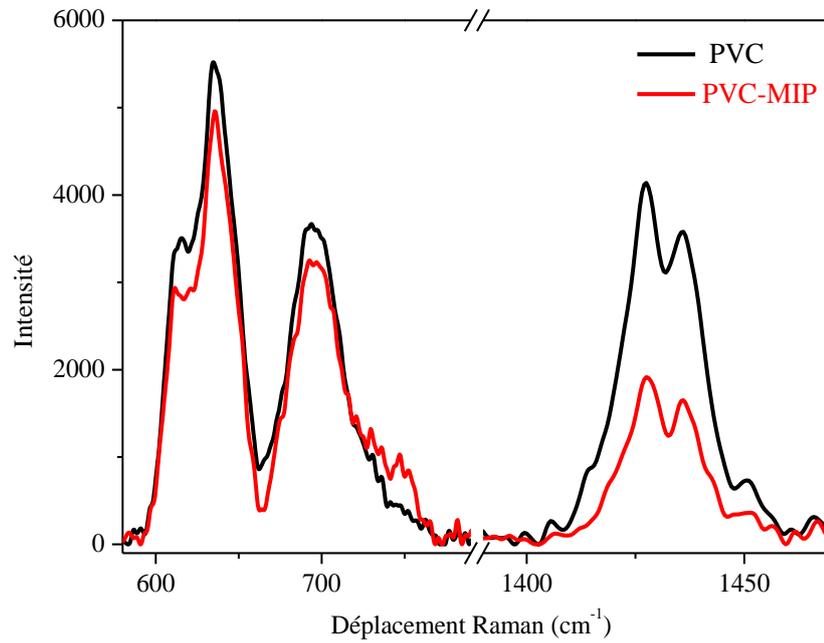


*Figure IV.3. Spectre Infrarouge de PVC et PVC-MIP*

### IV.3. Spectrophotomètre Raman

La figure IV.4 illustre le spectre Raman du PVC et PVC-MIP. Le spectre Raman du PVC présente des bandes de vibration d'élongation C-Cl dans la région  $610 - 697 \text{ cm}^{-1}$  et des bandes de déformation  $\text{CH}_2$  situées entre  $1427$  et  $1436 \text{ cm}^{-1}$ .

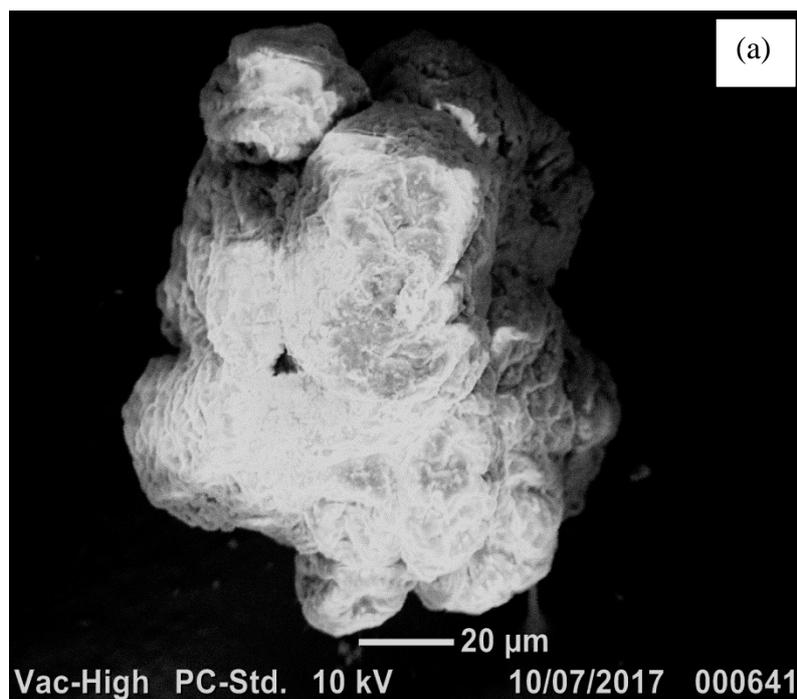
L'intensité des bandes de vibration d'élongation C-Cl (région  $610 - 697 \text{ cm}^{-1}$ ) et aussi les bandes de déformation  $\text{CH}_2$  montre une diminution de l'intensité des bandes du PVC-MIP par rapport aux bandes du PVC. Cette variation de l'intensité relative des bandes représente une substitution d'atomes de chlore à la surface des billes comme c'est indiqué précédemment pour le PVC modifié [1].



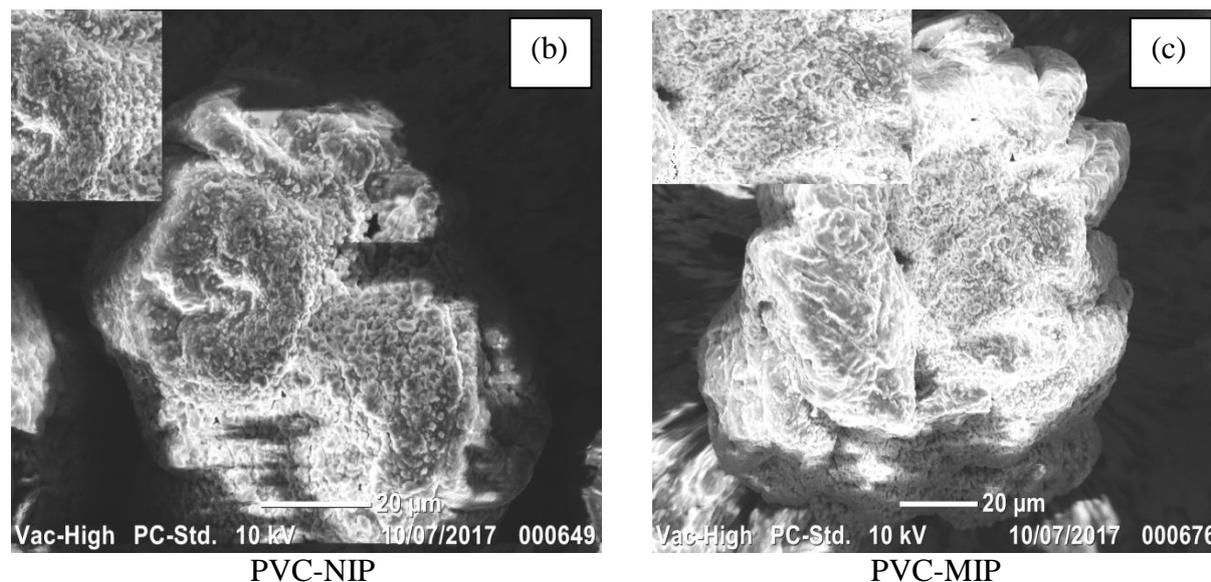
*Figure IV.4. Spectre Raman du PVC et PVC-MIP*

#### IV.4. Microscopie Électronique à Balayage (MEB)

Les micrographies obtenues par microscopie électronique à balayage et illustrées dans la figure IV.5.



PVC



**Figure IV.5.** Images MEB PVC (a), PVC- NIP (b) et PVC-MIP (c)

Les particules de PVC avec le diamètre à l'échelle millimétrique (Fig. IV.5 (a)) a fragmenté à l'échelle micrométrique (Fig. IV.5 (b)) après la photopolymérisation de l'acrylamide a eu lieu. On peut dire aussi que l'acrylamide avait été greffé sur les surfaces des particules de PVC et que le polyacrylamide greffé a augmenté l'adsorption d'eau sur les supports du PVC en raison que le polyacrylamide pouvait se dissoudre dans l'eau. Ainsi que les particules de PVC greffées par le polyacrylamide adsorbent une masse d'eau et gonflées. Ensuite, ils sont fragmentés en morceaux en surface même sous agitation légère.

