

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

AgroSupDijon
(Procédés Alimentaires et Physico-chimie)

École doctorale «Environnements - Santé» (E-S)

THÈSE

Pour obtenir le grade

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : **Sciences des aliments (Chimie)**

Par

Manal Bitar

Le 2 avril 2014

Design d'un iprodione-MIP (molecularly imprinted polymer).

Application à la pré-concentration des fongicides dans le vin

Directeur de thèse : **Pr. Philippe CAYOT**

Co-directeur de thèse : **Dr. Elias BOU-MAROUN**

Devant le jury composé de :

Eric MARCHIONI	Professeur, Université de Strasbourg	Rapporteur
Rosette OUAINI	Professeur, Université Libanaise	Rapporteur
Marcel BOUVET	Professeur, Université de Bourgogne	Examineur
Jacqueline MAALOULY	Maître de conférences, Université Libanaise	Examineur
Philippe CAYOT	Professeur, Université de Bourgogne	Directeur
Elias BOU-MAROUN	Maître de conférences, Université de Bourgogne	Co-directeur

AVANT PROPOS

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'équipe PAPC (procédés alimentaires et physico-chimie), Agrosup Dijon, Université de Bourgogne, sous la direction du professeur Monsieur Philippe CAYOT et le co-encadrement du docteur Elias BOU-MAROUN en collaboration avec le CNRS libanais (Conseil National de la Recherche Scientifique, Liban)

Ce travail a fait l'objet de :

➤ **Dépôt d'un brevet national**

E. Bou-Maroun, M. Bitar, P. Cayot. Université de Bourgogne, Agrosup Dijon, CNRS libanais. Utilisation d'un polymère à empreintes moléculaires pour piéger l'iprodione en milieu aqueux, 8 novembre 2013.

➤ **Publication dans le journal « analytical methods »**

M. Bitar, P. Cayot, E. Bou-Maroun. Molecularly imprinted polymers solid phase extraction of fungicides from wine samples, juin 2014.

➤ **Communication orale dans un congrès national**

M. Bitar, E. Bou-Maroun, P. Cayot. Synthèse de polymères à empreintes moléculaires pour l'analyse des composés toxiques dans les aliments. Exemple des pesticides dans le vin. Forum jeunes chercheurs FJC. Dijon, 6-7 septembre 2012.

➤ **Communication par affiches dans un congrès international**

M. Bitar, E. Bou-Maroun, P. Cayot. Molecularly imprinted polymers for the removal of iprodione from wine: experimental design and synthesis optimization. 7th International Conference on Molecularly Imprinted Polymers - Science and Technology, MIP 2012. Paris, 27-30 août 2012.

REMERCIEMENTS

Un travail de thèse ne peut être accompli sans le soutien et la confiance d'un grand nombre de personnes. Je tiens à les remercier tous chaleureusement car c'est grâce à leur aide précieuse que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je tiens premièrement à remercier les deux personnes qui ont bien voulu diriger mon travail Pr. Philippe Cayot et Dr Elias Bou-Maroun. Je suis ravie d'avoir travaillé en leur compagnie car outre leur appui scientifique, ils ont toujours été là pour me soutenir et me conseiller. Je vous remercie pour vos qualités humaines et relationnelles.

Je tiens à te remercier Philippe pour tes remarques pertinentes sur mes travaux ainsi que tes encouragements. J'aimerais t'adresser mes plus sincères remerciements surtout pour ta rigueur scientifique, pour m'avoir poussée à toujours donner le meilleur de moi-même, pour avoir apporté à cette thèse d'ingénieuses innovations et pour avoir investi tes compétences dans ce projet. Peu de personnes « racontent » comme toi la science en donnant le plaisir de l'écoute.

Je t'adresse un remerciement particulier Elias pour le suivi attentif de mes travaux, pour ton exigence, et ta patience sans oublier ta grande disponibilité. Merci pour m'avoir toujours écoutée, soutenue et n'avoir eu de cesse de m'encourager à suivre mon objectif. Je te remercie pour m'avoir soutenue pendant la rédaction de ce manuscrit et m'avoir guidée pour améliorer la qualité de mon écriture.

Cette thèse présente mes travaux de recherche effectués au Laboratoire PAPC (ex EMMA), je remercie ses directeurs successifs Pr. Philippe Cayot, directeur de l'équipe EMMA, et Pr. Rémi Saurel, directeur de l'équipe PAPC, pour m'avoir accueillie.

Je tiens à remercier tous les membres du Jury d'avoir accepté de participer à la soutenance de cette thèse et de s'être acquittés de cette tâche dans la bonne humeur.

Je remercie Pr. Rosette Ouaini et Pr. Eric Marchioni d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et pour l'attention qu'ils y ont consacrée ainsi que pour leurs précieuses remarques. Je leur adresse ma profonde gratitude.

Je suis très honorée que Pr. Marcel Bouvet ait accepté de présider mon jury de thèse. Qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance et de tous mes remerciements.

Je tiens à remercier Dr Jacqueline Maalouly d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse, je lui suis également reconnaissante d'avoir bien guidé mes premiers pas dans le domaine de la recherche pendant mon Master 2 à l'université libanaise-FSII.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'aide de la région de Bourgogne qui a financé le projet et du CNRS libanais qui, au travers de la bourse qu'il m'a attribuée, a reconnu mon travail et m'a fait confiance.

Je n'oublie pas de remercier Pr. Naim ouaini et Dr Charles Tabet, je leur suis reconnaissante pour l'opportunité qu'ils m'ont offerte, en espérant que j'en étais à la hauteur.

Je souhaite remercier très chaleureusement Pr. Hanna chebib. Il est difficile de trouver des qualificatifs assez forts pour décrire sa gentillesse et sa patience à prodiguer des conseils pertinents. Je lui adresse mon profond respect.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude envers les membres permanents de l'équipe PAPC de leurs aides pour valoriser mon travail. Je remercie particulièrement Pr. Régis Gougeon, Dr Adrien Lerbret, Dr Gaëlle Roudaut, Dr Christian Coelho, Pr. Dominique Champion, Dr Camille Loupiac et Céline Lafarge. Nous avons échangé sur les différents résultats de mes travaux. Je tiens sincèrement à leur témoigner ma gratitude, ils m'ont fait bénéficier de leurs expériences en matière de recherche.

Ces travaux n'auraient pas été complets sans les collaborations avec Dr Jesus Raya de l'université de Strasbourg (où les expériences de RMN des solides ont été effectuées) et avec Pr. Vincent Verney de l'université Blaise Pascal-Clermont Ferrand (pour la partie photorhéologie in situ). Je leur exprime ma reconnaissance pour le temps qu'ils ont consacré pour ces expériences.

Je remercie Bernadette Rollin pour l'aide qu'elle m'a apportée dans les aspects pratiques de mon travail et pour sa gentillesse à mon égard. Je remercie également Alexandra Da Silva qui ne cesse d'être souriante et formidable.

Je remercie particulièrement tous les doctorants, post-doc et stagiaires, qui étaient plus que collègues de travail, pour leur soutien moral, leur sympathie et leur amitié. Nous avons partagé de nombreux bons moments. Je pense notamment à Coralie, Lucie, Koi, Emilie, Claire, Leila, Alison et Fleur-Anne.

Last but not least, je remercie Amal (la meilleure cousine qu'on puisse avoir), Eliana (pour son optimisme toujours rassurant), Fernanda (obrigada amiga!), Darina (благодаря), Lea (danke), Rana (pour son sourire et sa sympathie permanents), l'adorable trio Georges, Patrick et Elie, Fatima (pour son humour), Oussama (un merci particulier de m'avoir soutenue et encouragée et surtout supportée pendant ces longs mois de rédaction), et bien sûr mes amies Lama, Rita, Sandra, Abir, Mireille, Rim, Chaza, Carole, et Narimane.

Enfin, je souhaite remercier ma famille pour son soutien sans faille. Il m'est impossible de trouver des mots pour dire à quel point je suis fière d'eux, et à quel point je les aime. Cette thèse qui est un aboutissement de longues années d'études, je la dois beaucoup à mon frère Fadi et à mes parents exceptionnels avec qui j'ai vécu dans un climat toujours serein. Vous êtes la joie qui me donne toujours l'instimable. Il est finalement plus facile d'écrire sur les « MIPs » que de témoigner en quelques lignes de toute l'affection et l'amour pour vous. Ce travail modeste vous est dédié...

RESUME

Les travaux de thèse ont porté sur la synthèse d'un MIP (polymère à empreintes moléculaires) spécifique d'un fongicide se trouvant dans la majorité des vins français : l'iprodione. Pour extraire l'iprodione à partir du vin, un challenge important se présentait : le milieu hydroalcoolique est un solvant dipolaire alors que l'interaction du MIP avec l'iprodione se base sur des interactions dipôle-dipôle. Les premières études d'extraction de l'iprodione ont été faites sur un MIP obtenu par polymérisation en masse à partir du méthacrylamide et de l'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA). Le MIP était plus efficace que le NIP (polymère non imprimé) dans des solutions hydroalcooliques ce qui vérifie que l'impression moléculaire était réussie. Un plan d'expériences 2^3 a été appliqué pour étudier l'influence de 3 facteurs de synthèse de MIP (la méthode de polymérisation, la nature de l'agent réticulant et le type de monomère fonctionnel) sur les propriétés de reconnaissance des polymères vis-à-vis de l'iprodione. 8 MIP et 8 NIP ont été ainsi synthétisés. Les isothermes d'adsorption de l'eau et de l'iprodione par les MIPs et les NIPs ont été déterminées. Des différences significatives entre les polymères ont été mises en évidence impliquant une relation entre l'adsorption de l'eau et l'adsorption de l'iprodione. La formation des empreintes moléculaires au sein des MIP a été démontrée par plusieurs techniques comme la calorimétrie différentielle à balayage et la résonance magnétique nucléaire. Les meilleures propriétés de reconnaissance de l'iprodione sont obtenues avec le MIP synthétisé par précipitation à partir du méthacrylamide comme monomère fonctionnel et de l'EGDMA comme réticulant. Ce MIP a été utilisé en extraction en phase solide (SPE) pour la pré-concentration de l'iprodione dans un vin blanc avec un facteur de pré-concentration égal à 6 et sa sélectivité par rapport à deux fongicides : le pyriméthanil et le procymidone a été démontrée.

Mots-clés: MIP, iprodione, pesticides, vin, isothermes d'adsorption, plan d'expériences, MISPE, absorption de l'eau.

ABSTRACT

The aim of this study was the synthesis of a MIP (molecularly imprinted polymer) specific for a fungicide that is found in the majority of the french wine: iprodione. The challenge for extracting iprodione from wine medium was that the hydoralcoholic solution is a dipolar solvent, whereas the interaction between the MIP and iprodione is based on dipolar interactions. The first extraction study of iprodione was made on a MIP synthesized by bulk polymerization using methacrylamide and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA). The MIP was found to be more efficient than the NIP (non-imprinted polymer) in hydroalcoholic solutions which demonstrates that the molecular imprinting was successful. Then we synthesized 8 MIPs and 8 NIPs following an 2^3 experimental design in order to study the influence of three synthesis factors (the polymerization method, the nature of the crosslinker and the type of the functional monomer) on the iprodione recognition properties of the polymers. The water and the iprodione adsorption isotherms for MIPs and NIPs were determined. The result showed significant differences between the polymers involving a relationship between the water adsorption and the adsorption of iprodione. The molecular imprinting has been demonstrated by several techniques such as the differential scanning calorimetry and the nuclear magnetic resonance. The best recognition properties of iprodione are obtained with the MIP which was synthesized by precipitation polymerization using methacrylamide as functional monomer and EGDMA as crosslinker. This MIP was used in solid phase extraction (SPE) for pre-concentration of iprodione in a white wine with a pre-concentration factor of 6. Its selectivity versus two fungicides: procymidone and pyrimethanil has been demonstrated.

Keywords: MIP, iprodione, pesticides, wine, sorption isotherms, experimental design, MISPE, water sorption.

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS.....	I
REMERCIEMENTS	I
RESUME	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIERES	V
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIV
LISTE DES ABREVIATIONS ET DES ACRONYMES	XV
PARTIE 1.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
1 INTRODUCTION ET PROBLEMATIQUE.....	2
2 LES APPLICATIONS DES MIPS.....	5
3 SYNTHESE DES MIP.....	6
3.1 CONDITIONS DE POLYMERISATION	7
3.2 REACTIFS	7
3.2.1 <i>Molécule empreinte</i>	8
3.2.2 <i>Monomère fonctionnel</i>	9
3.2.3 <i>Solvant porogène</i>	12
3.2.4 <i>Agent réticulant</i>	13
3.2.5 <i>Initiateur de polymérisation</i>	16
3.3 APPROCHES.....	17
3.3.1 <i>Synthèse par voie covalente</i>	18
3.3.2 <i>Synthèse par voie non covalente</i>	19
3.3.3 <i>Synthèse par voie semi covalente</i>	21
3.4 METHODES DE PREPARATION	23
3.4.1 <i>Polymérisation en masse</i>	24
3.4.2 <i>Polymérisation par précipitation</i>	26
3.4.3 <i>Polymérisation multi-étapes</i>	26
3.4.4 <i>Polymérisation en suspension</i>	27

3.4.5	<i>Polymérisation par émulsion « core shell »</i>	28
3.4.6	<i>Polymérisation par synthèse d'un monolithe in situ</i>	28
3.4.7	<i>Polymérisation et impression sur surface</i>	29
4	CARACTERISATION DES MIP FORMES : STRUCTURE, APTITUDES SEPARATIVES...	30
4.1	MISE EN EVIDENCE DE LA FORMATION D'EMPREINTES	30
4.2	POROSITE, SURFACE SPECIFIQUE	32
5	PESTICIDES	33
5.1	TOXICITE	33
5.2	METHODES DE QUANTIFICATION	34
	PARTIE 2	35
	MATERIELS ET METHODES	35
1	SYNTHESE	36
1.1	CHOIX DE LA MOLECULE EMPREINTE	36
1.2	DPPH* (2,2-DIPHENYL-1-PICRYLHYDROZYL)	36
1.3	CHOIX DU MONOMERE FONCTIONNEL : MODELISATION MOLECULAIRE	37
1.4	SYNTHESE DES POLYMERES A EMPREINTES MOLECULAIRES	38
1.4.1	<i>Synthèse du premier iprodione-MIP</i>	38
1.4.2	<i>Plan d'expériences</i>	40
2	ETUDES D'EXTRACTION	43
2.1	CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (<i>HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY HPLC</i>)	43
2.2	ETUDES D'EXTRACTION EN BATCH ET ISOTHERMES D'ADSORPTION	44
2.3	CARACTERISATION DE L'EXTRACTION DE L'IPRODIONE PAR DES MODELES D'ISOTHERMES	45
2.3.1	<i>Isotherme de Langmuir</i>	45
2.3.2	<i>Isothermes de Freundlich et distribution d'affinité</i>	47
3	TECHNIQUES ARACTERISATION	48
3.1	MOYEN INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER (<i>FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY FTIR</i>)	48
3.2	ANALYSE VOLUMETRIQUE	49
3.3	RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN) DU SOLIDE ; CPMAS (CROSS POLARISATION MAGIC ANGLE SPINNING, POLARISATION CROISEE ET ROTATION A L'ANGLE MAGIQUE)	51
3.4	CALORIMETRIE DIFFERENTIELLE A BALAYAGE (<i>DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY DSC</i>)	53
3.4.1	<i>Principe</i>	53
3.4.2	<i>Appareillage</i>	53

3.5	PHOTO-RHEOLOGIE : SUIVI IN-SITU DE LA PHOTO-POLYMERISATION RADICALE DES MIPs ET DES NIPs.....	54
4	APPLICATION : EXTRACTION EN PHASE SOLIDE A L'AIDE DE CARTOUCHE OU MISPE (MOLECULARLY IMPRINTED SOLID PHASE EXTRACTION).....	56
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	58
	PARTIE 3.....	64
	RESULTATS ET DISCUSSION	64
	CHAPITRE 1 SYNTHÈSE D'UN POLYMER A EMPREINTES MOLECULAIRES SPECIFIQUE D'UN FONGICIDE, L'IPRODIONE ET ETUDE DE SES PROPRIETES DE RECONNAISSANCE DANS UN MILIEU HYDROALCOOLIQUE ET DANS LE VIN	65
1	INTRODUCTION.....	66
2	ARTICLE 1 BINDING CHARACTERISTICS OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER FOR IPRDIONE FUNGICIDE BASED ON DIPOLE-DIPOLE INTERACTIONS IN HYDROALCOHOLIC MEDIA.....	67
2.1	ABSTRACT	67
2.2	INTRODUCTION	68
2.3	EXPERIMENTAL SECTION	70
2.3.1	<i>Chemicals.....</i>	<i>70</i>
2.3.2	<i>Molecular simulation.....</i>	<i>71</i>
2.3.3	<i>Analysis equipment</i>	<i>73</i>
2.4	POLYMER PREPARATION	73
2.4.1	<i>Synthesis.....</i>	<i>73</i>
2.4.2	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrozyl test.....</i>	<i>73</i>
2.4.3	<i>Evaluation of the iprodione-MIP by batch rebinding experiments.....</i>	<i>74</i>
2.4.4	<i>Characterization of the iprodione-MIP using adsorption models.....</i>	<i>74</i>
2.4.5	<i>Application of MISPE method to white wine samples</i>	<i>77</i>
2.5	RESULTS AND DISCUSSION	78
2.5.1	<i>Preliminary analysis: choice of monomer owing to molecular simulation.....</i>	<i>78</i>
2.5.2	<i>Analysis of binding properties in the discrete distribution model: Langmuir isotherm</i>	<i>79</i>
2.5.3	<i>Analysis of binding properties in the continuous distribution model: FI AD.....</i>	<i>82</i>
2.5.4	<i>Analysis of binding properties in the Dubinin-Radushkevich model.....</i>	<i>83</i>
2.5.5	<i>Interpretation of kinetic results.....</i>	<i>83</i>
2.5.6	<i>Application of MISPE in real samples: white wine.....</i>	<i>85</i>
2.6	CONCLUSION	87
3	DONNEES SUPPLEMENTAIRES.....	88

3.1	VERIFICATION DE LA NON-PARTICIPATION DE LA MOLECULE EMPREINTE A LA SYNTHÈSE : TEST AU DPPH.....	88
3.2	MOYEN INFRAROUGE A TRANSFORMÉE DE FOURIER (<i>FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY FTIR</i>).....	89
4	REFERENCES.....	91
CHAPITRE 2 ETUDE PAR PLAN D'EXPERIENCES DE L'INFLUENCE DES PARAMETRES DE LA SYNTHÈSE SUR LES PROPRIETES DE RECONNAISSANCE D'UN IPRODIONE-MIP ET CHOIX DU POLYMERE OPTIMAL SPECIFIQUE DE L'IPRODIONE DANS UN MILIEU HYDROALCOOLIQUE.....		
93		
1	INTRODUCTION.....	94
2	ARTICLE 2 : EXPERIMENTAL DESIGN APPROACH IN THE SYNTHESIS OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS SPECIFIC FOR IPRODIONE.....	96
2.1	ABSTRACT.....	97
2.2	INTRODUCTION.....	97
2.3	MATERIALS AND METHODS.....	100
2.3.1	<i>Chemicals.....</i>	<i>100</i>
2.3.2	<i>Polymers preparation.....</i>	<i>100</i>
2.3.3	<i>Instrumentation.....</i>	<i>102</i>
2.3.4	<i>Rebinding experiments and response parameters.....</i>	<i>103</i>
2.3.5	<i>Molecular dynamic simulations.....</i>	<i>104</i>
2.3.6	<i>Molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE).....</i>	<i>105</i>
2.4	RESULTS AND DISCUSSION.....	105
2.4.1	<i>Rebinding experiments and response parameters.....</i>	<i>105</i>
2.4.2	<i>The factors effects on the response parameters.....</i>	<i>107</i>
2.4.3	<i>Application of the optimal MIP to enrichment purpose on real samples.....</i>	<i>113</i>
2.5	CONCLUSION.....	116
3	DONNEES SUPPLEMENTAIRES.....	116
3.1	PHOTO-RHEOLOGIE : SUIVI IN-SITU DE LA PHOTO-POLYMERISATION RADICALAIRE DES MIPs ET DES NIPs.....	117
3.2	ANALYSE VOLUMETRIQUE : POROSITE ET SURFACE SPECIFIQUE.....	120
3.3	RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN) ; LA SPECTROMETRIE RMN DU SOLIDE CPMAS (<i>CROSS POLARISATION MAGIC ANGLE SPINNING, POLARISATION CROISEE ET ROTATION A L'ANGLE MAGIQUE</i>).....	121
4	REFERENCES.....	127
CHAPITRE 3.....		
130		
ISOTHERMES D'ADSORPTION DE L'EAU SUR LES MIPs.		
130		
RELATIONS ENTRE LA CAPACITE D'ADSORPTION DE L'EAU ET DE LA MOLECULE EMPREINTE.....		
130		

1	INTRODUCTION.....	131
2	ARTICLE 3: WATER SORPTION ISOTHERMS OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS. RELATION BETWEEN WATER BINDING AND IPRODIONE BINDING CAPACITY OF MIP.....	131
2.1	ABSTRACT.....	131
2.2	INTRODUCTION.....	132
2.3	MATERIALS AND METHODS.....	134
2.3.1	<i>Chemicals.....</i>	<i>134</i>
2.3.2	<i>Preparation of the polymers.....</i>	<i>134</i>
2.3.3	<i>Instrumentation.....</i>	<i>137</i>
2.3.4	<i>Water sorption experiments.....</i>	<i>137</i>
2.4	RESULTS AND DISCUSSION.....	138
2.4.1	<i>Sorption kinetics.....</i>	<i>138</i>
2.4.2	<i>Adsorption isotherms.....</i>	<i>141</i>
2.5	CONCLUSION.....	144
3	REFERENCES.....	145
	CHAPITRE 4.....	147
	APPLICATION DES MIPS POUR LA PRE-CONCENTRATION DE L'IPRODIONE DANS LE VIN.....	147
	EXEMPLE: MISPE (MOLECULARLY IMPRINTED SOLID PHASE EXTRACTION).....	147
1	INTRODUCTION.....	148
2	ARTICLE 4: MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS SOLID PHASE EXTRACTION OF FUNGICIDES FROM WINE SAMPLES.....	148
2.1	ABSTRACT.....	148
2.2	INTRODUCTION.....	149
2.3	EXPERIMENTAL SECTION.....	151
2.3.1	<i>Reagents and solutions.....</i>	<i>151</i>
2.3.2	<i>Polymers preparation.....</i>	<i>151</i>
2.3.3	<i>High performance liquid chromatography (HPLC).....</i>	<i>152</i>
2.3.4	<i>Batch experiments.....</i>	<i>152</i>
2.3.5	<i>Molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE).....</i>	<i>152</i>
2.4	RESULTS AND DISCUSSION.....	153
2.4.1	<i>Adsorption isotherm.....</i>	<i>153</i>
2.4.2	<i>Optimization of MISPE on white wine sample.....</i>	<i>155</i>
2.5	CONCLUSION.....	161

3	DONNEES SUPPLEMENTAIRES : CALORIMETRIE DIFFERENTIELLE A BALAYAGE (DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY DSC).....	161
4	REFERENCES.....	166
	PARTIE 4.....	168
	CONCLUSTION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	168
	ANNEXES.....	174

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Principe de formation d'une empreinte moléculaire.....	4
Figure 2 Structure chimique des monomères fonctionnels utilisés dans l'impression moléculaire non covalente	10
Figure 3 Structures chimiques des agents réticulants les plus couramment utilisés pour la synthèse d'un MIP	15
Figure 4 Réaction de décomposition radicalaire du 2,2'-diméthyl-2-phénylacétophénone.....	17
Figure 5 Représentation schématique de l'approche semi-covalente utilisée par P. Qi et al (Qi et al., 2010) (a) Synthèse de la molécule empreinte (b) Préparation du MIP spécifique au 4-chlorophénol.....	22
Figure 6 Représentation schématique du processus d'impression montrant quelques interactions utilisées pour créer une affinité pour la molécule empreinte dans les sites de reconnaissance. Les interactions avec les motifs (a–d) de la molécule empreinte représentent les stratégies : (a) non-covalente; (b) covalente réversible; (c) semi-covalente; (d) interactions électrostatiques avec un monomère de charge opposée.....	23
Figure 7 Représentation schématique de quelques méthodes de préparation des MIPs et des particules obtenues (Pérez-Moral & Mayes, 2004).	24
Figure 8 Schéma représentatif des étapes de synthèse d'un MIP par polymérisation en masse.	25
Figure 9 synthèse d'un MIP pour la théophylline par immobilisation de la molécule cible sur un support en silice (Yilmaz et al., 2000).	29
Figure 10 Schéma résumant les étapes de synthèse d'un polymère à empreintes moléculaires spécifique de l'iprodione à partir du méthacrylamide comme monomère fonctionnel, de l'éthylène glycol diméthacrylate comme agent réticulant, par initiation photochimique avec le 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone (DMPAP), et élimination de l'iprodione donnant lieu à des sites de faible affinité et des sites de forte affinité.	40
Figure 11 Les étapes de l'extraction en batch et le tracé des isothermes d'adsorption de la molécule cible par le MIP et le NIP.	45
Figure 12 Tracés de Scatchard pour un polymère imprimé contenant des sites d'interaction homogènes (a) et pour un polymère imprimé contenant de sites d'interaction hétérogènes (b) (Curcio, 2009).....	46
Figure 13 (a) Le bloc calorimétrique du micro DSC III et (b) la cellule batch.	54
Figure 14 The structure of the template and the functional monomers included in the virtual library and used in the computer simulation.....	72

Figure 15 Typical complexes formed between iprodione and methacrylamide in the MD simulations. Hydrogen bonds are shown as dashed yellow lines. For clarity, toluene solvent molecules are omitted as well as the methacrylamide molecules lying outside the coordination shell of iprodione.....	79
Figure 16 (A) Scatchard plot for (a) iprodione-MIP and (b) iprodione-NIP, (B) Experimental isotherms and Freundlich fits for iprodione imprinted MIP and non-imprinted NIP polymers, (C) Affinity distributions based on the Freundlich model plotted in log format and (D) Kinetic adsorption curves of iprodione on MIP and NIP in ethanol/water (50/50 v/v) at 25 °C. [iprodione] = 10 ⁻³ M.....	81
Figure 17 Adsorbed and recovered amount of iprodione after the washing step and the elution step from SPE columns packed with MIP (MISPE) and with NIP (NISPE), (B) Chromatograms of: the wine sample spiked with iprodione (wine) and eluting solutions from MISPE (EMIP) and NISPE (ENIP).	86
Figure 18 Suivi de la densité optique à 515 nm des mélanges DPPH-iprodione dans l'acétate d'éthyle (DO stable), et des mélanges de référence DPPH-BHT dans l'acétate d'éthyle et l'isooctane (décroissance de la DO).....	89
Figure 19 Spectres Infra-Rouge du MIP et du NIP	90
Figure 20 . Charts of the effects of (a) Y1= N; (b) Y2 = K and (c) Y3 = IF. The dashed lines show the results of the statistical significance study for each estimate (standard deviation).	108
Figure 21 Second order interaction X1*X2*X3 for the sites number (a and b), the affinity constant (c and d) and the imprinting factor (e and f) when the factor X3 is fixed at bulk polymerization (left charts) and precipitation polymerization (right charts).....	110
Figure 22 Examples of pre-polymerization complexes (a) where iprodione interacts with 2 MAM molecules by hydrogen bonding interactions (blue broken lines) and 1 styrene by a T-shaped π - π interaction, and (b) where iprodione forms hydrogen bonds only with 2 MAM molecules because of the toluene solvent molecule that prevents styrene from interacting with iprodione. The other functional monomers and toluene molecules from the simulation box are not shown for clarity.....	111
Figure 23 Adsorbed and recovered amount of iprodione after the washing step from SPE columns packed with MIP and with NIP.	114
Figure 24 Recovered quantity of iprodione after the elution step with different proportions of aqueous ethanol solutions.	115
Figure 25 schéma représentant la variation du module de conservation G' des polymères MIP1, MIP2 et MIP6 en fonction du temps de photopolymérisation in situ.....	117
Figure 26 Régression linéaire permettant la détermination de G'∞. G'∞ (MIP1) = 1.53E ⁺⁰⁷ , G'∞ (NIP1) = 2.69E ⁺⁰⁷ , G'∞ (MIP2) = 4.45E ⁺⁰⁸ et G'∞ (NIP2) = 1.30E ⁺⁰⁷	118
Figure 27 Les modules de conservation G'∞ des différents polymères. Cette valeur est différente suivant les polymères et entre un polymère imprimé et son homologue non imprimé.	119
Figure 28 Les isothermes d'adsorption/desorption d'azote du MIP6 et du MIP7.....	121
Figure 29 Spectre RMN CP-MAS du carbone ¹³ C du MIP6 non lavé.	122

Figure 30 Représentation schématique d'une partie du MIP6 non lavé dont la cavité contient la molécule empreinte (l'iprodione).....	123
Figure 31 Superposition des spectres RMN du ¹³ C du MIP6 non lavé (rouge) et après recapture de l'iprodione (bleu).	124
Figure 32 Spectre RMN 2D HETCOR ¹² C- ¹ H du MIP6 non lavé.	125
Figure 33 Spectre RMN 2D HETCOR ¹² C- ¹ H du MIP6 après recapture de l'iprodione.	126
Figure 34 Water sorption kinetic curves at 25 °C for several MIP and NIPs.....	138
Figure 35 The kinetic curves representing the polymers having the highest and the lowest capacities at a _w 0.85.....	139
Figure 36 Representation of water molecule adsorbed on a MIP: in the specific and non-specific sites.	143
Figure 37 Adsorption isotherms of iprodione on MIPb, NIPb, MIPp and NIPp in ethanol/water (50/50, v/ v).	154
Figure 38 a) Adsorbed and recovered amount of iprodione after the washing step and the elution step (with acetonitrile) from MISPE _p and NISPE _p columns and b) the recoveries of eluted iprodione obtained on the MISPE _p after eluting iprodione with different elution solvents; ACN= acetonitrile	156
Figure 39 Adsorbed and recovered amount of iprodione after the washing step and the elution step (with acetonitrile) from MISPE _b and NISPE _b cartridges.....	158
Figure 40 The chemical structures of the fungicides: Iprodione, pyrimethanil and procymidone.	159
Figure 41 Overlay of chromatograms of : a white wine solution spiked with three fungicides : (1) pyrimethanil, (2) iprodione and (3) procymidone and the eluted solutions from the MISPE _b (MIP _b) and NISPE _b (NIP _b).....	160
Figure 42 Overlay of chromatograms of: a white wine solution spiked with three fungicides : (1) pyrimethanil, (2) iprodione and (3) procymidone and the eluted solutions from the MISPE _p (MIP _p) and NISPE _p (NIP _p).....	160
Figure 43 Spectre DSC du mélange MIP2-solution d'iprodione.....	162
Figure 44 Spectre DSC du mélange NIP2-solution d'iprodione.....	163
Figure 45 Spectre DSC du mélange MIP6-solution d'iprodione.....	164
Figure 46 Spectres DSC du mélange NIP6-solution d'iprodione	165
Figure 47 Schéma représentant les différentes conclusions de la thèse.	172

LISTE DES TABLEAUX

Table 1 Mean number of functional monomers found in the coordination shell of iprodione, averaged over either the whole MD simulations or over only the last ns of the simulations.....	78
Table 2 Pseudo-first order parameters and correlation coefficients for the adsorption of iprodione on MIP and NIP at 25 °C.	84
Table 3 Pseudo-second order parameters and correlation coefficients for the adsorption of iprodione on MIP and NIP at 25 °C.	84
Table 4 Coded levels and corresponding physical values of the 2 ³ factorial experimental design.....	101
Table 5 Overview of the experimental design results–responses: N, K and IF, from variation of the selected factors: C, FM and PM.....	105
Table 6 The Freundlich parameters of the MIPs and the corresponding regression coefficient.	107
Table 7 Mean number of functional monomers, N, found in the coordination shell of iprodione in the MD simulations. A given functional monomer was considered to belong to the coordination shell of iprodione if either: (1) at least one hydrophilic atom (oxygen or nitrogen) of the monomer was within 3.5 Å of one hydrophilic atom of iprodione, or (2) a heavy atom of the monomer was within 4.5 Å of a carbon or a chloride atom of iprodione. Means and standard deviations from the means were determined from three independent MD simulations.....	113
Tableau 8 Données volumétriques des polymères : MIP6, NIP6, MIP7 et NIP7.....	120
Table 9 Coded levels and corresponding physical values of the 2 ⁴ factorial experimental design.....	135
Table 10 Overview of the 2 ⁴ experimental design.....	135
Table 11 The values of the Peleg’s constants (RC and CC) with the regression coefficient and the standard variation with a freedom degree DOF = 2.....	140
Table 12 GAB constants of the polymers	142

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES ACRONYMES

- ASE : Accelerated solvent extraction (extraction accélérée par solvant)
- B : La quantité adsorbée (Bound quantity)
- BET : Brunauer, Emmet and Teller
- CMA : Concentration maximale admissible
- CPMAS : Cross polarisation magic angle spinning (Polarisation croisée et rotation à l'angle magique)
- DMPAP : 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone
- DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- DSC : Differential scanning calorimetry (calorimétrie différentielle à balayage)
- ED : Experimental design (plan d'expériences)
- EGDMA : Ethylene glycol dimethacrylate
- F : La quantité non adsorbée (Free quantity)
- FIAD : Freundlich isotherm affinity distribution (distribution d'affinité de Freundlich)
- GC : Gas chromatography (chromatographie en phase gazeuse)
- HPLC : High performance liquid chromatography (Chromatographie liquide haute performance)
- LMR : Limite maximale de résidus
- MAM : Méthacrylamide
- MDRGF : Mouvement pour le droit et le respect des générations futures

MIP : Molecularly imprinted polymer (polymère à empreintes moléculaires)
MISPE : Molecularly imprinted solid phase extraction
MS : Mass spectrometry (spectrométrie de masse)
NIP : Non imprinted polymer (polymère non imprimé)
RMN : Résonance magnétique nucléaire
SPE : Solid-phase extraction (extraction en phase solide)
TRIM : Trimethylolpropane trimethacrylate
UV : Spectrophotométrie Ultra-violet

PARTIE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Introduction et problématique

Jamais dans l'histoire l'alimentation n'a été aussi sûre, en particulier dans les pays développés : les infections ou intoxications liées à l'alimentation sont sans cesse de moins en moins nombreuses. Et pourtant, l'inquiétude est croissante quant à l'impact sur la santé. Dans ce contexte de méfiance vis-à-vis de l'alimentation, la sécurité dans l'utilisation généralisée des pesticides dans l'agriculture en général, et la viticulture, en particulier, fait partie des préoccupations des consommateurs. Cette peur parfois irraisonnée peut s'expliquer cependant par la dégradation de la qualité de l'eau potable depuis les années 60 en Europe par exemple. En Italie (le plus grand pays producteur de raisins et du vin dans le monde), plus de 200 pesticides sont utilisés dans les vignobles (Cabras & Conte, 2001). Afin de protéger le consommateur, l'Union européenne (UE) a fixé des limites maximales de résidus (LMR) pour les pesticides dans les raisins de cuve, dans une gamme de 0,01 à 10 mg·kg⁻¹ en fonction du pesticide en particulier (2005; PAN-Europe, 2008b), mais aucune valeur n'a encore été fixée pour le vin. L'approche générique prise par l'UE pour les produits alimentaires transformés est que des LMR pour les produits bruts (raisins) sont applicables aux produits transformés (vins) en tenant compte des changements dans la concentration de résidus pendant le traitement (Avramides, Lentza-Rizos & Mojasevic, 2003). Dans le cas du vin, bien que le processus de vinification implique de nombreuses technologies différentes qui modifient la concentration de résidus de pesticides, en règle générale, la concentration des résidus diminue au cours de la vinification (Cabras & Angioni, 2000; Cabras et al., 2001).

Une étude récente indique qu'il y a un problème potentiel de contamination du vin par différents pesticides. Cette dernière a été coordonnée par PAN-Europe, et soutenue par le MDRGF (Mouvement pour le droit et le respect des générations futures) pour la France, par Global 2000 pour l'Autriche et par Greenpeace pour l'Allemagne. L'analyse a porté sur 40 bouteilles de vin rouge, en provenance de France, d'Autriche, d'Allemagne, d'Italie, du Portugal, d'Afrique du sud, d'Australie et du Chili. 34 étaient issues de l'agriculture intensive et 6 de l'Agriculture Biologique. Les niveaux de contamination dans cette étude sont variables et ne dépassent pas les limites maximales autorisées (LMR). Néanmoins, il faut rappeler que ces limites LMR ne correspondent pas au vin proprement dit mais se réfèrent à celles utilisées pour le raisin qui sont très élevées. Ainsi, il est surprenant de remarquer que les niveaux de

contamination observés dans le vin sont considérablement plus élevés que les niveaux tolérés pour les pesticides dans l'eau puisque que les études ont révélé que certains vins testés contiennent des quantités jusqu'à plus de 5800 fois supérieures aux Concentrations Maximales Admissibles (CMA) autorisées par pesticide dans l'eau du robinet. Reconnaissons cependant que lorsqu'un consommateur boit 1,5 litre d'eau par jour, il n'est pas censé boire du vin régulièrement. Si nous admettons qu'au-delà d'une limite, déjà haute en termes d'alcoolémie, de deux à trois verres par jour selon la recommandation en usage, soit 45 cl, nous obtenons un facteur de 3 et non pas de 5800. Il semble bien que le législateur n'ait pas pris en compte ce risque d'intoxication à long terme.

Enfin, on néglige souvent les composés à l'état de traces, souvent difficiles à détecter mais qui s'accumulent dans les graisses et le foie jusqu'à atteindre à long terme des niveaux de toxicité non négligeable.

A l'instar de l'analyse de tous les composés d'intérêt présents dans des matrices complexes, la détection et la quantification des résidus de pesticides présents dans le vin, nécessitent des méthodes analytiques de séparation performantes en sensibilité et sélectivité. L'analyste a souvent recours à une analyse par spectrométrie de masse couplée aux méthodes chromatographiques de séparation après préparation de l'échantillon par extraction en phase solide (SPE). Cependant, les interactions entre l'analyte et la phase stationnaire mises en jeu durant la rétention sont basées sur la polarité. La sélectivité est alors parfois insuffisante pour des échantillons contenant des composés d'hydrophobie similaire et /ou de charges ioniques identiques à celles des composés recherchés. Un gain en sélectivité au niveau de l'extraction est obtenu en utilisant des supports d'immunoaffinité, greffés sur un support solide (immunoadsorbants), basés sur l'utilisation d'anticorps spécifiques de l'analyte recherché.