On peut également remarquer sur la figure que les surfaces de PVC greffées par le polyacrylamide ont changées (changement de forme) après la réaction de photopolymérisation. Cela a également indiqué que le polyacrylamide avait été greffé avec succès sur les surfaces du PVC par la méthode proposé. Le polymère formé et visible uniquement à la surface car les images PVC-NIP et PVC-MIP ne montrent pas de polymère non greffé dans la solution de polymérisation confirmant l'avantage de cette méthode de greffage par rapport à la méthode traditionnelle de polymérisation radicalaire.

Enfin la mesure de l'épaisseur de la couche des MIPs ou NIPs formées est difficile à cause de la forme irrégulière des particules de PVC

### IV.5. Surface spécifique (BET)

Les polymères peuvent présenter des pores de tailles variables qui peuvent favoriser l'adsorption des molécules. 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. La valeur de la surface spécifique est directement liée à la porosité du matériau

Le tableau IV.2 reporte les valeurs de surface spécifique obtenues pour le PVC-MIP et le PVC-NIP

**Tableau IV.2.** Valeurs de surface spécifique

Échantillon	Surface spécifique (m <sup>2</sup> /g)	$\Delta S_{\text{spéc.MIP et NIP}}$ (m <sup>2</sup> /g)
NIP-PVC	1.47	0.34
MIP-PVC	1.81	

La surface spécifique de PVC-MIP présente une valeur de 1.81 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>, celle du PVCNIP est de 1.47 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>. Les deux polymères MIP et NIP présentent des surfaces spécifiques faibles ce qui confirme l'absence de porosité de ces particules. En effet, plus les diamètres des pores sont importants jusqu'à atteindre la limite où il n'y en a plus, plus les surfaces spécifiques sont faibles.

L'absence de porosité s'explique en premier lieu par la polarité importante du solvant de polymérisation constitué d'un solvant aqueux (eau). En effet, les solvants polaires et protiques conduisent généralement à une structure macroporeuse des polymères et ainsi à de plus faibles capacités que les solvants apolaires [2].

Cette structure non poreuse peut aussi s'expliquer par une répartition des monomères polaires comme l'acrylamide et le bis acrylamide, en surface du MIP et non pas à l'intérieur de cavités. Cela conduit à l'augmentation de la polarité des polymères et par conséquent à la diminution de la porosité. Cette hypothèse peut d'ailleurs être confirmée par le fait que la surface spécifique du MIP est proche à celle sur le NIP ( $\Delta S_{\text{spéc.MIP et NIP}}$  et de l'ordre de 0.34).

L'étude en BET a permis de mettre en évidence une surface polaire et macroporeuse. Ces caractéristiques permettraient d'obtenir une bonne affinité du MIP envers des molécules polaires telles que le lysozyme grâce à sa polarité et des capacités plus importantes du fait de la structure macroporeuse.

## IV.6. Etude des performances des MIP

### IV.6.1. Teste d'adsorption de lysozyme à partir d'une solution aqueuse.

La méthode d'évaluation par les tests d'adsorption est la plus courante utilisée pour apprécier l'affinité des MIPs pour la molécule empreinte. Pour effectuer ces tests d'adsorption des solutions variables de lysozyme sont mises en contact avec une quantité fixe de MIPs sec à pH égale à 7.4.

Les mélanges ont été agités pendant 30 minutes (temps d'équilibre) puis les particules ont été séparé par centrifugation, enfin la quantité de protéine dans le surnageant est ensuite déterminée par la méthode UV-Vis selon la méthode de Bradford. Les isothermes d'adsorption sont établies en partant de la concentration de lysozyme adsorbée en fonction de la concentration à l'équilibre (figure IV.6).

La quantité adsorbée à l'équilibre est donnée par l'équation suivante :

$$Q = \frac{(C_0 - C_e) \cdot V}{m} \quad (\text{IV.1})$$

Avec :

$C_0$  : Concentration initiale de la solution de lysozyme en mg/L ;

$C_e$  : Concentration de la solution de lysozyme à l'équilibre en mg/L ;

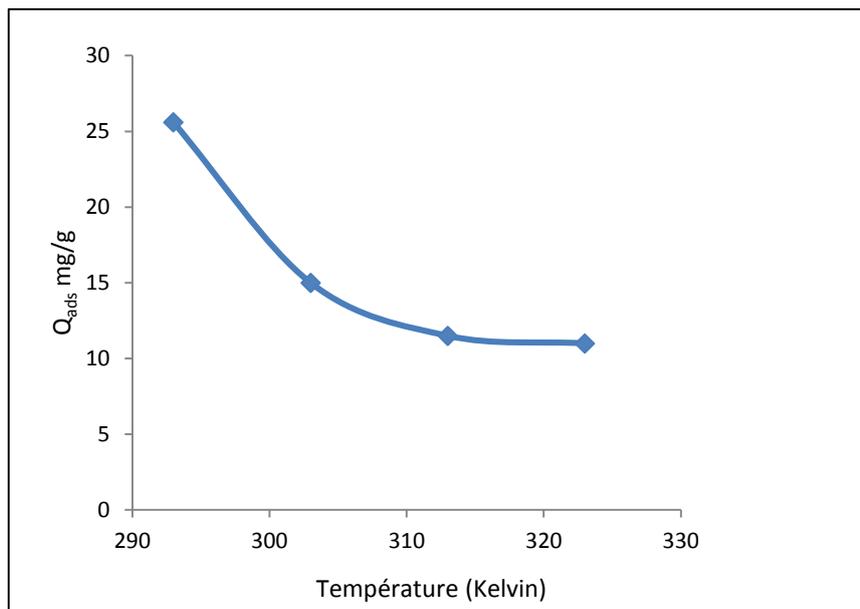
$m$  : Masse de polymère en g ;

$V$  : Volume total de la solution en L ;

$Q$  : Quantité adsorbée en mg/g.

### IV.6.2. Effet de la température

Nous avons effectué des expériences d'adsorption en variant la température des solutions de 20 à 50 °C. Les essais ont été réalisés sur des solutions de lysozyme de 10 mL à une concentration de 0,5 mg/mL, avec une masse de 100 mg de polymère (PVC-MIP) et à un pH égal à 7,4. Ces mélanges sont maintenus sous agitation pendant 30 minutes, enfin le surnageant est analysé par spectrophotométrie UV visible.



**Figure IV.6. :** Influence de la température sur l'adsorption de lysozyme sur le PVC-MIP

La Figure IV.6 montre une diminution de la capacité d'adsorption avec la température, cette diminution peut être expliquée par une augmentation du désordre lors de l'adsorption, en effet l'aspect aléatoire augmente à l'interface solide-solution durant ce processus de fixation [3].