Le coût élevé et le temps important nécessaires à la production d'anticorps, ainsi que la faible stabilité à températures élevées sont toutefois un frein à l'usage d'anticorps. Ce constat a récemment conduit à l'émergence d'une technique alternative basée sur la synthèse de polymères hautement réticulés, les polymères à empreintes moléculaires (MIP, Molecularly Imprinted Polymer). L'impression moléculaire est une technique en plein essor pour la préparation de polymères ayant des propriétés de reconnaissance moléculaire d'un composé donné, de ses analogues voire même d'un seul énantiomère.

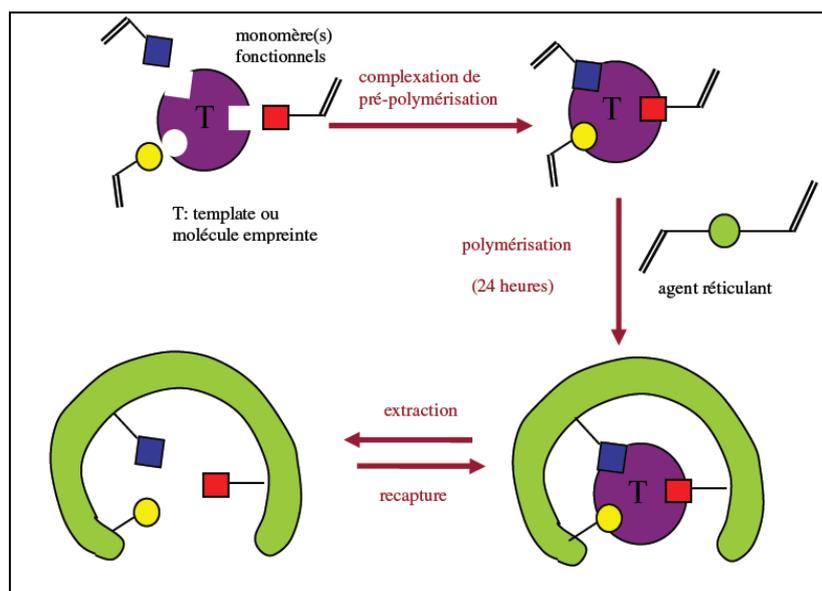


Figure 1 Principe de formation d'une empreinte moléculaire.

La synthèse d'un MIP est une procédure relativement simple et peu coûteuse. Le polymère à empreintes moléculaires est préparé en mélangeant, dans un solvant approprié, la molécule empreinte avec des monomères fonctionnels, un agent de réticulation et un initiateur radicalaire. Par la suite, ce mélange de pré-polymérisation est irradié par la lumière UV ou soumis à la chaleur afin d'amorcer une polymérisation photochimique ou thermique. Au cours de la polymérisation, les complexes formés entre la molécule empreinte et les monomères fonctionnels seront stabilisés dans le polymère hautement réticulé. Après polymérisation, la molécule empreinte est éliminée, et le polymère «imprimé» résultant possède «une mémoire permanente» de cette dernière et pourra par la suite capturer à nouveau la molécule cible (identique à la molécule empreinte ou de structure chimique proche de la molécule empreinte) de façon sélective dans une matrice complexe. Des cavités tridimensionnelles complémentaires, en forme et en disposition spatiale des fonctionnalités chimiques, à la molécule empreinte sont formées dans la matrice du polymère. Le degré élevé de réticulation permet aux microcavités de maintenir leur forme après élimination de la molécule empreinte. Par conséquent, les groupes fonctionnels sont tenus dans une configuration optimale pour l'étape de reconnaissance moléculaire de la molécule cible **Figure 1**.

2 Les applications des MIPs

Les polymères à empreintes moléculaires présentent plusieurs avantages par rapport à leurs homologues biologiques : i) la stabilité thermique et chimique, ii) le faible coût et la facilité de préparation, iii) la stabilité pendant le stockage, iv) la haute résistance mécanique, v) la résistance à la chaleur et à la pression, vi) et les opérations répétées d'extraction sans perte d'activité. Cette résistance physico-chimique des matériaux à empreintes moléculaires les prédispose aux applications où l'utilisation de biomolécules est impossible. Les polymères à empreintes moléculaires trouvent de plus en plus des applications dans nombreux domaines de la chimie et la biologie. Ils sont utilisés en tant que matériaux d'affinité pour les capteurs (Fuchs, Soppera & Haupt, 2012), qu'anticorps artificiels (Lavignac, Allender & Brain, 2004), ou bien qu'adsorbants pour l'extraction en phase solide SPE (Li, Zhang, Liu, Tong, Xu & Liu, 2013), que filtres (Xie et al., 2013), qu'adsorbants sur des barreaux magnétiques pour la microextraction « Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE» (Xu, Du, Hu, Hu, Pan & Li, 2012). Ils sont aussi utilisés en tant que phases stationnaires en chromatographie en phase liquide (CPL), électrophorèse capillaire (EC) et électrochromatographie (CEC) (Alexander et al., 2006; Huang, Zou, Chen, Luo & Kong, 2003).

Le coût d'une analyse par HPLC après une extraction à l'aide d'une cartouche SPE (Solid Phase Extraction) rempli d'un MIP est nettement plus bas que celui d'une analyse par HPLC-MS-MS ou qu'une HPLC par immunoaffinité, mais ce ne sont pas les seuls intérêts des MIPs.

3 Synthèse des MIP

Un MIP est préparé à partir d'une molécule empreinte : molécule autour de laquelle le « moulage » du polymère est réalisé, ainsi des empreintes spécifiques à cette molécule sont formées. La synthèse des polymères à empreintes moléculaires est un processus chimique qui nécessite d'être optimisé et qui exige une bonne compréhension de l'équilibre chimique, de la théorie de reconnaissance moléculaire, de la thermodynamique et la chimie de polymères afin d'assurer un haut niveau de reconnaissance moléculaire (Cormack & Elorza, 2004; Spivak, 2005). Le MIP devrait être assez rigide pour préserver la structure de la cavité d'impression après élimination de la molécule empreinte. D'autre part, il devrait jouir d'une grande flexibilité afin de faciliter l'établissement d'un équilibre rapide dans les cavités pour l'élimination de la molécule cible et la recapture de cette dernière. Ces deux propriétés sont contradictoires, d'où une optimisation de la synthèse d'un MIP est nécessaire. La conception et la synthèse d'un MIP est un défi en raison de la multiplicité des paramètres à en tenir compte : la nature et la stœchiométrie des réactifs, la durée de polymérisation, la température, la non-participation de la molécule empreinte à la polymérisation (voir paragraphe 3.2.1), la méthode de polymérisation, le format du polymère (Cf 3.4) Un polymère non imprimé (notation : NIP, du terme anglais Non Imprinted Polymer) est synthétisé en parallèle du MIP afin de comparer le pouvoir de rétention des deux matériaux et de vérifier la sélectivité de recapture du MIP par rapport au NIP vis-à-vis de la molécule empreinte. Le choix des réactifs (monomères fonctionnels, agent réticulant, solvant porogène, c'est-à-dire d'un solvant qui favorise la porosité du polymère et évite une synthèse compacte ; voir paragraphe 3.2.3.) et des protocoles de synthèse conditionne la stabilité du complexe de pré-polymérisation et la nature des empreintes formées au sein du MIP (Shi et al., 2006).

Nous exposerons ci-après les variables ayant des répercussions sur les propriétés chimiques ainsi que la reconnaissance moléculaire et morphologiques des MIP.

3.1 Conditions de polymérisation

La synthèse des MIPs implique généralement un grand nombre de facteurs variables qui influencent la sélectivité du polymère résultant. A part la nature des réactifs et la méthode d'initiation (thermique ou photochimique), la température et la pression lors de la polymérisation, ainsi que le temps de réaction et les dimensions du flacon utilisé pour contenir le mélange de pré-polymérisation peuvent avoir un effet direct sur les propriétés de reconnaissance des MIPs. Plusieurs études (Kempe & Mosbach, 1991; Lu, Li, Wang, Sun & Xing, 2004; O'Shannessy, Ekberg & Mosbach, 1989) ont montré que la polymérisation des MIP à de basses températures aboutit à un polymère de sélectivité plus grande que celle d'un MIP formé à hautes températures où l'initiation est tellement rapide que son contrôle devient très difficile. Il faut rappeler aussi que certaines interactions physicochimiques entre les monomères et la molécule empreinte sont fonctions de la température : les énergies d'interactions dipôle-dipôle (ou force de Keesom dont la « liaison » hydrogène), et les énergies des forces de Van der Waals (dipôle induit-dipôle) par sa composante de Keesom sont des fonctions de l'inverse de la température. Notons à l'inverse que les forces des énergies d'interactions électrostatiques type charge-charge, dipôle-charge, dipôle permanent-dipôle induit (forces de Debye), les interactions dipôle instantané-dipôle instantané (forces de London), et les interactions π - π ne dépendent pas de la température. Ainsi les températures relativement basses avec une longue durée de réaction sont adoptées surtout lorsque les interactions se basent sur des liaisons hydrogène. Cela peut être expliqué par le principe de Le Chatelier, qui prédit qu'en baissant la température on favorise le déplacement de l'équilibre vers la formation du complexe de polymérisation, ce qui implique l'augmentation du nombre et de la qualité des sites actifs formés.

3.2 Réactifs

Pour faire un MIP, il faut une molécule à imprimer, des monomères fonctionnels pour établir des interactions ou une liaison avec la molécule à imprimer afin de préparer l'impression dans le polymère, des monomères de réticulation qui sont à la base du polymère, des solvants et

des initiateurs de polymérisation. Les paragraphes suivants vont détailler chacune des espèces et les conditions à respecter au cours de la synthèse d'un MIP.

3.2.1 *Molécule empreinte*

La molécule empreinte est d'une importance capitale, elle dirige l'organisation des groupes fonctionnels des monomères fonctionnels pendant tout le processus d'impression moléculaire. Elle doit être représentative des molécules cibles dans l'échantillon. La ressemblance entre la molécule empreinte et les molécules cibles doit tout autant porter sur leur taille et leur forme que sur la nature, la position et l'orientation spatiale de leurs groupes fonctionnels (Lu, Li, Liu & Huang, 2002). La sélection de la molécule empreinte se fait en se basant surtout sur l'évaluation de la stabilité du complexe de pré-polymérisation. Quant à sa compatibilité avec la polymérisation radicalaire, elle devrait idéalement être chimiquement inerte dans les conditions de polymérisation, donc une autre stratégie d'impression doit être recherchée si la molécule empreinte peut participer dans les réactions radicalaires ou si elle est instable dans les conditions de polymérisation. La molécule empreinte doit être stable à des températures modérément élevées ou lors de l'exposition à l'irradiation UV, ne pas porter une fonction chimique qui pourrait entraver ou retarder une polymérisation radicalaire et ne pas avoir de groupements polymérisables.

L'un des avantages de la polymérisation par la méthode d'impression moléculaire est qu'elle peut être appliquée à une large gamme d'analytes. Cependant, toutes les molécules ne sont pas prêtes à être utilisées comme empreintes. La synthèse d'un MIP pour les composés organiques de grande taille, par exemple, les protéines, l'ADN (que dire de cellules !) reste un défi non résolu, une empreinte de capteurs de radicaux nécessite des protocoles adaptés ou la recherche de molécules empreintes analogues inertes à la réaction de polymérisation. La principale raison pour laquelle que les grandes molécules se prêtent difficilement à une empreinte est qu'elles sont moins rigides et donc ne facilitent pas la création de cavités de liaisons bien définies au cours du processus d'impression. En outre, la structure secondaire et tertiaire de grosses biomolécules telles que les protéines peuvent être touchées en cas d'exposition au traitement thermique ou photolytique impliqués dans la synthèse des

polymères. La recapture est aussi plus difficile, car les grosses molécules et les protéines ne pénètrent pas facilement dans le réseau du polymère pour occuper les sites actifs. Par contre, un grand nombre de réalisations utilisant l'impression moléculaire des petites molécules organiques comme les médicaments, les pesticides, les acides aminés, les peptides, les sucres, les stéroïdes et les nucléotides, existe de nos jours.

Dans l'étape de quantification de la molécule cible, souvent présente à l'état de trace, un phénomène pourrait entraîner des erreurs de surdosage ; c'est le phénomène de relargage de la molécule empreinte, encore présente dans la matrice polymérique, dans le milieu d'extraction (Cormack & Mosbach, 1999). Des lavages successifs du polymère sont ainsi nécessaires, ils se font avec un solvant capable de rompre efficacement les interactions molécule empreinte – résidu fonctionnel du polymère (issu des monomères fonctionnels) : par exemple, un mélange MeOH/AcOH permet la rupture des interactions hydrogène et la libération de la molécule empreinte. Il est aussi possible de procéder par une extraction à chaud utilisant le Soxhlet, par une extraction accélérée par solvant (ASE, Accelerated Solvent Extraction) (Urraca, Marazuela, Merino, Orellana & Moreno-Bondi, 2006) ou bien en percolant une phase mobile à fort pouvoir éluant à travers une colonne remplie de particules de MIP afin de libérer les cavités occupées par la molécule empreinte (Lu et al., 2002).

Le relargage de la molécule empreinte reste toujours possible lors de son analyse. Pour prévenir son effet, l'impression peut être faite par une molécule empreinte différente de la molécule cible, mais qui lui est analogue en structure, nature et positionnement des groupes fonctionnels (Andersson et al., 2004). La molécule cible marquée au deutérium (ou autre isotope d'atomes présents dans la molécule) pourrait jouer le rôle d'une molécule empreinte (Kawaguchi et al., 2005).

3.2.2 *Monomère fonctionnel*

Dans le mécanisme de formation des sites actifs, les monomères fonctionnels sont responsables des interactions au sein des cavités présentes dans le polymère. Leur choix a une grande importance sur la sélectivité résultante du MIP.

Malgré la grande variété de monomères fonctionnels disponibles (**Figure 2**), la majorité des MIP utilisée en SPE (Solid Phase Extraction) est synthétisée avec l'acide méthacrylique ($\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{-COOH}$) car il a la faculté d'être donneur et accepteur de protons (fortes capacités à créer des interactions dipôle-dipôle). De plus, par ses propriétés acides, il peut développer des interactions électrostatiques et ioniques avec des molécules empreintes basiques. Ces interactions ont été mis en évidence par une étude de la variation de l'affinité du MIP vis-à-vis de molécules aminopyridine en fonction du pH (Matsui, Doblhoff-Dier & Takeuchi, 1997).

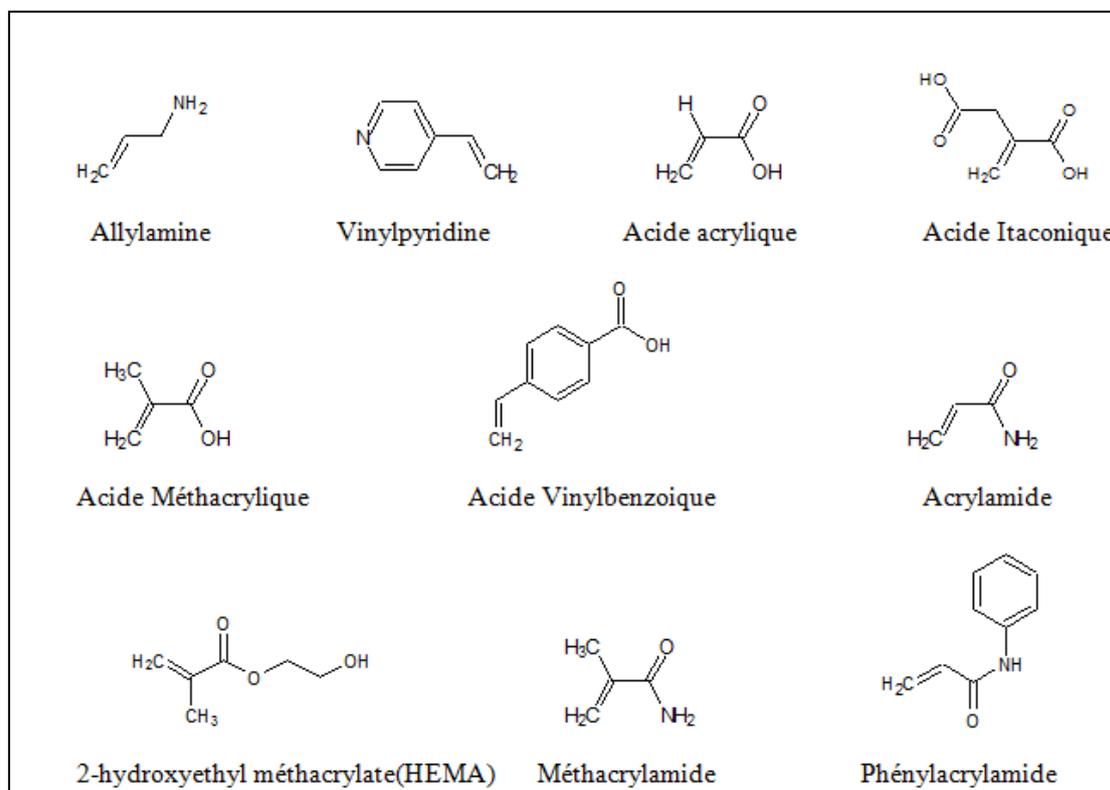


Figure 2 Structure chimique des monomères fonctionnels utilisés dans l'impression moléculaire non covalente

Ainsi, l'acide méthacrylique est le monomère choisi quasiment par défaut dès que les molécules cibles sont neutres ou basiques. A l'inverse, pour des molécules acides, on

cherchera un monomère basique capable également de développer des liaisons hydrogène et éventuellement des interactions électrostatiques. Pour ces raisons, le 4-vinylpyridine ($\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})$) et éventuellement le 2-vinylpyridine sont les monomères basiques les plus utilisés pour des MIP dédiés à la SPE (Alexander et al., 2006; Caro, Marcé, Cormack, Sherrington & Borrull, 2006).

Dans le cas d'empreintes formées à partir de molécules neutres et polaires comme les amides, C.Yu et K. Mosbach (Yu & Mosbach, 1997) ont souligné la capacité de l'acrylamide à créer des interactions hydrogène plus fortes avec la molécule empreinte que l'acide méthacrylique et ceci dans un solvant polaire comme l'acétonitrile ou protique comme l'eau. L'explication théorique apportée par les auteurs repose en partie sur le moment dipolaire de la fonction amide dont la valeur est supérieure à celle de la fonction acide carboxylique. J. Xie (Xie, Zhu, Luo, Zhou, Li & Xu, 2001) a confirmé la force des interactions dipôle-dipôle créées par l'acrylamide.

Les performances chromatographiques telles que la rétention et la résolution augmentent avec l'augmentation de l'affinité du MIP, c'est le cas surtout lorsqu'il s'agit d'une copolymérisation (utilisation de 2 monomères fonctionnels) et cela grâce à l'effet de la coopération des sites actifs. Cependant, il est important de tenir en compte le rapport des réactivités pour s'assurer que ces copolymérisations sont réalisables.

L'évaluation des interactions entre le monomère fonctionnel et la molécule empreinte peut être faite par des méthodes spectroscopiques. La résonance magnétique nucléaire (RMN) confirme la présence de ces interactions. Pour élucider la structure du complexe résultant, on a souvent recours à la spectroscopie NOE (nuclear overhauser effect) qui donne des informations sur les protons voisins, ce qui permet de déterminer la position exacte du monomère dans le complexe. La complexation entre monomère fonctionnel et molécule empreinte a également été étudiée en utilisant la spectrophotométrie ultra-violet UV afin de déterminer la concentration relative en molécules empreintes entièrement complexées dans le mélange de polymérisation (dès lors que le mélange empreinte-monomères fonctionnels reste

limpide et ne précipite pas). Cette approche a été également utilisée pour vérifier la nature inerte de l'agent réticulant.

La modélisation moléculaire peut être utilisée pour le choix du monomère fonctionnel et pour l'évaluation de la stabilité du complexe de prépolymérisation (Baggiani, Biagioli, Anfossi, Giovannoli, Passini & Giraudi, 2013; Gómez-Pineda, Pina-Luisa, Cuán, García-Calzón & Díaz-García, 2011; Sergeyeva et al., 2013). Elle peut aussi servir pour étudier l'effet du solvant porogène sur la sélectivité des polymères à empreintes moléculaires (Meier, Schott, Riedel & Mizaikoff, 2012).

3.2.3 *Solvant porogène*

Le solvant porogène joue un rôle important dans la formation de la structure poreuse des MIPs. La nature et la quantité de solvant porogène déterminent la force des interactions physicochimiques et influencent la morphologie des polymères qui, bien évidemment, affecte directement les performances du MIP. Tout d'abord, la molécule empreinte, l'initiateur et le monomère réticulant doivent être solubles dans les solvants porogènes. En second lieu, le solvant porogène devrait produire des pores suffisamment larges et aisément accessibles à la molécule empreinte et à la molécule à capturer lors des dosages. Troisièmement, le solvant porogène devrait avoir une polarité relativement faible, afin de réduire les interférences lors de la formation du complexe entre la molécule empreinte et le monomère fonctionnel. Ce dernier point est très important pour obtenir une grande sélectivité du MIP. En outre, le volume des pores augmente en augmentant le volume du solvant porogène.

Normalement, des solvants apolaires et/ou aprotiques (absence de caractère donneur ou accepteur de protons), par exemple le toluène, le chloroforme et le dichlorométhane pour ne citer que les plus utilisés, sont des solvants qui favorisent les interactions dipôle-dipôle ou ioniques entre l'empreinte et les monomères fonctionnels. Si des interactions hydrophobes sont nécessaires pour former le complexe monomère-molécule empreinte, dans ce cas, l'eau peut être alors le solvant de choix. Quand la solubilisation de la molécule empreinte dans le mélange de pré-polymérisation l'impose, un solvant polaire aprotique comme l'acétonitrile est choisi (Nomachi, Kubo, Hosoya & Kaya, 2006).

Lors du processus SPE utilisant les MIP comme phase stationnaire, la reconnaissance de la molécule empreinte par le MIP est optimale dans le solvant porogène utilisé lors de la polymérisation. En effet, le polymère reprend la même structure microscopique que celle adoptée lors de la polymérisation. Ainsi, les interactions établies entre la molécule empreinte et les monomères au cours de la synthèse du MIP se reproduisent au cours de l'extraction en phase solide de façon à ce qu'on obtienne une meilleure rétention de l'analyte (Spivak, Gilmore & Shea, 1997). Par abus de langage, certains auteurs parlent d'effet d'impression du solvant porogène pour exprimer l'influence du solvant porogène sur le comportement du polymère (Yoshizako, Hosoya, Iwakoshi, Kimata & Tanaka, 1998).

Enfin, la spécificité de recapture d'une molécule cible par un MIP est optimale lorsque les interactions non spécifiques (interactions dipolaires ou ioniques) entre le soluté et le polymère sont éliminées. Ces conditions sont souvent atteintes avec le solvant porogène auquel a été ajouté un modificateur de nature donneur ou accepteur de liaisons hydrogène : un acide (ex., l'acide acétique) ou une base (ex. la diéthylamine) (Caro et al., 2006).

3.2.4 *Agent réticulant*

La sélectivité d'un MIP est fortement influencée par le type et la quantité d'agent réticulant utilisé pendant sa synthèse. Le choix judicieux de l'agent réticulant est important pour fournir des interactions complémentaires à la molécule empreinte et aux substrats. Dans un MIP, l'agent réticulant remplit trois grandes fonctions: il contrôle la morphologie du polymère, qu'il soit de type gel, macroporeux ou une poudre microgel, il stabilise le site de liaison et enfin, il confère au polymère sa stabilité mécanique. Ainsi, la quantité d'agent réticulant devrait être suffisamment élevée pour maintenir la stabilité des sites de reconnaissance. Ceci est dû au fait que le degré élevé de réticulation permet aux microcavités de maintenir la structure tridimensionnelle complémentaire à la fois en fonctionnalité chimique et en forme à celle de la molécule cible. De cette façon, les groupes fonctionnels sont tenus dans une configuration optimale pour cette reconsolidation, permettant au récepteur de «reconnaître» le substrat d'origine. Des polymères avec un rapport nombre de mole d'agents réticulant sur nombre de mole de polymères fonctionnels au-delà de 80 % sont souvent synthétisés. Un

certain nombre d'agents réticulants sont capables de complexer la molécule empreinte et jouent ainsi simultanément le rôle de monomères fonctionnels et d'agent réticulant. Le divinylbenzène, l'éthylène glycol diméthacrylate et le triméthylolpropane triméthacrylate sont parmi les agents réticulants les plus utilisés ; ils font aussi office de monomères fonctionnels.

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

M. Kempe a remarqué que la capacité et la sélectivité d'un MIP sont plus grandes en remplaçant le triméthylolpropane triméthacrylate (3 liaisons vinyliques) par l'éthylène glycol diméthacrylate (2 liaisons vinyliques) (Kempe & Mosbach, 1995).

L'hydrophobie du triméthylolpropane triméthacrylate est supérieure à celle de l'éthylène glycol diméthacrylate. Dans le cas de la solubilisation des molécules empreintes contenues dans des matrices aqueuses, peu favorables au développement des interactions dipôle-dipôle entre empreinte et monomères fonctionnels, l'hydrophobie du triméthylolpropane triméthacrylate favorise l'interaction empreinte-monomère. Ainsi, J. Xie explique la spécificité d'extraction de la quercétine par SPE à partir du plasma de rat grâce aux interactions hydrophobes entre la molécule cible et le triméthylolpropane triméthacrylate (Xie, Chen, Li & Xu, 2003).

La préparation d'un MIP pourrait être simplifiée en remplaçant le couple monomère fonctionnel – agent réticulant par un seul agent réticulant, capable d'assurer la reconnaissance de la molécule empreinte (Sibrian-Vazquez & Spivak, 2004). La **Figure 3** montre quelques exemples d'espèces à double fonction, monomères fonctionnels et agents de polymérisation.

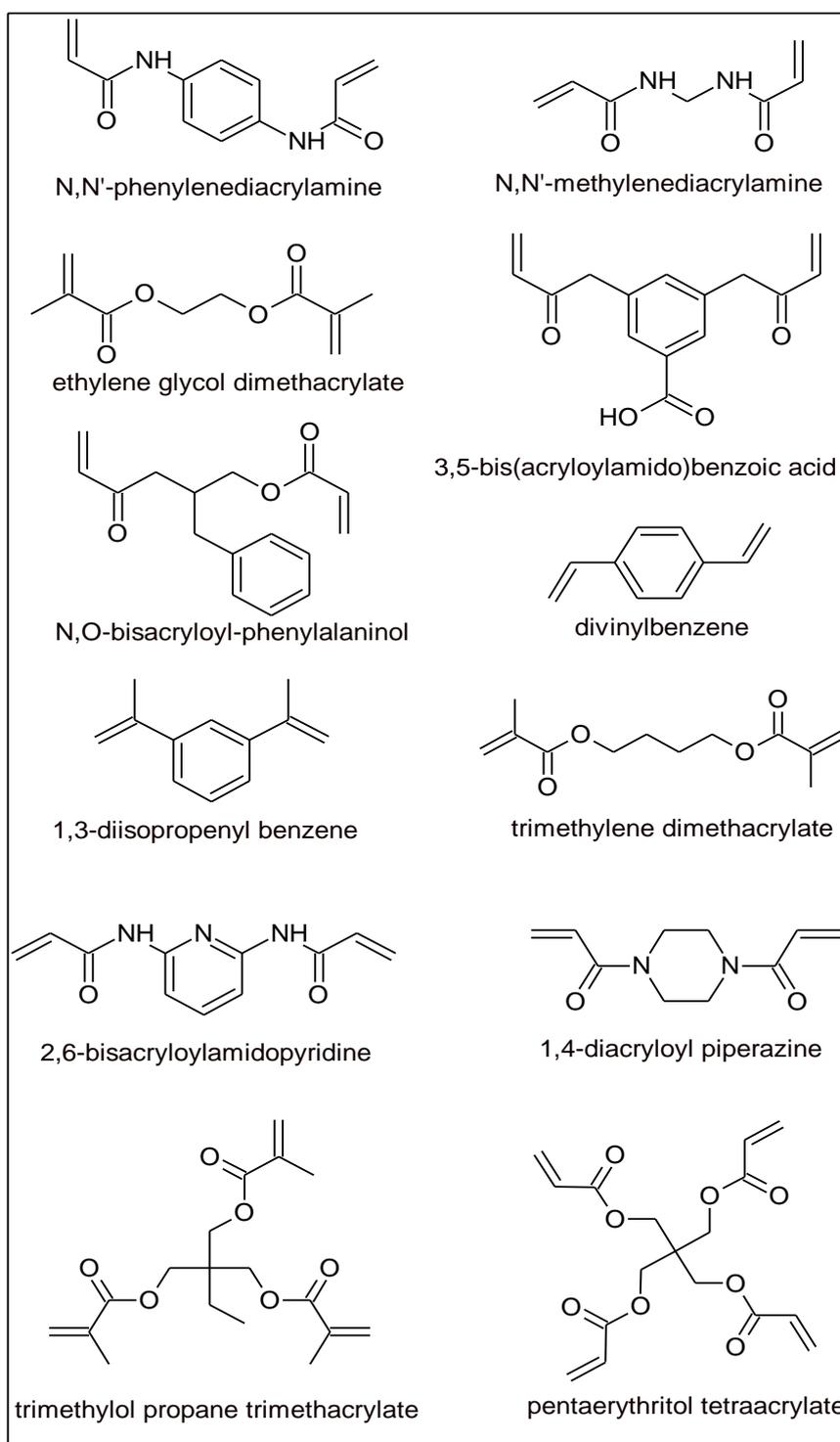


Figure 3 Structures chimiques des agents réticulants les plus couramment utilisés pour la synthèse d'un MIP

3.2.5 *Initiateur de polymérisation*

Dans la plupart des cas, l'amorçage de la polymérisation se fait par voie thermique (saut énergétique ou accélération cinétique) ou par rayonnement ultra-violet (initiation radicalaire).

De nombreux amorceurs peuvent être utilisés comme source de radicaux lors d'une polymérisation radicalaire. Généralement, des amorceurs de type composés azo (-N=N-) sont utilisés. Par le fait que leur scission radicalaire est aisée, ils sont capables d'amorcer un grand nombre de monomères, et cela que ce soit par voie thermique ou photochimique. L'inconvénient de ce type d'amorceurs est qu'il forme des radicaux stables avec l'oxygène (peroxydes, R-O-O•, temps de demi vie autour de la seconde, ce qui est important si l'on compare à un radical hydroxyl très réactif, 10⁻⁹ s) qui ralentissent très fortement la polymérisation. Pour favoriser une bonne propagation radicalaire, il faut donc éliminer l'oxygène du milieu réactionnel. Cela se fait par ultra-sonication ou par barbotage d'un gaz inerte dans le milieu.

L'initiateur de polymérisation radicalaire le plus couramment utilisé est l'azo bis(isobutyronitrile) (connu sous l'abréviation AIBN, CAS number : 78-67-1 ; logP = 1,26 c'est-à-dire assez soluble dans l'eau ou le toluène et surtout très soluble dans le dichlorométhane). Il se décompose par chauffage (60 °C) soit par voie photochimique, et génère des radicaux libres alkyl (R-C•) : $R-C-N=N-C-R' \rightarrow R-C\cdot + \cdot C-R' + N_2$. Le 2,2'-azo-bis-(2,4-diméthylvaléronitrile) (CAS number : 4419-11-8 ; log P = 4,40, surtout soluble dans des solvants apolaires type hexane), est un autre promoteur radicalaire. Il génère lui aussi des radicaux libres alkyl mais à une température assez basse, de 40 °C, et permet ainsi de travailler dans des conditions de polymérisation plus « douces » thermiquement (Cormack et al., 2004).

En effet, la température a des conséquences variables sur la stabilité du complexe formé entre le monomère fonctionnel et la molécule empreinte ainsi que sur la réaction de polymérisation. Y. Lu (Lu et al., 2004) souligne qu'une élévation de la température diminue la stabilité du complexe de pré-polymérisation mais augmente le rendement de la réaction de polymérisation, et de ce fait le nombre de sites d'impression. S. Le Moullec (Le Moullec,

Bégos, Pichon & Bellier, 2006) mentionne aussi l'influence de la température de synthèse d'un MIP par voie photochimique sur la recapture de dérivés d'acides alkyl méthylphosphoniques. Ainsi, la sélectivité du MIP préparé à 4 °C est meilleure que celle du MIP obtenu à 15 °C mais la synthèse du polymère est plus longue. Ces résultats semblent indiquer de meilleures conditions de formation des empreintes à basse température, même si d'autres paramètres tels que la nature et la quantité de solvant porogène ont été simultanément modifiés dans le protocole de synthèse du MIP (Le Moullec et al., 2006) (Le Moullec, Bégos et al., 2006) (Le Moullec et al., 2006) (Le Moullec et al., 2006).

De nombreux initiateurs chimiques ayant des propriétés chimiques différentes peuvent être utilisés comme source de radicaux libres dans la polymérisation radicalaire. Normalement, ils sont utilisés en quantités très faibles par rapport aux monomères, par exemple 1 % en masse par rapport à la masse de monomères ou 1 % en mole par rapport au nombre total de moles de doubles liaisons polymérisables. Le taux et le mode de décomposition d'un initiateur de radicaux peuvent être contrôlés par la chaleur et la lumière. Le 2,2'-diméthyl-2-phénylacétophénone (CAS number : 93433-64-8 ; logP = 3,0) est un initiateur qui peut être facilement décomposé par photolyse sous les UV, il s'opère alors une scission radicalaire selon la réaction représentée dans la Figure 4.

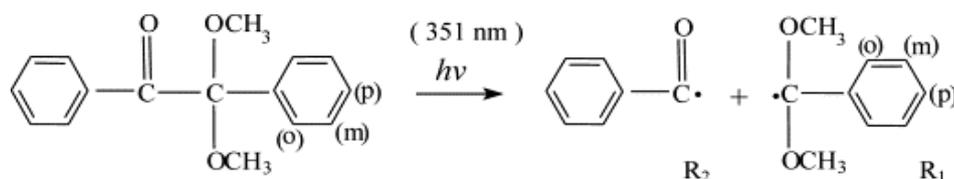


Figure 4 Réaction de décomposition radicalaire du 2,2'-diméthyl-2-phénylacétophénone.

3.3 Approches

La qualité des empreintes formées, ainsi que la spécificité résultante du polymère, dépendent notamment de l'affinité de la molécule empreinte vis-à-vis du(des) monomère(s) fonctionnel(s) dans le mélange de pré-polymérisation et par conséquent, du nombre et de

l'intensité des interactions initiées entre ces deux entités (Hugon-Chapuis & Pichon, 2007). Selon ce critère, trois principales voies de synthèse sont appliquées à ce jour suivant les modes d'association monomère-molécule empreinte. Ces trois voies de synthèse sont appelées dans la bibliographie : 1) covalente (abus de langage pour signifier « formation de liaison chimique »¹), 2) non-covalente (pour signifier « interactions physicochimiques » de type dipôle-dipôle comme la « liaison hydrogène » ou des interactions charge-charge) ou semi-covalente (combinaison des deux voix précédentes).

3.3.1 Synthèse par voie covalente

Les synthèses de MIPs par voie covalente ont été étudiées par l'équipe de Wulff (Wulff, Sarhan & Zabrocki, 1973) et celle de Shea (Shea & Thompson, 1978). Dans l'approche covalente¹, la molécule empreinte est liée par liaison chimique à une molécule polymérisable. Cette réaction doit être aisément réversible. La réaction inverse qui permet de revenir aux substrats de départ doit se faire facilement et sous conditions assez douces. Après copolymérisation, la molécule empreinte est chimiquement clivée du polymère hautement réticulé. Cette liaison chimique est capable de se former à nouveau lorsque le polymère est en contact avec la molécule empreinte ou un analogue doté de la même fonction (Gallego-Gallegos, Munoz-Olivas, Camara, Mancheno & Sierra, 2006). Seuls des composés ayant des groupements fonctionnels particuliers sont utilisés comme molécule empreinte : alcool avec la formation d'un ester (aisément hydrolysable), acides carboxyliques et aldéhydes avec la formation d'esters (Selligren & Andersson, 1990), acétals (équilibre réversible) (Shea & Dougherty, 1986), amides (hydrolysables) et base de Schiff (équilibre réversible) (Wulff, Heide & Helfmeier, 1986)

¹ Le terme de covalence est un terme impropre pour désigner la liaison chimique (recouvrement d'orbitale). La covalence décrit une liaison chimique de moment dipolaire nul en toute rigueur.

Wulff et al., (Wulff, Vesper, Grobe-Einsler & Sarhan, 1977) en suivant l'approche covalente, ont d'abord produit un MIP en synthétisant un sucre ou des dérivés d'acides aminés contenant une fonction polymérisable telle que le vinylphenylboronate. Ils ont montré l'augmentation de la spécificité des MIPs avec la quantité de l'agent réticulant. Il faut noter que les exigences de l'impression par la voie covalente sont différentes de celles de la voie non-covalente, notamment en matière de ratios de monomère fonctionnel, d'agent réticulant et de molécule empreinte. En outre, après synthèse du polymère par voie covalente, on a souvent besoin d'une hydrolyse en milieu acide pour le clivage des liaisons chimiques préétablies entre le monomère fonctionnel et la molécule empreinte.

Le fait d'utiliser des molécules empreintes polymérisables dans cette approche, permet de générer des sites actifs assez homogènes : les groupes fonctionnels restant dans le polymère après élimination de la molécule empreinte sont localisés exclusivement dans les sites actifs. Par conséquent, la synthèse d'un MIP par voie covalente serait plus favorable que celle par voie non covalente pour le développement d'activités catalytiques.

3.3.2 *Synthèse par voie non covalente*

Lors de la synthèse d'un MIP par voie non covalente, des sites de reconnaissance spécifique sont formés par auto-assemblage entre la molécule empreinte et un monomère fonctionnel, puis l'ensemble est réticulé à l'aide d'un agent réticulant.