### IV.6.3. Détermination des Isothermes d'adsorption

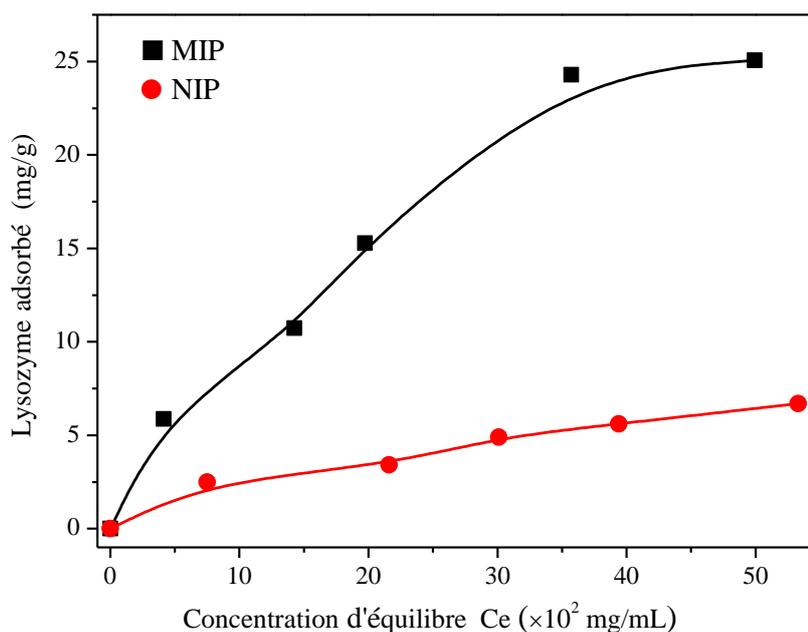
La figure IV.7 montre les isothermes d'adsorption du lysozyme sur les particules PVC-MIP et PVC-NIP.

On remarque que l'adsorption de lysozyme sur les deux adsorbants est très peu significative pour les faibles concentrations. Au fur et à mesure que cette concentration augmente, la quantité adsorbée augmente pour atteindre un palier de saturation aux fortes concentrations. A faible concentration de lysozyme, la quantité de cette protéine n'était pas suffisamment élevée pour saturer les cavités de liaison spécifiques.

Cependant, avec la croissance de la concentration de Lysozyme, presque tous les sites spécifiques ont été occupés par la protéine et la capacité d'adsorption du polymère était le plus élevé c'est à dire que les sites étant alors saturés.

Les courbes d'isotherme d'adsorption s'adaptent bien avec le type de modèle de Langmuir. On remarque aussi que les particules du PVC-MIP présentent un bon effet de l'empreinte pour la protéine modèle.

D'autre part, on remarque aussi que cette adsorption est presque cinq fois plus par rapport aux particules du PVC-NIP, soulignant ainsi l'importance du processus d'impression par lysozyme (figure IV.7).



*Figure IV.7. Isotherme d'adsorption*

#### IV.6.4. Linéarisation des isothermes d'adsorption

Il existe de nombreux modèles théoriques qui ont été développés pour décrire les isothermes d'adsorption. Nous nous intéresserons seulement aux modèles de Langmuir et Freundlich, car ils sont les plus simples et les plus répandus.

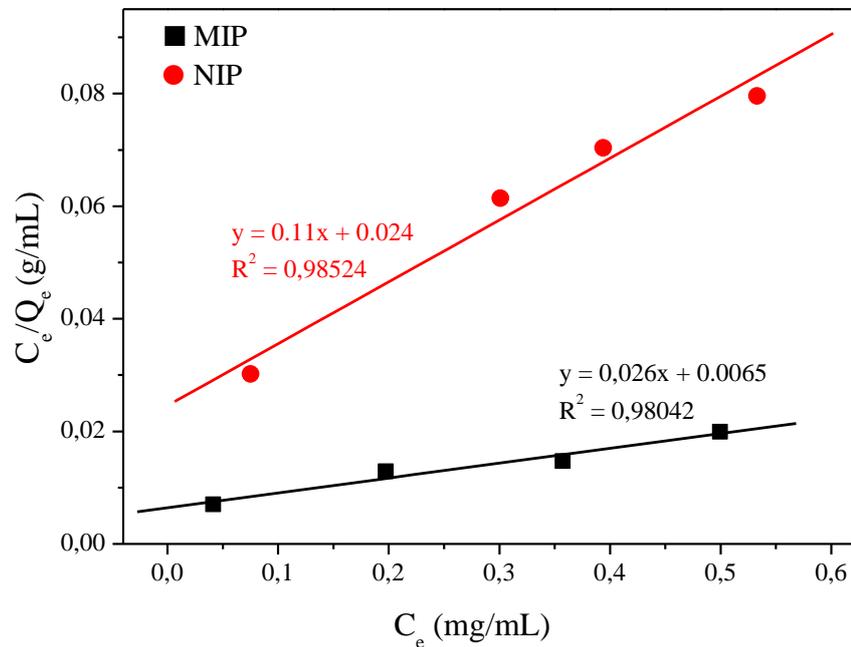
Afin d'étudier le pouvoir adsorbant de nos échantillons, nous avons appliqué les modèles de Langmuir et de Freundlich.

##### a- Modèles de Langmuir

L'équation de l'isotherme de Langmuir utilisée est donnée par la relation suivante :

$$\frac{1}{Q_e} = \frac{1}{(Q_m \cdot b \cdot C_e)} + \frac{1}{Q_m} \quad (\text{IV.2})$$

La capacité d'adsorption maximale  $Q_m$  et la constante de Langmuir  $b$  sont déterminées graphiquement à l'aide de la figure IV.8 montrée ci-dessous



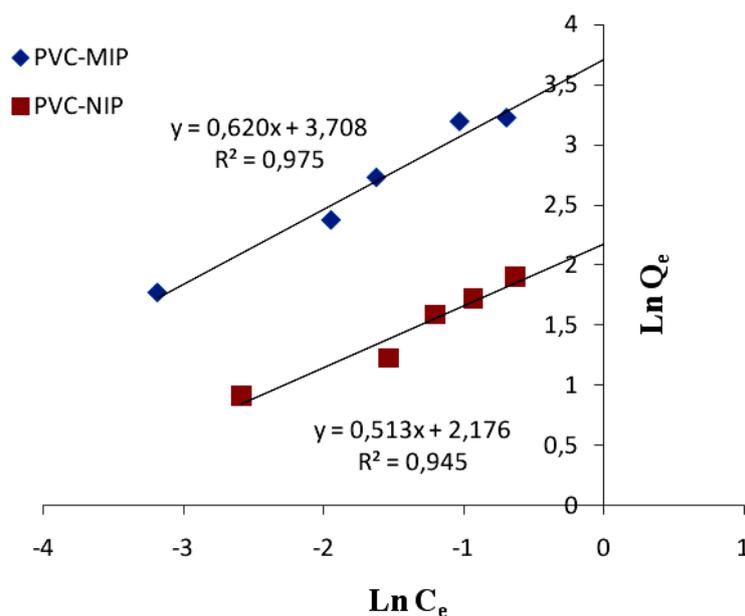
**Figure IV.8.** Linéarisation des isothermes d'adsorption par le modèle de Langmuir

#### b- Modèles de Freundlich

L'équation de l'isotherme de Freundlich utilisée est donnée par la relation suivante :

$$\ln Q_e = \ln K_f + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (\text{IV.3})$$

Les constantes  $K_f$  et  $n$  sont déterminées graphiquement à partir de la courbe de l'expression linéaire de Freundlich (figure IV.9).



**Figure IV.9.** Linéarisation des isothermes d'adsorption par le modèle de Langmuir

Les isothermes et les paramètres correspondants pour l'adsorption du lysozyme sur les particules du PVC MIP et PVC-NIP sont rapportés dans Tableau IV.3.

**Tableau IV.3.** Paramètres des modèles de Langmuir et Freundlich

Paramètres	Langmuir			Freundlich		
	$Q_m$ (mg/g)	$k_L$ (L/mg)	$R^2$	$\ln K_f$	$n$	$R^2$
PVC-MIP	38.46	$4.06 \times 10^{-3}$	0.9804	3.708	0.620	0.975
PVC-NIP	9.09	$4.58 \times 10^{-3}$	0.9852	2.176	0.513	0.945

Il apparaît à travers ces résultats que la valeur du coefficient de détermination  $R^2$  obtenu avec la linéarisation de Langmuir est supérieure à celle trouvée pour Freundlich, ce qui indique que l'adsorption des protéines sur les polymères à empreintes moléculaires préparés est mieux décrite par le modèle de Langmuir.