Dans ce procédé, le complexe entre la molécule empreinte et le monomère est formé in-situ par des interactions physicochimiques de type interactions hydrogène ou électrostatiques, mais encore par des interactions π - π . Pour une sélectivité optimale du polymère lors de l'extraction, les mêmes interactions doivent se développer entre l'analyte et le MIP (Caro, Masqué, Marcé, Borrull, Cormack & Sherrington, 2002). Les interactions entre le monomère fonctionnel et la molécule empreinte au cours de la polymérisation sont identiques à celles réalisées par la suite entre le polymère et la molécule recherchée lors de l'étape de recapture.

L'approche non covalente a été proposée dès les années 1990 par Sellergren (Sellergren, 1989) puis développée, étudiée et optimisée par de nombreuses autres équipes dont celle de Mosbach (Mosbach, 1994).

Cette méthode est très facile à mettre en œuvre ; elle peut être adaptée à une large gamme de molécules cibles d'intérêt biologique. L'extraction de la molécule empreinte de la matrice polymérique est également aisée. Cependant, l'obtention d'un complexe de pré-polymérisation (molécule empreinte/monomère fonctionnel) stable lors de la synthèse conditionne le choix du monomère et restreint le choix du solvant de polymérisation. Le solvant utilisé doit solubiliser les différents réactifs tout en stabilisant le pré-complexe ; il doit être peu polaire et aprotique (Caro et al., 2002) tel que le dichlorométhane, le chloroforme ou encore le toluène. En d'autres termes, le solvant ne doit pas établir d'interactions dipôle-dipôle, dipôle-charge, charge-charge avec le soluté pour faciliter ces interactions entre les monomères fonctionnels et l'empreinte. Cependant un compromis est nécessaire car il faut parvenir à solubiliser l'empreinte, qui possède des charges ou des groupements polaires, dans ces solvants apolaires. Des synthèses peuvent également être réalisées dans l'acétonitrile (Andersson et al., 2004; Wang, Guo, Chen, Zhang & Liang, 2005). Même si la majeure partie des MIP est synthétisée en milieu organique pour des contraintes de solubilisation de l'ensemble des réactifs, des solvants polaires protiques ont été utilisés comme l'eau et le méthanol mais pour des applications environnementales.

La première synthèse en milieux aqueux a été proposée pour l'extraction de méthylxanthines à partir de l'urine en utilisant des organosilanes comme monomères (Caro et al., 2002), contrairement aux précédents travaux qui ont tous été basés sur l'utilisation de monomères organiques.

Une des limites de cette technique concerne les conditions de reconnaissance. En effet, si les interactions entre la molécule cible et le monomère sont stabilisées en milieu hydrophobe, un environnement polaire les défavorise. De plus, afin que cette méthode soit efficace, il est nécessaire que la molécule cible ait au moins deux points d'attache, ce qui n'est pas le cas des molécules possédant un seul groupement fonctionnel. Dans ce cas, une molécule n'ayant

qu'un groupe fonctionnel présente des propriétés de reconnaissance très limitées, ce qui interdit pratiquement toute possibilité de synthèse de MIP par cette voie.

Bien que l'approche non covalente présente quelques inconvénients, elle reste la méthode de choix la plus fréquemment utilisée pour préparer des MIPs (Lok, 2009) ; étant donné qu'elle est simple, qu'elle est adaptée à une large gamme de molécules empreintes et que l'étape d'élimination de la molécule empreinte est facile et se fait souvent par extraction en continue (soxhlet à chaud ou micro-onde, c'est-à-dire par augmentation de l'agitation moléculaire).

3.3.3 Synthèse par voie semi covalente

L'impression moléculaire par voie covalente abaisse de manière significative les interactions non spécifiques. Le processus complexe de recapture ainsi que sa cinétique lente la rend incompatible pour la grande majorité des applications. L'approche semi-covalente présente une option intéressante parce qu'elle diffère de la voie covalente au niveau de l'étape de reconnaissance moléculaire qui se fait par interactions physicochimiques (non-covalentes) et non par formation d'une liaison chimique (covalente). Les stratégies de synthèse ont été largement étudiées par A.G.Mayes (Mayes & Whitcombe, 2005).

Voici un exemple de synthèse de MIP par voie semi-covalente. En premier lieu, on forme une liaison ester entre le méthacrylate et la molécule cible. L'ajout ensuite de monomères fonctionnels permet de créer des interactions physicochimiques avec l'espèce imprimée. La molécule empreinte est éliminée par hydrolyse. Ensuite, la molécule cible (non estérifiée alors) se lie cette fois par interactions physicochimiques (de façon non covalente) dans le site de reconnaissance moléculaire du polymère résultant. On parle ainsi de MIP semi-covalent. Cependant, l'hydrolyse n'est souvent pas simple et les exigences stériques d'un acide et d'un alcool dans une liaison hydrogène sont assez différentes de celles de l'ester correspondante, ce qui est un obstacle dans l'étape d'impression (Mayes & Whitcombe, 2005). Néanmoins, cette limite peut être surmontée par l'utilisation d'un groupe réticulant entre la molécule cible et le monomère fonctionnel, ce dernier se perd pendant l'étape d'élimination de la molécule empreinte. P. Qi et ses collaborateurs (Qi et al., 2010) ont réussi à synthétiser un MIP par voie semi-covalente présentant une application potentielle comme phase stationnaire dans la

détermination des phénols (**Figure 5**). Ils ont synthétisé les molécules empreintes 4-chlorophényl (4-vinyl)phényl carbonate et le méthylphényl(4-vinyl)phényl carbonate pour imprimer les phénols. Une grande sélectivité vis-à-vis des phénols a été obtenue pour le monolithe synthétisé avec le 4-chlorophényl (4-vinyl)phényl carbonate comme molécule empreinte, l'éthylène diméthacrylate glycol comme agent réticulant et l'azobisisobutyronitrile comme initiateur de polymérisation (Qi et al., 2010).

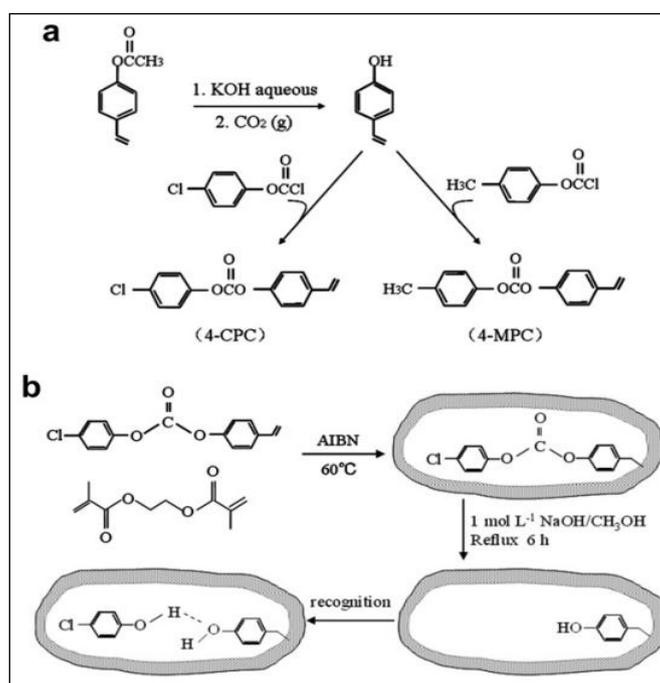


Figure 5 Représentation schématique de l'approche semi-covalente utilisée par P. Qi et al (Qi et al., 2010) (a) Synthèse de la molécule empreinte (b) Préparation du MIP spécifique au 4-chlorophénol.

La Figure 6 est un schéma qui présente à titre récapitulatif les trois approches citées ci-dessus ainsi que l'interaction entre un monomère chargé et un site de la molécule empreinte ayant une charge opposée.

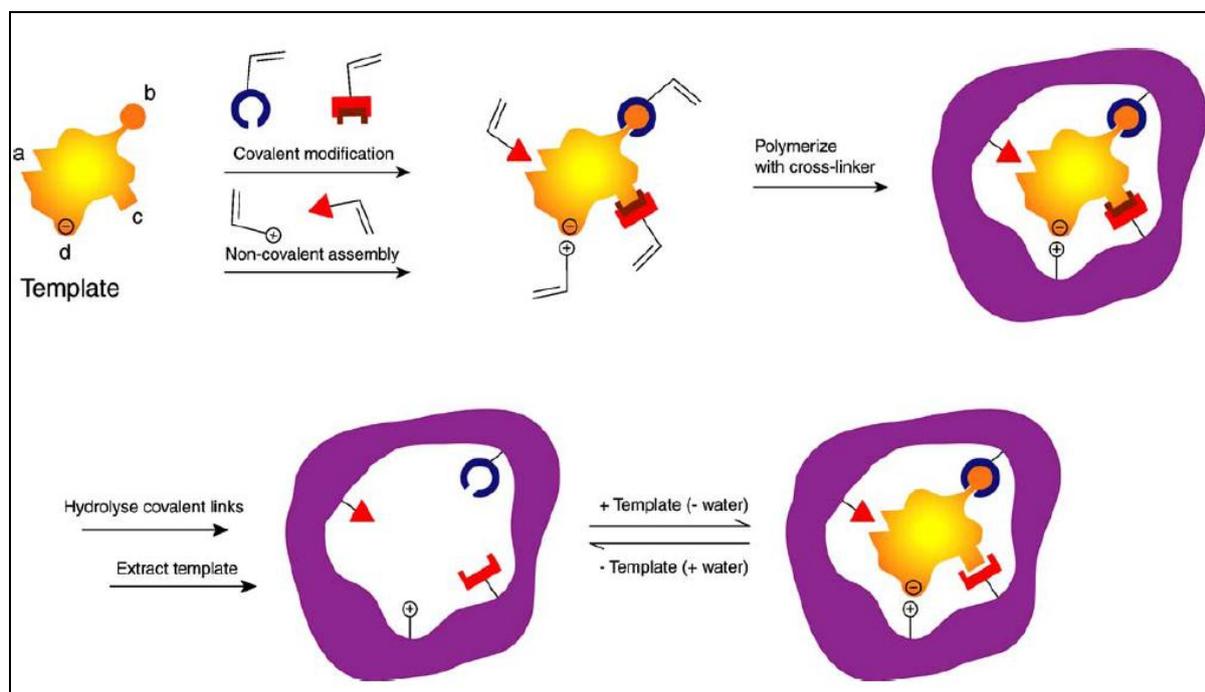


Figure 6 Représentation schématique du processus d'impression montrant quelques interactions utilisées pour créer une affinité pour la molécule empreinte dans les sites de reconnaissance. Les interactions avec les motifs (a–d) de la molécule empreinte représentent les stratégies : (a) non-covalente; (b) covalente réversible; (c) semi-covalente; (d) interactions électrostatiques avec un monomère de charge opposée.

La recapture ou l'élimination de la molécule empreinte du monomère final est une réaction facile de condensation ou d'hydrolyse (b). L'élimination de la molécule empreinte est une réaction chimique d'hydrolyse s'il s'agit de liaisons covalentes à rompre. Si la recapture est une réaction de condensation (approche covalente), une ou plusieurs molécules d'eau sont éliminées (Mayes et al., 2005).

3.4 Méthodes de préparation

Il existe plusieurs manières pour réaliser le MIP et le format du MIP obtenu en dépend. La Figure 7 illustre les différents formats de particules obtenus par quelques méthodes de préparation. Les chapitres suivants décrivent les différentes formes de MIP qu'il est possible de produire.

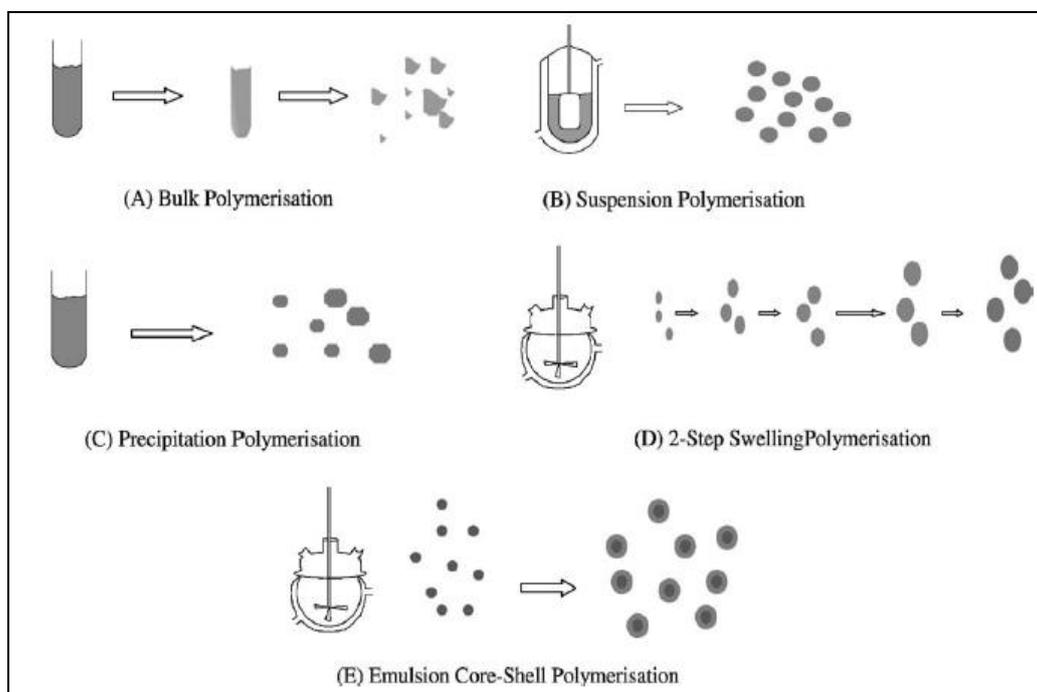


Figure 7 Représentation schématique de quelques méthodes de préparation des MIPs et des particules obtenues (Pérez-Moral & Mayes, 2004).

3.4.1 Polymérisation en masse

Les polymères à empreintes moléculaires peuvent être préparés suivant une variété de formes physiques en fonction de l'application désirée. La méthode conventionnelle est une polymérisation en solution qui consiste à mélanger tous les réactifs, elle est suivie par un broyage mécanique du polymère résultant (**Figure 8**). Les particules ainsi obtenues sont tamisées pour atteindre les gammes de taille désirée (Silvestri, Borrelli, Giusti, Cristallini & Ciardelli, 2005). Cette méthode étant la plus populaire, elle présente de nombreuses propriétés intéressantes. En fait, elle est rapide et simple dans sa réalisation pratique et elle ne requiert pas d'instruments sophistiqués. Les particules de tailles inférieures à 25 μm sont généralement utilisées dans des études chromatographiques.

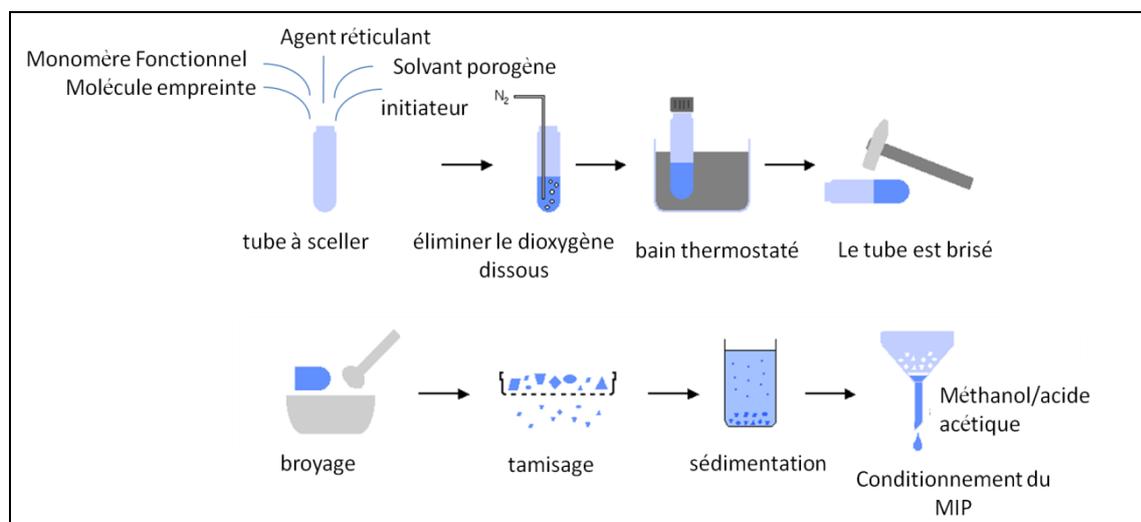


Figure 8 Schéma représentatif des étapes de synthèse d'un MIP par polymérisation en masse.

Bien que la polymérisation en masse soit simple, elle présente de nombreux inconvénients : i) le broyage du monolithe obtenu n'est pas aisé ; ii) la méthode souffre d'une forte consommation en molécules empreintes au cours de la synthèse ; iii) les particules obtenues après la dernière étape de tamisage sont irrégulières en taille et en forme ; iv) certains sites d'interaction sont détruits au cours du broyage, ce qui a un impact négatif sur les performances des MIP utilisés en chromatographie et ce qui réduit la capacité des sites d'interaction par rapport aux valeurs théoriques ; v) le broyage et le tamisage entraînent une perte importante de polymère qui peut être estimée entre 50 et 75 % de la masse initiale du matériau en vrac. Gonzalez et al. (Gonzalez, Hernando & Alegeria, 2006) ont étudié des MIP non-covalents synthétisés par polymérisation en masse et utilisant comme molécule empreinte la digoxine. Ces polymères ont été synthétisés dans des conditions différentes, à savoir : deux monomères fonctionnels (acide méthacrylique ou 2-vinylpyridine), deux solvants porogènes (acétonitrile ou dichlorométhane), des quantités différentes de solvant ainsi que différents procédés d'initiation de polymérisation, (photo-initiation sous rayonnement ultra-violet ou initiation par chauffage à 60 °C dans un bain-marie). Les polymères produits présentaient des duretés, porosités, rigidités et capacités différentes. Les auteurs ont démontré que la capacité

de recapture, la spécificité et les capacités chimiques et thermiques de ces MIPs dépendent directement de leur morphologie de surface.

3.4.2 *Polymérisation par précipitation*

Cette méthode implique la dissolution du mélange de prépolymérisation (molécule empreinte/monomère fonctionnel) dans le solvant adéquat et la polymérisation se fait dans la solution diluée. La croissance des particules se produit principalement par précipitation entropique sous forme de nanogels « seeds », suivie par la capture continue d'oligomères de la solution par ces nanogels (grossissement des particules en suspension). Des particules sphériques monodispersées peuvent être préparées avec un bon rendement, et il est possible d'optimiser la taille et la porosité des particules en contrôlant les conditions de polymérisation (Yoshimatsu, Reimhult, Krozer, Mosbach, Sode & Ye, 2007). L'application de la polymérisation par précipitation aboutit à des particules sphériques de diamètres inférieurs à 1 μm .

3.4.3 *Polymérisation multi-étapes*

La polymérisation multi-étape ou en anglais « *multi-step swelling* » est l'une des méthodes alternatives adaptées ces dernières années pour préparer des MIP pouvant être utilisés comme phase stationnaire imprimée. Ce MIP obtenu par *multi-step swelling* est censé posséder une bonne efficacité d'interaction et une haute vitesse de transfert de masse. La polymérisation « *multi-step swelling* » utilise des billes de polystyrène comme support de MIP. Les billes sont mises en suspension, sous agitation, dans différentes solutions entraînant leur gonflement. Au terme de trois étapes de gonflement, d'une durée de 2 à 3 heures chacune, les billes sont mises en contact avec des réactifs nécessaires à la synthèse d'un MIP (molécule empreinte, monomère, agent réticulant, solvant porogène). L'étape ultime est la polymérisation en surface des billes de polystyrène gonflées pendant une durée de 20 heures. Ce protocole permet d'obtenir une distribution étroite en taille des particules. Cependant, étant donnée la durée de la synthèse supérieure à 20 h, on lui préfère la polymérisation en suspension si l'homogénéité parfaite en taille des particules n'est pas nécessaire.

Des polymères sphériques micrométriques imprimés avec une distribution étroite ont été préparés par différentes techniques (Lei & Tong, 2005). Des particules uniformes sphériques ont été obtenues en utilisant le procédé de polymérisation multi étapes (Hosoya et al., 1996). Les particules peuvent être préparées directement sous la forme de billes sphériques de diamètre contrôlé. Des billes synthétisées avec cette méthode peuvent être rendues magnétiques en y incluant des particules d'oxyde de fer. Les particules obtenues en utilisant la polymérisation multi étapes sont relativement mono dispersées et homogènes en taille et en forme et bien adaptées aux applications de chromatographie. Cependant des procédures complexes et des conditions compliquées de synthèse sont exigées et la suspension aqueuse utilisée dans cette méthode peut interférer durant l'impression et conduit ainsi à une baisse de sélectivité.

3.4.4 *Polymérisation en suspension*

Une méthode assez simple pour la préparation de supports imprimés est la polymérisation en suspension qui donne des agrégats de particules sphériques et si le système est suffisamment dilué, des microsphères de taille uniforme. Par différence avec la technique décrite dans le paragraphe 3.4.2. (Synthèse Par Précipitation), les sphères restent en suspension et ne précipitent pas. L'avantage de cette voie réside dans la rapidité de la synthèse. Des particules imprimées peuvent être obtenues en 10-15 min après exposition au rayonnement UV. La polymérisation dans des solvants perfluorés a été étudiée (Ansell & Mosbach, 1997). En effet, dans les systèmes de deux phases, l'utilisation des perfluorocarbones au lieu de l'eau comme phase continue est préférée car l'eau influence les interactions entre le monomère et la molécule empreinte. La taille des particules est comprise entre 5 et 50 μm et dépend de la vitesse d'agitation et de la quantité de surfactant. Bien que des microsphères d'excellentes performances chromatographiques aient été obtenues par cette méthode ainsi qu'une bonne sélectivité même à des débits élevés, le coût des solvants perfluorés et des surfactants fluorés impose des limites à l'applicabilité de la polymérisation par suspension.

3.4.5 *Polymérisation par émulsion « core shell »*

Les nanoparticules core shell sont des particules formées d'un matériau « core » à l'intérieur d'un autre matériau de revêtement « shell ». Elles sont synthétisées en une procédure de deux étapes. Tout d'abord, un coeur insoluble (core) est synthétisé suivant une polymérisation conventionnelle par émulsion. Elle est ensuite incubée dans une seconde émulsion contenant les monomères et les initiateurs qui vont synthétiser la couverture ou l'enveloppe (shell). L'enveloppe (shell) peut subir une impression moléculaire en introduisant la molécule empreinte dans l'émulsion. L'avantage de cette molécule est surtout la possibilité de modifier des propriétés du coeur (core) sans interférer avec l'enveloppe (shell) imprimée. Les particules obtenues par cette méthode ont une taille colloïdale de l'ordre de 0,05–2 µm. (Pérez-Moral et al., 2004).

3.4.6 *Polymérisation par synthèse d'un monolithe in situ*

Cette méthode est très simple comparée avec les procédures conventionnelles. La structure macroporeuse du polymère résultant a des propriétés hydrodynamiques excellentes. Avec cette technique, les MIPs peuvent être synthétisés dans des colonnes d'acier inoxydable ou des colonnes capillaires. La molécule empreinte, l'agent réticulant, le monomère fonctionnel et l'initiateur sont dissous dans le solvant porogène et le mélange ainsi obtenu est dégazé puis introduit dans une colonne de chromatographie ou dans une colonne capillaire. La polymérisation s'opère directement dans la colonne. Il n'y a plus besoin de broyer le MIP monobloc ou d'effectuer une synthèse de sphères en dispersion ou par précipitation et de remplir la colonne par ces particules. Le rapport coût/efficacité de la méthode est relativement faible vue la faible quantité nécessaire de molécule empreinte (Liu, Xu, Yan & Gao, 2005). Plusieurs applications utilisent ce type de phase stationnaire pour la séparation (Tennikova & Freitag, 2000). L'intérêt de cette méthode est surtout reconnu pour les applications chromatographiques.

3.4.7 Polymérisation et impression sur surface

Le greffage de couches préformées de MIP en surface des billes de silice a été récemment proposé comme nouvelle technique pour l'obtention de matériaux imprimés de qualité chromatographique. Dans cette méthode, des couches minces imprimées ont été déposées avec succès en tant que revêtements sur la surface d'une silice poreuse en utilisant plusieurs techniques pour contrôler la polymérisation radicalaire à la surface des billes (Sellergren, Rückert & Hall, 2002). La dissolution du gel de silice donne des billes de polymère imprimées en surface uniquement et de structure poreuse. Toutes les empreintes sont accessibles par les pores et permettent ainsi d'améliorer la capacité ainsi que la cinétique de recapture de la molécule empreinte (Bérenghère, 2007).

L'impression par immobilisation de la molécule cible sur un support solide a été adoptée par Mosbach et al (Yilmaz, Haupt & Mosbach, 2000). Ces derniers ont immobilisé la théophylline sur le support d'un gel de silice dérivatisé par l'aminopropyl (**Figure 9**).

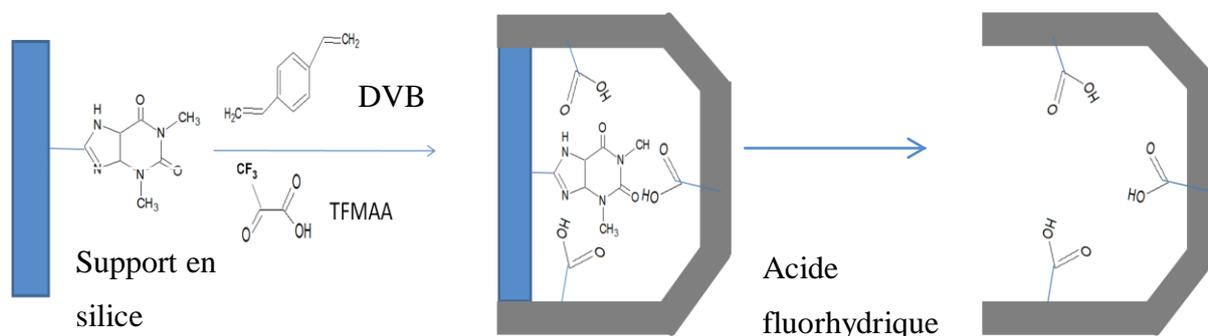


Figure 9 synthèse d'un MIP pour la théophylline par immobilisation de la molécule cible sur un support en silice (Yilmaz et al., 2000).

Après ajout du DVB et du TFMAA, les empreintes ont été formées. L'acide fluorhydrique permet de dissoudre la silice et de générer les cavités imprimées.

4 Caractérisation des MIP formés : structure, aptitudes séparatives...

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

4.1 Mise en évidence de la formation d'empreintes

L'étude de la formation d'empreintes au sein d'un MIP est réalisée par trois méthodes : l'analyse par chromatographie liquide haute pression, l'analyse par chromatographie frontale et l'analyse en batch par le suivi des équilibres thermodynamiques de recapture.

L'évaluation du MIP par chromatographie analytique consiste à injecter une solution contenant la molécule empreinte sur une colonne remplie de particules de MIP, à travers laquelle circule une phase mobile constituée majoritairement du solvant porogène. La même expérience est réalisée sur une seconde colonne remplie de NIP (polymère non imprimé). Le facteur d'impression, noté I , est défini comme le rapport des facteurs de rétention, k , de la molécule empreinte sur le MIP et le NIP respectivement, soit : $I = k_{\text{MIP}}/k_{\text{NIP}}$. Ce facteur d'impression renseigne sur la présence de sites spécifiques de reconnaissance dans le MIP. Lorsqu'il est supérieur à 1, la molécule étudiée présente une affinité spécifique pour les empreintes du MIP. Le facteur d'impression dépend du rapport entre le nombre d'interactions spécifiques propres aux empreintes et le nombre d'interactions non spécifiques dues à la matrice polymérique, soit la sélectivité du MIP par rapport au NIP (Cheong, Rachkov, Park, Yano & Karube, 1998).

L'analyse par chromatographie frontale exploite le volume de fin de fixation de l'analyte présent dans la phase mobile percolée à travers une colonne remplie de polymère. La quantité d'analyte adsorbée sur le polymère (MIP ou NIP), à l'équilibre, est déterminée à partir du

volume de fin de fixation (Kim, Kaczmariski & Guiochon, 2006). Il y a autant d'analyses frontales que de valeurs de concentration d'analyte étudiées. Chacune de ces analyses apporte un point expérimental caractérisé par la concentration de l'analyte dans la phase mobile et sa quantité adsorbée à l'équilibre.

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

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

L'abscisse reporte :

- soit la concentration F (free) de molécule empreinte non adsorbée,
- soit la masse de polymère introduite dans chaque flacon.

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

Selon Q.Z. Zhu, la présence d'interactions non spécifiques est identifiable par l'allure de l'isotherme d'adsorption du MIP (Zhu, Haupt, Knopp & Niessner, 2002). Si les interactions non spécifiques sont nulles :

- un plateau de saturation sur la courbe du MIP est obtenu à partir d'une certaine valeur de F,
- la quantité de molécule empreinte adsorbée par le NIP est nulle, quelle que soit la concentration initiale introduite dans le flacon. (Voir **Figure 11**, matériels et méthode, paragraphe 2.2.)

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

4.2 Porosité, surface spécifique

La comparaison des matériaux polymériques par tracé d'isothermes peut être complétée par une étude morphologique. La taille des pores et la surface spécifique peuvent être évaluées par porosimétrie à mercure et par tracé des isothermes d'adsorption d'azote selon la méthode BET (Brunauer, Emmet and Teller) (Spivak, 2005). La porosité conditionne la vitesse du transfert de masse des molécules à travers le matériau polymérique. La taille des pores (macro, méso et micro) dépend des conditions de synthèse, i.e. la nature, la proportion en solvant porogène, celle en agent réticulant ainsi que la température (Lu et al., 2004). Il existe encore pour évaluer la porosité des matériaux des techniques d'intrusion de gaz, le MIP étant sur le plateau d'une microbalance, et la molécule cible à l'état gazeux.

Des clichés obtenus par microscopie (optique ou électronique à balayage) permettent de mesurer le diamètre moyen des particules et de repérer les macropores à la surface de certains grains. On peut ainsi comparer la morphologie des particules de MIP selon la nature du solvant porogène et selon le protocole de synthèse (Gonzlez et al., 2006). La granulométrie laser ou la Diffusion Dynamique de Lumière (DLS) peuvent quantifier une taille moyenne d'une particule supposée sphérique mais pas sa porosité. Cependant le rapport surface sur volume conditionne autant la vitesse de transfert que la porosité et cette mesure de taille de particules sphériques complète les mesures de porosité.

5 Pesticides

5.1 Toxicité

La présence de niveaux élevés de résidus de pesticides dans la chaîne alimentaire européenne est le résultat direct de la dépendance aux pesticides de l'agriculture conventionnelle. Chaque année, plus de 220 000 tonnes de pesticides sont annuellement épandus dans l'environnement européen. Une grande partie des fongicides synthétiques appliquée aux raisins présente d'importants risques pour la santé humaine. Par exemple, les dithiocarbamates, une famille de produits chimiques qui représentent 49 % des fongicides appliqués aux raisins, et qui comprennent les pesticides manèbe et mancozèbe sont à la fois classés par l'Union Européenne (UE) comme substances carcinogènes et perturbateurs endocriniens. D'autres fongicides appliqués en plus petites quantités, comme le folpet ou iprovalicarbe, sont connus pour leurs dangers pour la santé humaine. L'iprodione et le procymidone sont aussi classés cancérigènes. Selon l'UE, le dernier est en outre un reprotoxique et un perturbateur endocrinien. Parmi les résidus les plus souvent détectés dans le raisin (PAN-Europe, 2008b), se trouvent plusieurs fongicides synthétiques: la procymidone, le dicarboximide ont été détectés dans 22,4 % des échantillons de raisins évalués. L'iprodione et l'imidazole ont été détectés dans 16,3 % des échantillons de raisins évalués.

Des études françaises effectuées montrent le potentiel de transfert des pesticides au cours du processus de vinification. En 2005, le ministère français de l'agriculture a publié des données provenant des producteurs de vins français (Curgier J-P, 2005). Cette étude a été effectuée dans l'ensemble des 13 régions viticoles de France portant sur 14 ans. 1316 échantillons de raisins entrant dans le processus de vinification ont été évalués pour la présence de pesticides. Une fois que la production de vin a été achevée, les vins ont ensuite été analysés de nouveau pour la présence de pesticides.

Cette étude a conclu que 30 % des pesticides inclus dans l'analyse pourraient être transférés dans les vins, et a identifié 15 pesticides "systématiquement" détecté à la fois dans le raisin et le vin. Ces 15 pesticides comprennent sept fongicides synthétiques lié à des dangers spécifiques pour la santé humaine.

La substance active avec le plus haut taux de transfert était l'iprodione. Elle a été détectée dans 100 % des échantillons de vins à partir de raisins contaminés par les pesticides. Le procymidone (93 %), l'azoxystrobine (90 %), l'iprovalicarbe (86 %) et le pyriméthanil (85 %) ont également montré une forte présence parmi les échantillons de vin élaboré à partir de raisins contaminés.

5.2 Méthodes de quantification

Les méthodes utilisées pour détecter et quantifier les résidus de pesticides dans le vin doivent être très sensibles et sélectives. La tendance récente vers des méthodes multi-résidus, la nécessité d'une plus grande sélectivité et d'une plus grande sensibilité ont été atteintes par chromatographie en phase liquide (LC) ou par chromatographie en phase gazeuse (GC) couplés avec la spectrométrie de masse (MS) ou la spectrométrie de masse en tandem (MS-MS) (Bailey et al., ; Nougadère et al., 2012; Whitacre et al., 2009). La GC-MS est une combinaison bien établie pour la détermination des pesticides dans les vins (Mosbach, 1994), mais seulement quelques applications utilisant la LC-MS ou la LC-MS-MS pour la détermination multi-résidus de pesticides dans les vins ont été signalées au cours des dernières années (Geai, 2013). Ces outils analytiques sont certes performants, mais très onéreux à l'achat et exigent un personnel technique de bon niveau formé pour l'utilisation de ces outils.

PARTIE 2

MATERIELS ET METHODES

1 Synthèse

La molécule cible étant l'iprodione, il nous fallait choisir une molécule empreinte. Tout au long de cette étude, nous avons utilisé l'iprodione comme molécule cible et comme molécule empreinte. La molécule empreinte doit être compatible avec la polymérisation radicalaire, et ne doit pas participer au mécanisme réactionnel ni inhiber la polymérisation. Pour vérifier cette hypothèse, un test utilisant un chromophore radicalaire, le DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrozyl) habituellement utilisé pour évaluer la capacité antioxydante, a été réalisé. Pour démontrer que l'iprodione ne participe pas aux réactions radicalaires de la polymérisation, il faut que la densité optique du mélange DPPH[•]/iprodione ne décroisse pas au cours du temps. Dans ce cas l'iprodione n'est pas considérée comme étant un capteur de radicaux et pourra être utilisée pour la synthèse de nos polymères. Dans un deuxième temps, pour la synthèse d'un MIP spécifique de l'iprodione, il a fallu faire un choix du/des monomères fonctionnels. Pour ce faire, nous avons eu recours à la modélisation moléculaire.

1.1 Choix de la molécule empreinte

L'iprodione est un fongicide présent dans la majorité des vins français (Plan de surveillance résidus en Viticulture Campagnes viticoles 1990-2003) avec une teneur moyenne de 160 µg/L et une valeur maximum de 580 µg/L. Sa limite maximale de résidu (LMR) autorisée dans le vin est de 2000 µg/L, alors que dans l'eau elle est de 0,1µg/L (Les résidus de pesticides, La Vigne N°217). Etant non biodégradable, l'iprodione présente un risque d'accumulation et son utilisation va expirer le 31 octobre 2016 (2012).

1.2 DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrozyl)

Pour l'évaluation du potentiel anti-radicalaire d'un composé, une des approches appliquées est le test au 2,2-diphényl-1-picrylhydrozyl (DPPH[•] ; CAS number : 1898-66-4 ; log P = 2,7). Le radical DPPH[•] présente une bande d'absorption à 515 nm qui disparaît après capture du radical par un composé antioxydant. L'absence de diminution de densité optique dans notre cas pourrait nous confirmer que l'iprodione n'a pas de capacité anti-radicalaire et par conséquent ne participe pas à la réaction de polymérisation radicalaire du MIP. Pour évaluer la capacité anti-radicalaire de l'iprodione, 5 mL d'une solution $1,72 \cdot 10^{-4}$ M de DPPH dans l'isooctane ont été mélangés

avec 5 mL d'une solution $8,48 \cdot 10^{-3}$ M d'iprodione dans l'acétate d'éthyle. L'antioxydant de référence utilisé était le BHT (buty-hydroxy-toluène). Le suivi des densités optiques des mélanges a été fait sur une durée de 508 heures en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis Jasco V530.

1.3 Choix du monomère fonctionnel : modélisation moléculaire

Les mélanges de prépolymérisation (iprodione – monomères fonctionnels) ont été simulés par dynamique moléculaire afin de choisir le monomère fonctionnel formant l'interaction la plus stable avec l'iprodione. Ces mélanges sont composés de l'iprodione et de 10 monomères fonctionnels parmi les plus utilisés dans la littérature. Ces 10 monomères fonctionnels ont été préalablement choisis en examinant leur structure, qui suggère qu'ils sont susceptibles d'interagir favorablement, de manière non-covalente, avec l'iprodione (**Figure 2**). Pour mener cette étude le programme CHARMM a été utilisé (Brooks et al., 2009a) avec les paramètres du champ de force CGenFF (Vanommeslaeghe et al., 2010) (Version 2B7), qui ont été générés automatiquement par le programme CGenFF (Vanommeslaeghe & MacKerell, 2012) (version 0.9.6), accessibles sur paramchem.org. Aucune autre optimisation de ces paramètres n'a été réalisée.

L'algorithme SHAKE (Vanommeslaeghe et al., 2012) a été utilisé pour fixer la longueur de toutes les liaisons impliquant un atome d'hydrogène et les équations du mouvement ont été intégrées avec l'algorithme de « Verlet leapfrog » en utilisant un pas de temps de 1 fs . Les forces d'interactions de van der Waals ont été annulées par une fonction de « switch » entre 8 et 10 Å (l'énergie des forces de Van der Waals est proportionnelle à l'inverse de la distance interatomique à la puissance 6) et les règles de mélange de Lorentz - Berthelot ont été utilisées pour les interactions croisées. La méthode « particle mesh Ewald » a été considérée pour tenir compte des interactions électrostatiques, avec $\kappa = 0.33 \text{ \AA}^{-1}$ et l'espacement de la grille de la transformée de Fourier rapide a été fixé à $\sim 1 \text{ \AA}$.