La constante de Freundlich  $K_f$  traduit la capacité d'adsorption de la protéine considérée sur le solide. La valeur de  $K_f$  est directement proportionnelle à la quantité de la protéine adsorbée. Dans notre cas, les résultats obtenus, de  $\ln K_f$ , égal à 3.708 et 2.176 pour le MIP et le NIP respectivement, indiquent que notre adsorbant présente une bonne affinité vis-à-vis des MIPs par rapport aux particules des NIPs.

Ces résultats quantitatifs rapportés dans le tableau IV.2 indiquent une grande capacité d'adsorption des particules de MIP confirmant ainsi que l'empreinte de lysozyme est efficace. Elle est égale à 38,46 mg/g. Cette valeur est supérieure à celles citées dans la littérature [4-6].

En effet, la capacité d'adsorption est supérieure à 20,9 mg/g sur les nanotubes de carbone à parois multiples (MWCNT) revêtues de polymère imprégné de lysozyme alors qu'elle est de 22,9 mg/g à pH 8 pour les cryogels super macroporeux imprégnés de lysozyme.

Toutefois, l'adsorption du lysozyme sur les particules de latex de poly (styrène sulfonate) était assez importante. Elle est de l'ordre de 95 mg/g mais ces adsorbants n'étaient pas très sélectifs car une adsorption remarquable d'Apolactalbumine a été observée (41mg/g).

### c- Facteur d'impression

Le facteur d'impression est défini par l'équation suivante :

$$\alpha = \frac{q_{MIP}}{q_{NIP}} \quad (IV.4)$$

$q_{MIP}$  : est la capacité d'adsorption de la protéine sur le PVC-MIP ;

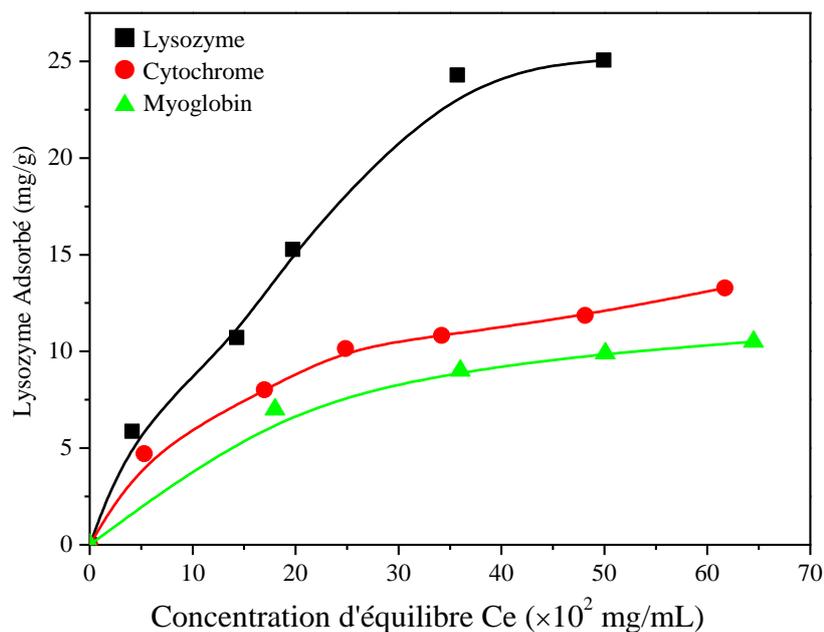
$q_{NIP}$  : est la capacité d'adsorption de la protéine sur le PVC-NIP.

La valeur du facteur d'impression obtenue (3,73) est plus grande que celles obtenues et rapportées par d'autres travaux ; elles sont égales à 1,5 [7], 2,02 [8] et 1,36 [4]. Ce résultat souligne l'importance de la capacité de rétention du PVC - MIP et reflète certainement le rôle essentiel de la fixation du MIP sur la surface des particules de PVC.

### IV.7. Tests de sélectivité vis-à-vis de lysozyme

L'adsorption du lysozyme sur des particules de PVC imprimées a été comparée à celle du cytochrome et de la myoglobine. Pour traiter cette propriété, les isothermes d'adsorption des trois protéines ont été comparées.

Il faut noter que, d'une part, nous avons choisi le cytochrome en raison de son poids moléculaire similaire et de son point isoélectrique (IEP) à ceux du lysozyme. D'autre part, nous avons choisi la myoglobine pour sa principale charge. La figure IV.10 montre les courbes d'isotherme d'adsorption du lysozyme, du cytochrome et de la myoglobine sur les particules du PVC-MIP. On peut noter la sélectivité significative des particules de PVC-MIP vers le lysozyme.



**Figure IV.10.** Courbes d'isotherme d'adsorption de lysozyme, cytochrome et myoglobine.

#### a- Coefficient de distribution ( $k_d$ )

Les coefficients de distribution ( $k_d$ ) pour la myoglobine et le cytochrome par rapport à Lysozyme ont été calculés par l'équation suivante :

$$k_d = \frac{(C_0 - C_e) \cdot V}{C_e \cdot m} = \frac{q_e}{C_e} \quad (\text{IV.5})$$

On ne considère que la concentration initiale de la protéine utilisée pour la valeur la plus élevée dans notre travail.

#### b- Coefficient de sélectivité ( $k$ )

Le coefficient de sélectivité ( $k$ ) pour la liaison de Lysozyme avec les espèces concurrentes (c'est-à-dire myoglobine et cytochrome) a été déterminé par l'équation suivante :

$$k = \frac{k_d \text{ lysozyme}}{k_d \text{ proteine concurrente}} \quad (\text{IV.6})$$

Où la protéine compétitive est le cytochrome ou la myoglobine. Pour ces protéines, les valeurs calculées pour  $k$  sont respectivement de 2,3 et 3,1. Ces valeurs sont significativement plus élevées que l'unité, ce qui implique que les perles imprimées sont sélectives pour le lysozyme.

Bien que dans ce travail, nous avons étudié le comportement d'adsorption du PVC-MIP vers les protéines prises séparément, néanmoins cette étude pourrait être appliquée pour la séparation chromatographique du lysozyme d'un mélange de protéines.

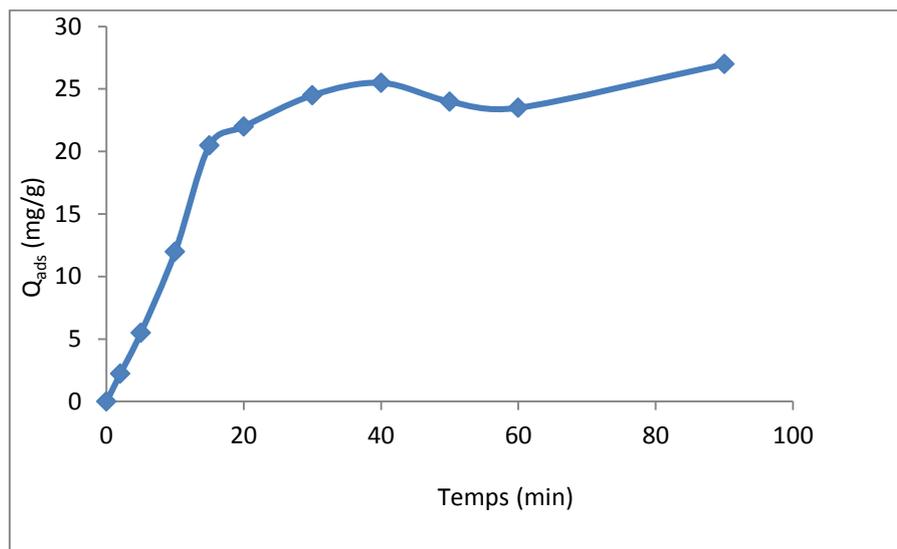
#### **IV.8. Étude de la cinétique d'adsorption de Lysozyme sur les MIPs**

Il existe plusieurs modèles cinétiques pour décrire le mécanisme d'adsorption. La cinétique se définit comme étant une vitesse d'adsorption. L'adsorption d'un soluté sur un solide dans une solution aqueuse est un phénomène où la cinétique est souvent complexe. La capacité d'adsorption dépend de plusieurs paramètres liés à l'état du solide, généralement ayant une surface hétérogène réactive, et des conditions physico-chimiques sous lesquelles l'adsorption est dirigée.