Le toluène a été utilisé comme solvant pour les essais de polymérisation. Les mélanges ont été préparés comme suit: d'abord, une boîte de simulation cubique contenant 128 molécules de toluène a été générée. Ensuite, l'iprodione a été placée au centre de cette boîte, et les monomères

fonctionnels ont été insérés avec des positions et des orientations aléatoires, avec un critère de distances minimales molécule empreinte/monomère et monomère/monomère de 4 et 5 Å respectivement. Enfin, chaque molécule de toluène se superposant à la molécule empreinte ou à un monomère a été éliminée. L'énergie des configurations générées a d'abord été minimisée au moyen de l'algorithme de plus grande pente (1000 itérations) en trois étapes successives : (i) en fixant les positions atomiques de la matrice et des monomères, (ii) en fixant uniquement les positions des atomes lourds du modèle, et (iii) sans aucune contrainte sur aucun atome de la boîte de simulation.

Une minimisation finale de 2000 itérations avec l'algorithme du gradient conjugué a été effectuée. Une simulation de dynamique moléculaire de 10 ps dans l'ensemble microcanonique (N, V, E) a ensuite été réalisée pour chauffer le système de 100 °K à 298 °K. Enfin, des simulations de dynamique moléculaire de 2 ns dans l'ensemble isotherme-isobare (N, P, T) avec T = 298 °K et P = 1 atm ont été effectuées.

1.4 Synthèse des polymères à empreintes moléculaires

La molécule cible étant l'iprodione, pouvant facilement faire des interactions hydrogène, la voie non covalente a été adoptée pour les différentes synthèses effectuées. En premier temps, un MIP a été synthétisé en utilisant le méthacrylamide et l'EGDMA pour la copolymérisation en masse. Ensuite différents MIPs ont été synthétisés suivant un plan d'expériences. Les parties ci-dessous décrivent les synthèses ainsi que les méthodes et les approches utilisées.

1.4.1 Synthèse du premier iprodione-MIP

Pour commencer notre travail de recherche, nos premières expériences ont surtout porté sur « la faisabilité » d'un MIP spécifique de l'iprodione. Les polymères synthétisés devaient être capables d'extraire l'iprodione à partir d'un milieu hydro-alcoolique, visant ainsi une application potentielle dans le vin. Parmi les différentes voies décrites dans la littérature, nous avons opté pour la mise au point d'une stratégie de synthèse reposant sur l'approche non covalente tout en procédant par polymérisation en masse. Cette stratégie étant la plus simple et la plus facile à mettre en œuvre. Pour effectuer cette première synthèse, les réactifs suivants devaient être sélectionnés : le monomère fonctionnel, l'agent réticulant, le solvant ainsi que l'initiateur. En

premier lieu, le choix du monomère est d'une grande importance par rapport à la sélectivité résultante du MIP. Le monomère idéal doit développer de fortes interactions avec la molécule empreinte. Parmi une librairie de monomères fonctionnels les plus couramment utilisés dans l'approche non covalente, il s'agissait pour nous d'en choisir celui qui a le plus d'affinité vis-à-vis de l'iprodione. Cette information a été obtenue en se basant sur la modélisation moléculaire. Le méthacrylamide a été choisi comme monomère fonctionnel de polymérisation pour effectuer la première synthèse, la réticulation étant assurée par l'agent réticulant : l'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA). L'initiation de la réaction a été faite par voie photochimique en exposant le mélange (empreinte, monomère, réticulant) additionné d'un promoteur à un rayonnement UV. Cette voie est la plus favorable selon des études d'optimisation qui ont montrée l'effet négatif du chauffage sur la synthèse. L'initiateur (ou promoteur) était le 2,2'-diméthyl-2-phénylacétophénone (DMPAP) qui, sous les rayonnements UV, subit une scission radicalaire et donne deux composés radicalaires comme cela est décrit dans la partie de synthèse bibliographique (Figure 4).

La synthèse a été faite en utilisant le ratio molaire de 1/4/20 iprodione/MAM/EGDMA avec 2 g d'iprodione pour 100 mL de solvant. La polymérisation a eu lieu dans 5 mL de toluène avec 65 mg de DMPAP.

Les réactifs sont mis en présence dans un flacon de 17 mm de diamètre interne et 10 mL de volume. Le mélange est agité à l'aide d'un barreau et d'un agitateur magnétique. Après dégazage par ultrasonication pendant 5 min, le flacon est placé à 10 cm d'une lampe à rayonnement UV (366 nm) pendant une nuit. La polymérisation aboutit à un monolithe. Un polymère non-imprimé est synthétisé en parallèle à partir des mêmes réactifs cités précédemment sans y ajouter l'iprodione. Le monolithe obtenu est brisé à l'aide d'un objet pointu (qui peut être introduit dans le flacon) pour pouvoir le détacher des parois du flacon, puis transvasé dans un mortier pour être broyé en poudre.

Afin d'éliminer la molécule empreinte et ainsi libérer les cavités, le MIP subit deux lavages successifs aux ultrasons avec un mélange acide acétique/éthanol (30/70, v/v). Chaque étape de lavage du monolithe de 2 g de masse nécessite 10 mL de solvant, et dure 20 minutes. On continue ensuite avec des lavages successifs à l'éthanol jusqu'à ce qu'on ne puisse plus détecter

l'iprodione par HPLC dans les eaux de lavage. La séparation des phases se fait par centrifugation pour récupérer le polymère. Les particules de polymères sont séchées à 65 °C pendant une nuit. Finalement, le polymère obtenu est conservé dans le dessiccateur (P_2O_5). La **Figure 10** présente le schéma de synthèse.

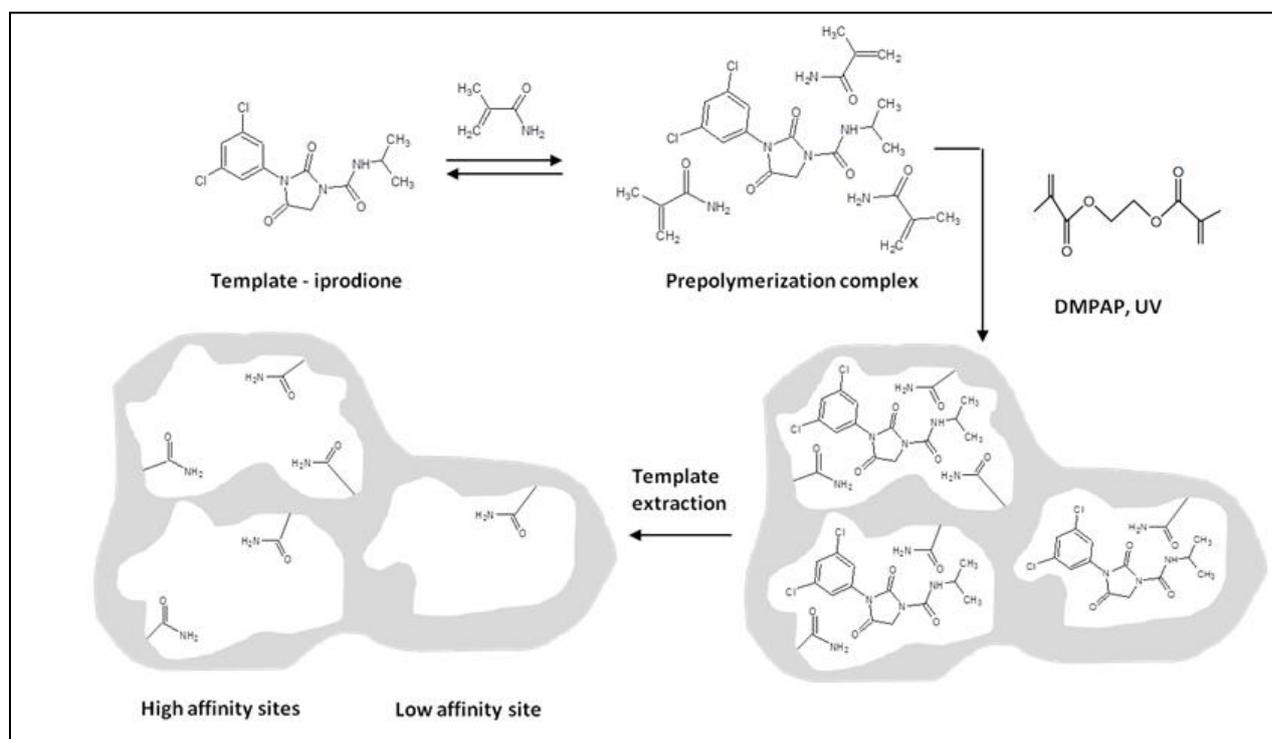


Figure 10 Schéma résumant les étapes de synthèse d'un polymère à empreintes moléculaires spécifique de l'iprodione à partir du méthacrylamide comme monomère fonctionnel, de l'éthylène glycol diméthacrylate comme agent réticulant, par initiation photochimique avec le 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone (DMPAP), et élimination de l'iprodione donnant lieu à des sites de faible affinité et des sites de forte affinité.

1.4.2 Plan d'expériences

La planification des expériences permet d'obtenir des résultats en moins de temps qu'un plan complet (combinaison complète de tous les facteurs entre eux) avec un rapport qualité/temps-prix satisfaisant, en admettant que toute l'information est contenue dans les conditions

expérimentales. Nous devons, avant toute expérimentation, bien définir sa taille et le domaine expérimental possible (ou domaine d'opérabilité) réduit au domaine expérimental d'intérêt dans lequel nous recherchons l'information désirée. Pour des raisons pratiques, la taille du plan d'expériences était fixée à $2^3 = 8$ synthèses, étant donné que la synthèse de la série des MIPs doit s'effectuer exactement dans les mêmes conditions (qui ne font pas partie des facteurs étudiés), et que pour chaque polymère imprimé, corresponde un polymère non imprimé de contrôle (NIP). La matrice résultante correspond à **un plan d'expériences de trois facteurs à deux niveaux chacun**. Il s'agissait pour nous de définir la liste des facteurs d'entrée susceptibles d'avoir de l'influence sur les réponses ou sur les facteurs de sortie tels que les propriétés du polymère : à savoir sa capacité, sa sélectivité, sa spécificité et son facteur d'impression.

Les principaux paramètres d'entrée qui ont une influence sur la synthèse d'un MIP sont selon notre synthèse bibliographique : la voie de polymérisation, l'approche de synthèse, la nature du monomère fonctionnel, de l'agent réticulant, du solvant porogène et de l'initiateur. Nous avons choisi les paramètres influençant le plus fortement la qualité du polymère grâce aux travaux antérieurs de différents auteurs et non par un screening. Les trois facteurs retenus pour en étudier les effets sur les 8 MIPs et les 8 NIPs sont : la nature du monomère fonctionnel, la nature de l'agent réticulant et la voie de polymérisation.

1.4.2.1 Nature du monomère fonctionnel

En se basant sur la modélisation moléculaire (Cf 1.3), on a choisi le méthacrylamide comme premier niveau du facteur « monomère fonctionnel » (-1). Pour choisir le niveau +1, on s'est basé sur le fait que la variété des fonctions présentes dans les différents monomères permet d'optimiser la sélectivité et l'affinité du MIP pour la molécule recherchée en fonction des caractéristiques fonctionnelles de cette dernière. On a par la suite choisi d'ajouter un monomère qui apporte des interactions π - π en plus des interactions dipôle-dipôle (la molécule empreinte possède un cycle aromatique) : le styrène.

Les niveaux du facteur « nature du monomère fonctionnel » sont : méthacrylamide (-1) et mélange méthacrylamide/styrène (+1).

1.4.2.2 Voie de polymérisation

Pour l'optimisation de l'étape de synthèse, un des facteurs les plus importants est « la voie de polymérisation » qui détermine le format du polymère obtenu : polymère en masse à pulvériser ou un précipité de sphères.

Les particules obtenues par polymérisation en masse ne sont pas sphériques à la pulvérisation mécanique, ce qui peut être gênant pour certaines applications (Hugon-Chapuis et al., 2007) et ont une hétérogénéité de tailles qui influence la répétabilité des extractions (probabilité d'y avoir différentes surfaces spécifiques pour la même masse de polymère). En outre, il est estimé que seulement 20 % des sites de reconnaissance sont conservés après l'étape de broyage du monolithe obtenu suite à la polymérisation en masse.

Pour remédier à ces problèmes, une des alternatives est la synthèse par précipitation. Elle repose sur la dilution du mélange de monomères fonctionnels et de molécule empreinte dans le solvant porogène. Les particules obtenues après polymérisation par précipitation sont fines, sphériques et de taille homogène. Le rendement de synthèse est élevé car l'intégralité des particules est récupérée par centrifugation.

Les 2 niveaux du facteur « voie de polymérisation » sont : polymérisation en masse (-1) et polymérisation par précipitation (+1).

La synthèse des MIPs sous la forme de monolithes a été faite comme décrit dans le paragraphe 1.4.1. La synthèse par précipitation a été faite selon le rapport molaire 1/4/20, molécule empreinte/monomère fonctionnel/ agent réticulant dans 20 mL de solvant porogène.

1.4.2.3 Nature de l'agent réticulant

La sélectivité des MIPs est influencée par le type et la quantité d'agent réticulant. Si les performances d'un MIP dépendent principalement des interactions monomères fonctionnel/molécule empreinte, la nature de l'agent réticulant est un paramètre à considérer attentivement. Son choix a une influence sur le nombre de sites non spécifiques, étant donné qu'il forme la charpente du polymère.

Classiquement, le divinylbenzène, l'éthylène glycol diméthacrylate EGDMA (2 liaisons vinyliques) et le triméthylolpropane triméthacrylate TRIM (3 liaisons vinyliques) sont couramment utilisés.

Les niveaux du facteur « nature de l'agent réticulant » sont : TRIM (-1) et EGDMA (+1)

2 Etudes d'extraction

La capacité des polymères imprimés à reconnaître les molécules empreintes à partir desquelles ils ont été préparés, est la propriété la plus importante de ces matériaux. Compte tenu de la nature solide des MIPs, l'utilisation de ces polymères comme phase stationnaire en chromatographie est une des applications les plus importantes pour évaluer leur capacité et leur sélectivité vis-à-vis de l'analyte. La méthode chromatographique, tout en restant la plus simple à mettre en œuvre pour ces types de systèmes, ne permet pas d'évaluer l'hétérogénéité des sites d'interactions des MIP. La méthode la plus utilisée pour l'évaluation de l'hétérogénéité des sites et de la capacité des MIP reste « l'extraction en batch » (Curcio, 2009). La chromatographie liquide haute performance a été utilisée pour la quantification de la molécule empreinte après étude de recapture.

2.1 Chromatographie liquide à haute performance (*High Performance Liquid Chromatography HPLC*)

La Chromatographie Liquide Haute Performance est une technique chromatographique utilisée pour la séparation et le dosage des différents constituants d'un mélange.

L'échantillon, composé d'un mélange de constituants, est injecté dans la boucle d'injection via une seringue. La phase mobile va alors l'entraîner à travers la colonne contenant la phase stationnaire. En HPLC, la phase mobile est un solvant qui doit remplir deux fonctions :

- Eluer et solubiliser les composés,
- Interagir avec les composés du mélange.

Le choix du solvant dépendra de la phase stationnaire choisie.

En ce qui concerne la phase stationnaire, elle est greffée ou imprégnée sur la colonne. Il existe deux grands types de phases stationnaires :

- Phases polaires où on parlera de chromatographie en phase normale. La phase mobile devra être dans ce cas apolaire.

- Phases apolaires, ici on parlera de chromatographie en phase inverse où la phase mobile devra être polaire.

Un grand nombre de matériaux peuvent être utilisés pour la confection de phase stationnaire, mais le gel de silice reste le principal.

Nous avons travaillé en phase inverse avec une colonne octadécylsilane et une phase mobile acétonitrile/eau (60/40, v/v). Nous avons utilisé une chaîne HPLC Shimadzu (LC-20AT) équipée d'un détecteur UV-Visible Shimadzu (SPD-20A), d'une colonne Restek (Pinacle 2, C18, 5 μm , 150 \times 4,6 mm) ayant un préfiltre de 4 mm de diamètre et 2 μm de taille de pores, et d'un logiciel (LC solutions version 1.25 Software). Le débit de la phase mobile était de 1 mL/min. La longueur d'onde utilisée pour nos mesures était de 220 nm.

2.2 Etudes d'extraction en batch et isothermes d'adsorption

Cette méthode implique la mise en contact dans un flacon thermostaté du MIP avec une solution contenant la molécule cible. Une fois l'équilibre atteint, la solution est centrifugée et la quantité de molécules cibles restant en solution est analysée par HPLC. Cette méthode est la plus courante car très simple à mettre en œuvre. Les isothermes d'adsorption sont représentées de différentes façons, l'ordonnée reporte :

- soit la quantité de molécule cible adsorbée, notée B (pour Bound),
- soit la fraction de molécule cible adsorbée par le polymère (B/T) où T (pour Total) est la quantité de molécule cible introduite initialement dans le flacon.

L'abscisse reporte :

- soit la concentration F (pour Free) de molécule empreinte non adsorbée,
- soit la masse de polymère introduite dans chaque flacon (Béregère, 2007).

Le tracé des isothermes du MIP et du NIP permet de conclure ou pas à la formation des empreintes (**Figure 11**).

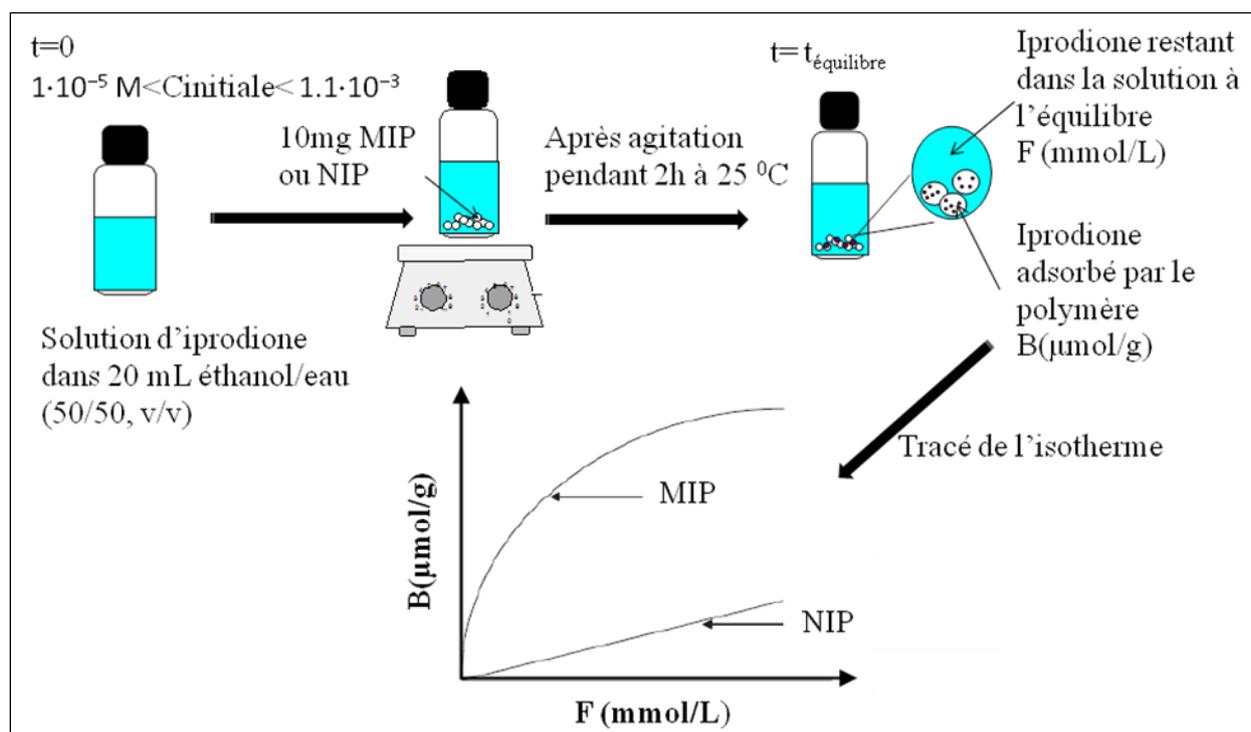


Figure 11 Les étapes de l'extraction en batch et le tracé des isothermes d'adsorption de la molécule cible par le MIP et le NIP.