En général, l'adsorption peut être décrite comme une série d'étapes :

- la diffusion de l'adsorbat à partir de la phase liquide à la surface externe de l'adsorbant à travers la couche limite (diffusion du film)
- La diffusion de l'adsorbat à travers les pores de l'adsorbant (diffusion intraparticulaire)
- L'adsorption elle-même sur la surface

L'effet du temps d'adsorption sur la capacité d'adsorption du MIP a été examiné pendant une période de 90 minutes. L'équilibre a été atteint après 30 min (figure IV.11). Cette cinétique est relativement rapide, elle dépend directement de la macroporosité de la structure des hydrogels formant la couche des MIPs.



*Figure IV.11. Cinétique d'adsorption de Lysozyme sur les MIP*

#### IV.8.1. Cinétique de pseudo premier ordre : Modèle de Lagergren

Le modèle de réaction pseudo-premier ordre linéarisé a été traité comme l'un des modèles donnés ci-dessous (figure IV.12.a) :

$$\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - k_1 t \quad (\text{IV.7})$$

Où :

$k_1$  est la constante de vitesse, en  $\text{min}^{-1}$ ,

$t$  est le temps (min),

$Q_e$  et  $Q_t$  sont les quantités adsorbées, en  $\text{mg} / \text{g}$ , de Lysozyme à l'équilibre et au temps  $t$  respectivement [9].

En traçant  $\ln(Q_e - Q_t)$  en fonction du temps  $t$ , nous calculons les paramètres cinétiques du modèle Lagergren, Le coefficient de régression est acceptable, ce qui montre que l'adsorption peut être décrite par une cinétique de pseudo-premier ordre.

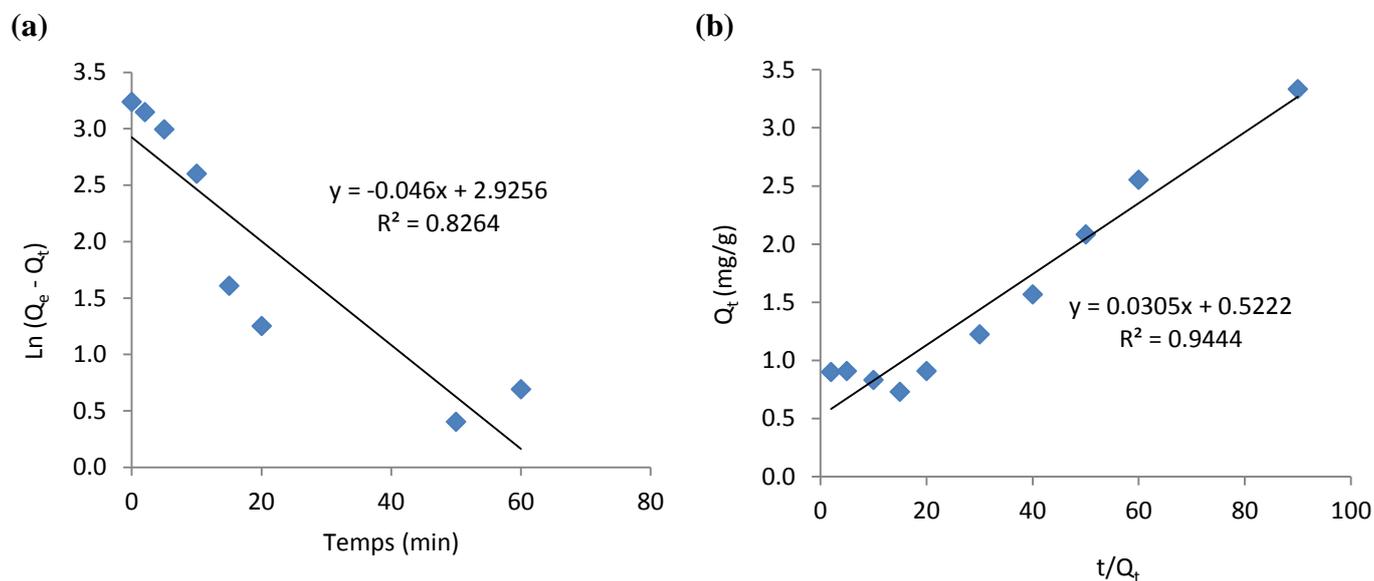
#### IV.8.2. Pseudo second ordre : Modèle de Blanchard

La forme linéaire de la cinétique pseudo-second-ordre a également été testée en utilisant l'équation suivante (figure IV.12.b) :

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 Q_e^2} + \frac{1}{Q_e} \cdot t \quad (\text{IV.8})$$

Où :  $k_2$  est la constante de vitesse, en  $\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,

En traçant  $(t/Q_t)$  en fonction du temps  $t$ , Nous avons noté que le modèle d'adsorption-pseudo second ordre est plus approprié pour décrire la cinétique d'adsorption de Lysozyme sur les MIPs.



**Figure IV.12.** Modélisation de la cinétique d'adsorption de Lysozyme sur les MIP :  
(a) Pseudo-premier ordre, (b) Pseudo-second ordre

Ainsi les paramètres cinétiques des modèles pseudo premier ordre et pseudo second ordre sont enregistrés sur le tableau IV.4.

**Tableau IV.4.** Paramètres cinétiques des modèles pseudo premier ordre et pseudo second ordre

Pseudo premier ordre			Pseudo second ordre		
$Q_e$ (mg/g)	$k_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$	$Q_e$ (mg/g)	$k_2$ ( $\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$R^2$
18,63	0,046	0,826	33,33	0,002	0,944

Ces valeurs obtenues sont en bon accord avec la littérature [10,11] ce qui confirme la validité de l'application du modèle pseudo second ordre de Blanchard à la cinétique de l'adsorption de Lysozyme sur les MIPs.

### IV.8.3. Détermination des paramètres de diffusion intraparticulaire : Modèle de Weber-Morris

La diffusion intraparticulaire est l'une des nombreuses étapes du processus de sorption. Elle est limitante lorsque le tracé de la quantité sorbée en fonction de la racine carrée du temps donne une droite qui passe par l'origine [12].

Afin d'évaluer la cinétique d'adsorption, nous avons appliqué le modèle de Weber-Morris (diffusion intraparticulaire), l'équation de ce modèle est donnée par la relation suivante :

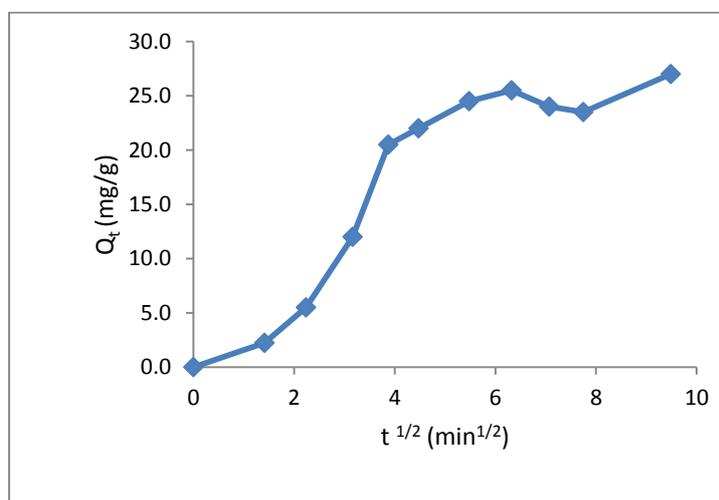
$$Q_t = k_d \cdot t^{1/2} + C_{WM} \quad (IV.9)$$

Où :

$k_d$  est la constante de vitesse de diffusion intraparticulaire, en  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1/2}$ ,

$C_{WM}$  est la constante de Weber-Morris, en  $\text{mg/g}$ .

La cinétique de diffusion des protéines vers les MIPs est illustrée sur la figure IV.13. Cette figure montre la quantité adsorbée ( $\text{mg/g}$ ) en fonction de la racine carrée du temps (en minutes).



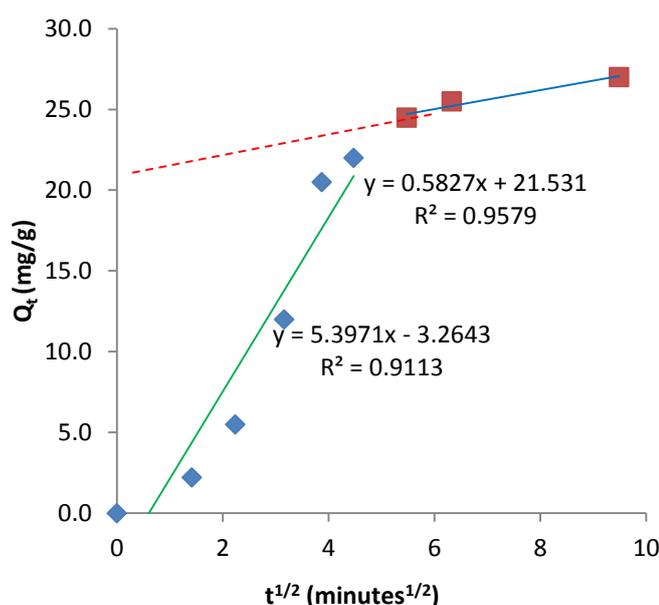
**Figure IV.13.** Cinétique d'adsorption de Lysozyme sur les MIPs selon le modèle de Weber-Morris

On observe une augmentation de l'adsorption initiale. Cette cinétique est relativement rapide, elle présente une portion initiale courbée suivie par une portion quasi-linéaire. À partir de 20 minutes ( $4,47 \text{ minutes}^{1/2}$ ), la courbe révèle une caractéristique linéaire qui indique que

la diffusion intraparticulaire contrôle le processus d'adsorption. L'équilibre est atteint à 25,50 mg/g.

La linéarisation de la cinétique de diffusion intraparticulaire par le modèle Weber-Morris montre que les droites tracées ne passent pas par l'origine, ce qui démontre que la diffusion du Lysozyme dans les pores des MIPS n'est pas le seul mécanisme qui contrôle la cinétique de sorption.

La Figure IV.14 permet d'obtenir les paramètres du modèle et la régression linéaire.



**Figure IV.14.** Modèle cinétique diffusion intraparticulaire (Weber et Morris) pour l'adsorption du Lysozyme sur les MIPS

Le modèle de Weber et Morris révèle une première étape indiquant un effet de couche limite, (d'adhérence de surface), suivie par une portion linéaire indiquant la diffusion intraparticulaire (diffusion dans les pores).

La pente de la portion linéaire donne la constante de vitesse de la diffusion intraparticulaire  $k_d$  qui équivaut à 0,582 mg/g.min<sup>1/2</sup>. L'ordonnée à l'origine donne l'adhérence de surface (épaisseur de la couche limite) qui correspond à 21,53 mg/g. [11]. L'adhérence de surface est complétée lorsque commence la diffusion dans les pores au temps 30 minutes (0,547 minutes<sup>1/2</sup>).

Ainsi, la valeur élevée de la constante de diffusion intraparticulaire prouve que le matériau préparé possède une structure macroporeuse.

La diffusion du film, la vitesse initiale d'adsorption ( $h$ ) et le temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) pour l'adsorption ont également été calculés selon les équations suivantes :

$$\ln(1 - F) = -k_{FD} \cdot t \quad (\text{IV.10})$$

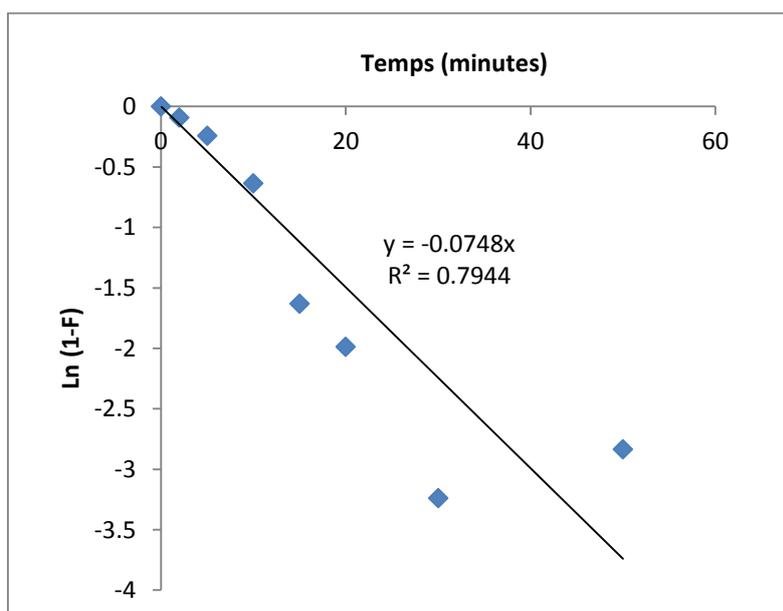
$$h = k_2 \cdot Q_e^2 \quad (\text{IV.11})$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_2 \cdot Q_e} \quad (\text{IV.12})$$

Où,

$k_{FD}$  est la constante de diffusion du film, en  $\text{min}^{-1}$ ,

$F$ ,  $F = \frac{Q_t}{Q_e}$ , est la fraction des capacités d'adsorption entre l'instant  $t$  et l'équilibre.



**Figure IV.15.** Détermination du coefficient de diffusion

En outre, la vitesse d'adsorption initiale ( $h$ ), le temps demi-vie d'adsorption ( $t_{1/2}$ ) et le coefficient de diffusion du film ( $k_{FD}$ ), déterminé à partir de la figure IV.15, sont égaux à  $1,30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $19,60 \text{ min}$  et  $0,074 \text{ min}^{-1}$ , respectivement. Ces résultats confirment que l'adsorption est un processus rapide, en particulier au début de la période de contact.

Le tableau IV.5 montre les données, résultats et paramètres du modèle cinétique de diffusion intraparticulaire.

**Tableau IV.5.** Paramètres des modèles cinétiques appliqués

Weber-Morris			Film de diffusion	
$k_d$ (mg.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1/2</sup> )	$C_{WM}$ (mg/g)	$R^2$	$k_{FD}$ (min <sup>-1</sup> )	$R^2$
0,582	21,53	0,957	0,074	0,794
Vitesse initiale d'adsorption			Temps de demi-vie d'adsorption	
$h$ (mg.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	1,30		$t_{1/2}$ (.min)	19,60

### IV.9. Détermination des paramètres thermodynamiques

L'adsorption est un phénomène qui peut être endothermique ou exothermique selon le matériau adsorbant et la nature des molécules adsorbées [13].

Dans le but d'assimiler le phénomène thermodynamique de l'adsorption de lysozyme par les MIP, nous avons déterminé les paramètres thermodynamiques tels que l'enthalpie libre standard  $\Delta G^\circ$ , l'enthalpie standard  $\Delta H^\circ$  et l'entropie standard  $\Delta S^\circ$ , en utilisant les équations suivantes [14] :

$$k_d = \frac{Q_e}{C_e} \quad (\text{IV.13})$$

$$\Delta G^\circ = -RT \cdot \text{Ln } k_d \quad (\text{IV.14})$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (\text{IV.15})$$

$$\text{Ln } k_d = \left(\frac{\Delta S^\circ}{R}\right) - \left(\frac{\Delta H^\circ}{R}\right) \frac{1}{T} \quad (\text{IV.16})$$

Avec :

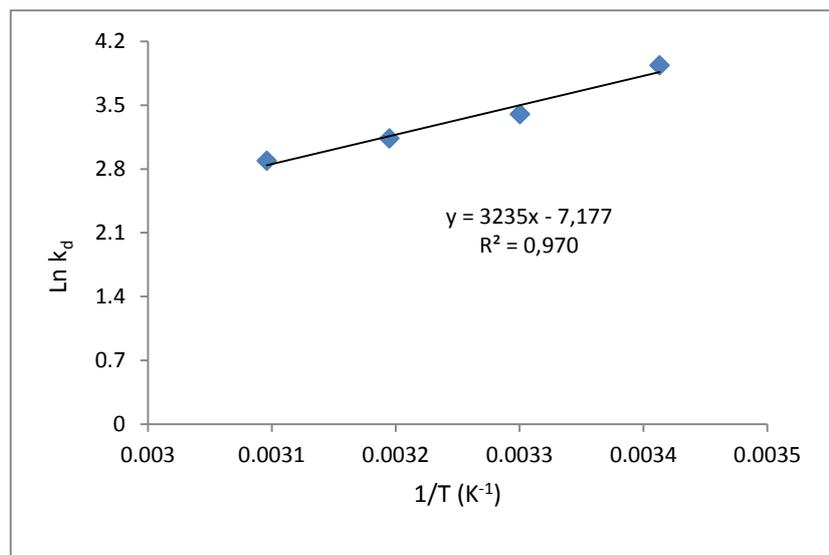
$k_d$  : Constante de distribution ;

$Q_e$  : Capacité d'adsorption à l'équilibre ;

$C_e$  : Concentration à l'équilibre du soluté en solution ;

$R$  : Constante des gaz parfaits (J/mol.K), et  $T$  : Température absolue.

La variation du  $\text{Ln } k_d$  en fonction de l'inverse de la température est représentée sur la figure ci-dessous (figure IV.16).



**Figure IV.16.** Effet de la température sur la constante de distribution du phénomène d'adsorption

D'après cette figure nous avons obtenu une droite avec un bon coefficient de corrélation, ce qui nous permet de calculer  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  et donc  $\Delta G^\circ$  d'adsorption de lysozyme sur le MIP préparé.

Les résultats des paramètres thermodynamiques sont regroupés dans le tableau suivant (tableau IV.6):

**Tableau IV.6.** Paramètres thermodynamiques d'adsorption de lysozyme sur le MIP

$\Delta S^\circ$ (J/K.mol)	$\Delta H^\circ$ (KJ/mol)	$R^2$	$\Delta G^\circ$ (KJ/mol)			
			20°C	30°C	40°C	50°C
-59,670	-26,896	0,987	20°C	30°C	40°C	50°C
			-9,412	-8,816	-8,219	-7,622

D'après le tableau IV.6, la valeur négative de  $\Delta H^\circ$  confirme que l'adsorption est exothermique, cette valeur montre qu'il s'agit d'une adsorption physique (valeur de  $\Delta H^\circ < 40$  KJ/mol) [15]. La valeur de  $\Delta S^\circ$  négative montre que l'adsorption se fait avec l'augmentation de l'ordre à l'interface solide-solution, ce résultat montre que les molécules de lysozyme adsorbé sur la surface du MIP sont organisées par rapport à la situation dans la phase aqueuse.

L'adsorption de lysozyme sur le MIP a des valeurs négatives de  $\Delta G$  pour toutes les températures examinées indiquant la nature spontanée du processus d'adsorption.

On remarque aussi, que  $\Delta G^\circ$  augmente légèrement avec l'augmentation de la température de la solution, ce qui confirme le fait que l'adsorption est mieux favorisée à des basses températures [16, 17].

## Bibliographie du chapitre IV

- [1] Rusen, E.; Marculescu, B.; Butac, L.; Preda, N.; Mihut, L. Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.2008, 16, 178.
- [2] Bérengère Claude, Thèse de Doctorat, Université D'orleans, 2007
- [3] Monarrez I. M. Thèse de Doctorat, institue agronomique Paris – Grignon, 2004.
- [4] Fang, G.; Zhai, X.; Deng, Q.; Yuan, S.; Cao, M.; Wang, S. Curr. Org. Chem.2012, 12, 1461.
- [5] Bereli, N.; Andac, M.; Baydemir, G.; Say, R.; Galaev, I. Y.; Denizli, A.J.; Chrom. A 2008, 1190, 18.
- [6] Galisteo, F.; Norde, W. Colloids Surf. B1995, 4, 375.
- [7] . Zhao, K.; Lin, B.; Cui, W.; Feng, L.; Chen, T.; Wei, J.Talanta 2014, 121, 256.
- [8] Gai, Q. Q.; Qu, F.; Liu, Z. J.; Dai, R. J.; Zhang, Y. K. J.Chrom. A2010, 1217, 5035.
- [9] M. Daoud-Attieh, H. Chaib, C. Armutcu, L. Uzun, A. Elkak, A. Denizli, Sep. Purif.Technol. 118 (2013) 816.
- [10] Çulha, S. ;Armutcu C. ; Uzun L. ; Şenel, S. ; Denizli A. Materials Science and Engineering 2015, 52 , 315.
- [11] Daoud-Attieh, M. ; Chaib,H.; Armutcu,C. ; Uzun,L. ; Elkak,A. ; Denizli A. Separation and Purification Technology 2013,118, 816.
- [12] Aloui, A. ; Zertal, A. Third International Conference on Energy, Materials, Applied Energetics and PollutionICEMAEP2016, October 30-31, 2016.
- [13] Rytwo, G. ; Ruiz-Hitzky, E. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2003,71, 751.
- [14] Boubberka, Z.; Kacha, S.; Kameche, M. ; Elmaleh, S. ; Derriche, Z. Journal of Hazardous Materials, 2005,119, 117.
- [15] Edeline, F. L'épuration physico-chimique des eaux, Edition Cebedoc sprl, Liège 1992.
- [16] Belaid, D.; Kacha,S. Journal of Water Science, 2011,24, 131.
- [17] Mellah, A.; Chegrouche, S. J. Water Researches, 1985, 31, 621.

# ***CONCLUSION GÉNÉRALE***

Ce travail a pour objectif de préparer des films minces de polyacrylamide à empreinte de lysozyme sur des supports granuleux de PVC, destinée à la séparation sélective de cette protéine.

Les films minces de polyacrylamide à empreinte de lysozyme sur des particules de PVC ont été préparés par la méthode photoiniferter. Le PVC et le PVC-MIP ont été caractérisés par la spectroscopie XPS, infrarouge à transformé de Fourier (FTIR), spectroscopie Raman, microscopie électronique à balayage (MEB) et UV-visible.

La fixation du DEDTC sur le PVC a été suivie par XPS. La présence de la couche de MIP sur la surface des particules de PVC a été confirmée par infrarouge, spectroscopie Raman et également par XPS.

Les données expérimentales de l'isotherme ont été fittées par les modèles de Langmuir et Freundlich. Les résultats obtenus sont mieux ajustés par le modèle de Langmuir.

L'utilisation de la spectroscopie UV-Visible a montré que les particules PVC-MIP se sont avérées sélectives vers le lysozyme par rapport au cytochrome et la myoglobine.

La cinétique d'adsorption de Lysozyme sur les MIPs montre que le modèle pseudo deuxième ordre donne la meilleure concordance comparé modèle pseudo premier ordre.

L'adsorption rapide au départ est liée à la diffusion des molécules vers la surface (ou bien l'interface). Cette étape est ensuite suivie par l'adsorption dans les pores.

L'étude de la cinétique de diffusion intraparticulaire par le modèle Weber-Morris montre que les droites tracées ne passent pas par l'origine, ce qui démontre que la diffusion du Lysozyme dans les pores des MIPs n'est pas le seul mécanisme qui contrôle la cinétique de sorption.

Les valeurs de la constante de diffusion du film, la vitesse initiale d'adsorption ( $h$ ) et le temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) de l'adsorption confirment que l'adsorption est un processus rapide, en particulier au début de la période de contact.

L'étude thermodynamique nous a permis de déterminer l'enthalpie standard, l'enthalpie libre et l'entropie. Le signe négatif de l'enthalpie libre ( $\Delta G < 0$ ) et l'enthalpie standard signifie que le processus est respectivement spontané et exothermique.

À partir des résultats obtenus, nous pouvons dire que ce travail montre la simplicité et l'efficacité de la méthode photoiniferter pour produire particules PVC-MIP biomimétiques pour l'adsorption sélective et la détection rapide de protéines.

## Conclusion générale

---

Ce travail montre, aussi, l'intérêt des MIPs, en général, pour la capture des protéines notamment quand ils sont fabriqués sous forme de films minces pour développer des systèmes de détection rapides.

# *RÉSUMÉS*

# تحضير ودراسة بوليمرات ذات بصمة جزيئية لاستخلاص البروتينات

## ملخص

بسبب الإنتقائية العالية للجزيئات المستهدفة، حظيت تقنيات الفصل المرتكزة على التعرف الجزيئي على الكثير من الاهتمام في ميدانَي الكيمياء والبيولوجيا. في هذا المجال، البوليميرات المطبوعة جزيئيا (MIPs) شهدت تطورا ملحوظا في السنوات الأخيرة بالأخص عند استعمالها كطبقات رقيقة.

الطبقات الرقيقة للبوليميرات المطبوعة جزيئيا أُعدت بطريقة (Photoiniferter) على سطح جزيئات (PVC) وهذا لاستعمالها في عملية الادمصاص الانتقائي لمادة الليزوزيم (Lysozyme) باعتبارها النموذج المستعمل. لقد تمّ اختيار الأكريلاميد (Acrylamide) كمونمر وظيفي ومادة ميثلين ثنائي أكريل الأميد (N,N-methylenebisacrylamide) كعامل تشابك بوجود المبادر (Iniferter).

تم تحليل المراحل المختلفة للتحضير بواسطة تقنيات التحليل المختلفة التالية : الطيفية (XPS) والتحليل الطيفي الأشعة تحت الحمراء (FTIR) والتحليل الطيفي رامان (Raman) و المجهر الإلكتروني (MEB).

بعد استخلاص الليزوزيم من البوليمر المحضر و المحتوي على بصمات جزيئية تم دراسة خصوصية البوليمر مطبوع (PVC-MIP) والغير مطبوع جزيئيا (PVC-NIP) وانتقائية هذا البولمر المحضر لمادة الليزوزيم باستعمال بروتينين تنافسيين آخرين هما مادتي السيوكروم (cytochrome) و الميوغلوبين (myoglobin) كما يتم استعمال هذا الأخير كمستقبل اصطناعي لمادة الليزوزيم.

يتمحور هذا العمل حول أهمية الـ (Photoiniferter) كوسيلة فعالة لتصميم بوليميرات مطبوعة جزيئيا (MIP) من أجل الإزالة السريعة والانتقائية للبروتينات.

**الكلمات المفتاحية:** فصل البروتينات ، بلمرة ضوئية ، بصمة جزيئية و PVC.

## **Preparation and study of molecular imprinted polymers for extraction of proteins**

### **Abstract**

Separation techniques based on molecular recognition have received much attention in chemistry and biology due to their high selectivity for target molecules. In this area, molecularly imprinted polymers (MIPs) have experienced considerable growth in recent years, particularly when they are prepared as thin films

Ultrathin films of molecularly imprinted polymer were prepared by photoiniferter on PVC beads for the selective uptake of lysozyme, taken as a model protein. Acrylamide was selected as the functional monomer and N,N-methylenebisacrylamide as the crosslinking agent. The copolymerization process was confined to the surface of the PVC beads grafted with diethyldithiocarbamate iniferter initiator in the presence of lysozyme. After extraction of lysozyme from the shell of the PVC-MIP beads, the latter were then used as artificial receptors for the rebinding of lysozyme. The sequential steps of the modification of PVC beads were monitored by XPS, infrared and Raman spectroscopies.

The imprinting step was found to be essential as the PVC-MIP beads could recognize lysozyme but not the nonimprinted beads (PVC-NIP). The binding properties of PVC-MIP beads were determined using UV spectroscopy from adsorption isotherms of lysozyme, cytochrome, and myoglobin. The imprinted beads were found to be highly selective toward lysozyme over the competitive proteins. This work shows the interest of photoiniferter as an efficient mean for the design of molecularly imprinted polymer beads for rapid, selective removal of proteins.

**Keywords:** molecular imprinting ; photopolymerization; poly(vinyl chloride); proteins

## Résumé

Les techniques séparatives basées sur la reconnaissance moléculaire ont reçu beaucoup d'attention dans la chimie et la biologie en raison de leur grande sélectivité pour les molécules cibles. Dans ce domaine les polymères à empreintes moléculaires (MIPs) ont connu ces dernières années un essor considérable, notamment quand ils sont fabriqués sous forme de film mince.

L'objectif de cette étude est de préparer des couches minces de MIPs sur des supports granuleux de PVC pour la séparation de lysozyme. L'acrylamide (AA) a été choisi comme monomère fonctionnel et le N,N, méthylène bis-acrylamide (MBAA) comme réticulant ; ils interagissent tous deux avec la molécule cible pour former un complexe à l'étape de prépolymérisation. Afin de confiner la polymérisation en surface des grains, nous avons greffé l'amorceur iniferter (diéthylthiocarbamate de sodium, DEDTC) à la surface des billes de PVC. Nous avons obtenu des grains core/shell PVC/MIP ayant dans la coquille des protéines immobilisées qui après extraction laissent des empreintes moléculaires qui sont ensuite employés comme récepteurs artificiels pour la re-capture du lysozyme. En absence de cette protéine, nous avons préparé des revêtements non imprimés PVC/NIP. Nous avons démontré, par XPS et par infrarouge, que le PVC est bien couvert d'une couche mince de MIP, qui elle-même renferme le lysozyme avant son extraction. La reconnaissance moléculaire du lysozyme par les grains PVC/MIP est spécifique et sélective du lysozyme (étude par UV-visible).

Ce travail montre l'intérêt des MIPs en général pour la capture des protéines mais souligne l'intérêt majeur de produire ces matériaux biomimétiques sous forme de couches minces pour développer des systèmes de détection rapides.

**Mots clés :** Empreintes moléculaires ; séparation des protéines ; photopolymérisation ; billes de PVC ; Iniferter.