L'extraction a été réalisée à partir des solutions de concentrations différentes en iprodione (entre $1 \cdot 10^{-5}$ et $1.1 \cdot 10^{-3}$ M) dans de le solvant: éthanol/eau (50/50 ; V/V). Les isothermes ont été tracées en utilisant 10 mg de polymère pour un volume de 20 mL de solution.

2.3 Caractérisation de l'extraction de l'iprodione par des modèles d'isothermes

Différentes corrélations mathématiques ont été établies entre la quantité d'iprodione adsorbée (B) et la concentration (F) restant à l'équilibre. Ces corrélations sont différentes suivant les modèles d'affinités. En général, ces modèles peuvent être regroupés en deux : homogène et hétérogène.

2.3.1 Isotherme de Langmuir

L'équation qui décrit le phénomène de reconnaissance moléculaire entre l'iprodione (I) et les sites d'interactions (S) des MIP est: $I + S \Leftrightarrow IS$ (1)

La constante d'affinité qui en résulte (K) sera:

$$K = \frac{[IS]}{[I][S]} \quad (2)$$

Cette constante est liée au nombre de sites (N_t) par la relation suivante :

$$K = \frac{B}{F(N_t - B)} \quad (3)$$

Les paramètres K et N_t sont obtenus par la régression linéaire du modèle de Langmuir donnant lieu à l'équation mathématique de Scatchard et sa résolution graphique (Tseng, 2007).

$$\frac{B}{F} = KN_t - KB \quad (4)$$

En traçant B/F en fonction de B , on peut déduire s'il s'agit d'un modèle homogène (**Figure 12a**) ou hétérogène (**Figure 12b**).

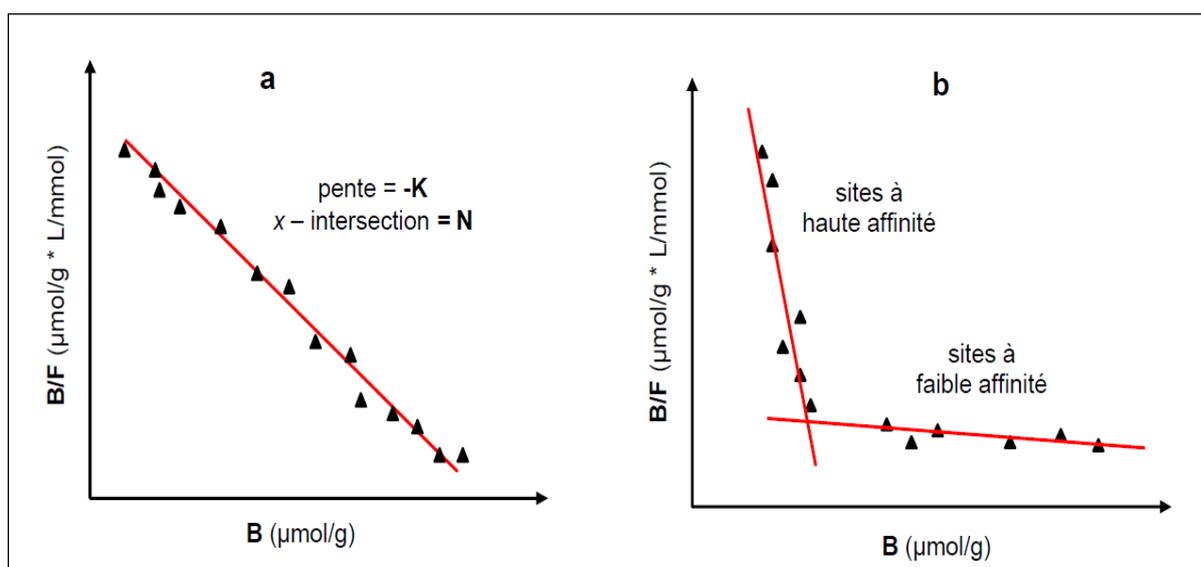


Figure 12 Tracés de Scatchard pour un polymère imprimé contenant des sites d'interaction homogènes (a) et pour un polymère imprimé contenant de sites d'interaction hétérogènes (b) (Curcio, 2009).

Le facteur de séparation, R_L , informe sur le type de l'adsorption. Il est obtenu suivant l'équation:

$$R_L = \frac{1}{(1 + KC_0)} \quad (5)$$

où C_0 est la concentration initiale de la molécule empreinte (mol.L^{-1}) et K est la constante d'équilibre de Langmuir (L.mol^{-1}) obtenue de l'équation (4) (Tseng, 2007).

Généralement les MIPs suivent le modèle hétérogène (**Figure 12b**) et le modèle d'analyse utilisant le tracé de Scatchard est très simple pour caractériser avec précision l'hétérogénéité des polymères imprimés. Le modèle de Freundlich, présenté ci-dessous, est le plus souvent utilisé dans le cas d'un modèle hétérogène.

2.3.2 Isothermes de Freundlich et distribution d'affinité

L'isotherme de Freundlich (FI) est obtenue grâce à l'équation suivante reliant B et F :

$$B = aF^m \quad (6)$$

où m correspond à l'indice d'hétérogénéité, B sont les molécules liées aux MIP (Bound) et F les molécules non associées au MIP, présentes dans le solvant (Free) et a reflète la capacité $N(K_x)$ et l'affinité (K_x). Lorsque m est proche de 1, la surface du polymère tend à être homogène. De plus, les paramètres de Freundlich, a et m , permettent de tracer des courbes de distribution d'affinité $N = f(K_x)$ (N : nombre apparent de sites et K_x : la constante moyenne d'affinité).

Les systèmes qui suivent le modèle de Freundlich, suivent l'équation de distribution d'affinité (AD) (Umpleby Ii, Baxter, Rampey, Rushton, Chen & Shimizu, 2004), donnée par:

$$N(K) = 2.303am(1 - m^2)e^{-2.303m \log K} \quad (7)$$

Le nombre de sites, $N_{K_1-K_2}$ et la constante moyenne d'affinité $K_{K_1-K_2}$ sont mesurés pour les valeurs K_1 et K_2 comprises entre K_{\min} et K_{\max} (Umpleby Ii et al., 2004):

$$K_{\min} = \frac{1}{F_{\max}} \quad \& \quad K_{\max} = \frac{1}{F_{\min}} \quad (8)$$

$$N_{K_1-K_2} = a(1 - m^2)(K_1^{-m} - K_2^{-m}) \quad (9)$$

$$K_{K_1-K_2} = \frac{m}{m-1} \frac{K_1^{1-m} - K_2^{1-m}}{K_1^{-m} - K_2^{-m}} \quad (10)$$

3 Techniques caractérisation

3.1 Moyen infrarouge à transformée de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy FTIR*)

La spectrophotométrie FTIR est une technique d'analyse largement utilisée pour l'identification spectrométrique des composés organiques, souvent conjointement avec d'autres techniques telles que la spectrométrie UV-Visible, la résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse. Ses principales applications résident dans le contrôle qualité des matières premières des produits intermédiaires et produits finis. Bien que ce type de spectrométrie soit surtout répandu en analyse qualitative, plusieurs applications quantitatives commencent à voir le jour.

Le domaine de l'IR s'étend de 0,78 à 1000 micromètres, il est lui-même subdivisé en trois régions :

Le proche IR : de 0,77 à 2,5 μm , principalement exploité pour l'analyse quantitative de produits agroalimentaires. Les appareils utilisés ont une conception voisine de celle de leurs homologues en UV-Vis.

L'IR moyen : de 2,5 à 50 μm (ou 4000 à 200 cm^{-1}), principalement pour l'analyse qualitative organique aussi bien que pour la détermination de structure. La région la plus exploitée reste quand même celle s'étendant de 2,5 à 25 μm c'est-à-dire de 4000 à 400 cm^{-1} .

L'IR lointain : de 50 à 1000 μm particulièrement utile pour l'étude des espèces inorganiques.

Dans la spectroscopie moyen infrarouge (MIR), le rayonnement IR n'est pas assez énergétique pour induire des transitions électroniques, il ne peut affecter que les différents niveaux d'énergie de vibration et de rotation. Lorsqu'une radiation IR rencontre cette molécule, le champ photonique de l'onde peut interagir avec la molécule (les orbitales liantes) et entraîner une modification de l'amplitude de l'un de ces mouvements et par conséquent l'absorption de l'onde.

Plusieurs types d'appareils sont destinés aux mesures dans l'infrarouge :

Les photomètres non dispersifs ont été mis au point pour l'analyse quantitative de nombreuses molécules organiques dans l'atmosphère : monoxyde de carbone, dioxyde de soufre, cyanure d'hydrogène...

Les appareils dispersifs sont des appareils enregistreurs à double faisceau équipés de réseaux à réflexion. Ce type d'instrument à double faisceau est moins sensible aux fluctuations de la source et du détecteur, ce qui nécessite une forte amplification du signal en raison de l'intensité relativement faible des sources infrarouges et de la sensibilité peu élevée des transducteurs.

Les appareils multiplex basés sur la transformation de Fourier. De nos jours, ils sont moins volumineux, fiables et d'un entretien facile. Ces appareils ont largement remplacé les appareils dispersifs au laboratoire. Les avantages des spectromètres à transformée de Fourier sont multiples :

Le rapport signal/bruit supérieur à celui des appareils dispersifs ; il y a donc la possibilité de balayage plus rapide, un pouvoir de résolution supérieure, des fréquences connues avec une meilleure exactitude et un système optique moins absorbant.

Les spectres infrarouge de nos échantillons ont été tracés sur le spectromètre « Perkin Elmer spectrum 65 FT-IR spectrometer ». Les acquisitions ont été effectuées sur une gamme de nombre d'onde allant de 4000 cm^{-1} à 600 cm^{-1} . La résolution était de 4 cm^{-1} et le nombre d'accumulations pour chaque expérience était de 64.

3.2 Analyse volumétrique

Lorsque l'on synthétise des matériaux solides comme les polymères (MIPs et NIPs), des analyses de volumétrie sont intéressantes. Elles permettent l'interprétation de certains résultats comme les propriétés de recapture de la molécule cible en les reliant à la structure des polymères. Cette analyse pourra se faire soit par intrusion/extrusion de fluide (mercure, eau) soit par adsorption/désorption de gaz.

Dans notre étude, l'analyse volumétrique a été faite par adsorption/désorption d'azote à une température égale à 77 K qui est la température de l'azote liquide. Un appareil ASAP 2020 a été

utilisé pour tracer les isothermes. Les mesures ont été utilisées sur environ 100 mg de solide. Avant l'analyse les échantillons ont été dégazés pendant 1h30 à 70 ° C sur un poste d'analyse ASAP 2010 ensuite pendant 1h à température ambiante.

Les analyses volumétriques couplées à des méthodes de calcul nous ont permises de caractériser les propriétés suivantes des polymères :

- **la surface spécifique (m²/g)**
- **le volume poreux : microporeux, mésoporeux et macroporeux (cm³/g)**
- **le diamètre moyen des pores (D_{pore}, nm)**

L'adsorption de l'azote sur une surface se fait par physisorption des molécules d'azote sur le support et le processus est réversible en fonction de la pression. L'isotherme d'adsorption/désorption consiste alors à tracer le volume du gaz adsorbé en fonction de la pression relative (p/p°) comprise entre 0 et 1.

Selon la classification de Brunauer, Derrington et Teller (BET), il existe 6 types d'isotherme de physisorption (Annexe 1). Ces isothermes sont caractéristiques de la porosité du matériau et des interactions de surface entre le gaz et le solide.

Si le matériau est mésoporeux ($2 \text{ nm} < D_{\text{pore}} < 50 \text{ nm}$), un décalage entre les pressions relatives apparaît lors de la désorption (isotherme de Type IV). Cette boucle d'hystérésis ainsi obtenue rend compte de la forme des pores. De Boer a classé les différentes morphologies de pores en fonction de 5 types d'hystérésis. Cette classification a été remodelée par l'Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC) en 4 types d'hystérésis (Annexe 2).

L'isotherme d'adsorption d'azote nous permet de déterminer **le volume total adsorbé** (V_{ads}) quand les pores sont remplis.

La surface spécifique, sera déterminée suivant le modèle BET qui permet de formaliser les phénomènes d'adsorption multicouches sur une surface. Cette théorie décrit la surface comme un ensemble de sites d'adsorption possédant la même énergie d'adsorption. Chaque molécule adsorbée joue le rôle d'un nouveau site d'adsorption dans la couche suivante.

En pratique pour déterminer la surface spécifique, il faut se situer dans la zone $0,05 < p/p^0 < 0,35$ (zone de validité de l'équation BET) et tracer une droite de

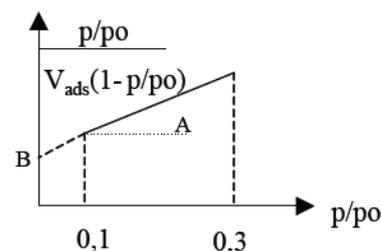
la forme $Y = AX + B$ où :

$$Y = (p/p^0)/(V_{ads}(1-(p/p^0)))$$

$$X = (p/p^0)$$

$$A = (C-1)/(V_m-C)$$

$$B = 1/(V_m C)$$



V_{ads} est le volume total adsorbé. V_m est le volume de la monocouche, il permet de calculer la surface spécifique et C est le coefficient BET.

Le calcul de la surface BET (S_{BET}) à partir du volume V_m se fait en utilisant l'équation suivante :

$$S_{BET} = V_m * A_m * N_A / V_{N_2}$$

Où V_{N_2} est le volume molaire de l'azote ($22,4 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$), N_A est le nombre d'Avogadro ($6,022 \cdot 10^{23}$) et A_m est la surface recouverte par une molécule d'azote ($0,162 \text{ nm}^2$).

3.3 Résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide ; CPMAS (Cross Polarisation Magic Angle Spinning, Polarisation croisée et rotation à l'angle magique)

La technique de rotation à l'angle magique (Magic Angle Spinning ou MAS) a été choisie dans notre étude. Elle est la plus couramment utilisée en RMN du solide lorsque l'on analyse des poudres polycristallines, des cristaux ou des matériaux polymères insolubles. La RMN MAS est dérivée de la RMN du solide. C'est une méthode d'analyse directe et sensible ne nécessitant aucun traitement particulier de l'échantillon. La rotation (plusieurs kHz) à l'angle magique de l'échantillon permet l'observation directe des noyaux ^1H , ^{13}C , et ^{15}N , avec une résolution proche de la RMN liquide haute résolution.

La majeure difficulté rencontrée lorsque l'on veut étudier un support solide par RMN est l'importance de la largeur des raies. Dans le cas d'un échantillon purement solide, la largeur de raie peut dépasser 10 kHz. Cet élargissement des raies provient notamment de l'interaction dipole-dipole (interaction dipolaire). Une autre contribution à l'élargissement des raies provient

des inhomogénéités de susceptibilité magnétique. Ces variations de susceptibilité proviennent de l'hétérogénéité de l'échantillon, et peuvent être décrites comme une interaction dipolaire entre le spin et un dipôle macroscopique. La RMN MAS a pour but d'éliminer les contributions anisotropes intervenant dans différentes interactions mesurées par RMN (déplacement chimique, couplage dipolaire et quadripolaire) et qui induisent d'importants élargissements de raie. Cette amélioration de la résolution est due à la diminution considérable, voire l'annulation, des interactions anisotropes. Ceci permet d'obtenir des spectres bien résolus pour des composés solides. Il est souvent difficile d'éliminer la totalité des interactions dipolaires provenant des protons qui est le noyau le plus sensible en RMN mais aussi le plus abondant. On a alors souvent recours à l'analyse des échantillons par RMN du carbone 13. Du fait de sa faible sensibilité, la technique de polarisation croisée ou « Cross Polarisation » (CP) est souvent mise en œuvre. Elle correspond à un transfert de magnétisation entre le proton et le carbone afin d'acquérir un signal intense en carbone.

La méthode RMN 2D HETCOR (corrélations hétéronucléaires) de ^{13}C - ^1H a été utilisée dans cette étude afin de fournir des informations à distance intermoléculaire et spatiale. Nous avons cherché à travers les spectres RMN 2D ^{13}C - ^1H HETCOR obtenus à élucider et comparer les interactions intermoléculaires au sein des polymères étudiés. L'étude a été faite sur des MIPs qui contiennent encore dans leurs cavités de l'iprodione, en d'autres termes, qui n'ont pas été lavés après la synthèse pour en extraire la molécule empreinte. Les mêmes analyses ont été faites sur ces polymères où s'est opérée la recapture de l'iprodione par batch. L'intérêt de cette étude est de vérifier que l'iprodione est retenue dans les cavités imprimées en démontrant que l'interaction entre le MIP et l'iprodione pendant la recapture se reproduit de manière identique à celle ayant lieu pendant l'impression moléculaire.

Les expériences 2D ^1H - ^{13}C HECTOR des polymères ont été effectuées sur un spectromètre Bruker Avance 750 avec un temps de contact de 4 ms.

3.4 Calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry DSC)

Cette technique a été utilisée dans le but de mettre en évidence les interactions ayant lieu entre la molécule empreinte et le polymère (MIP ou NIP), et de déterminer l'énergie d'interaction (ou l'enthalpie) dans le cas où un pic exothermique est obtenu.

3.4.1 *Principe*

De façon générale, l'analyse thermique consiste à mesurer les évolutions d'une propriété physique d'un échantillon lorsqu'il est soumis à une variation programmée (généralement linéaire) de température avec le temps dans une atmosphère contrôlée. Cependant, on trouvera aussi des études en fonction du temps à température constante (isotherme). La calorimétrie différentielle à balayage (de façon courante DSC, Differential Scanning Calorimetry) se rapporte à l'étude de la température de l'échantillon et des échanges thermiques entre celui-ci et le milieu extérieur.

Notre objectif étant de déterminer l'énergie d'interaction entre le MIP et l'iprodione, nous avons utilisé un microcalorimètre différentiel (microDSC III SETARAM) en mode isotherme. La limite de détection du micro DSC III est largement supérieure (une dizaine de fois) à celle des DSC conventionnelles. Des variations du signal calorimétrique inférieures au microwatt sont détectables.

3.4.2 *Appareillage*

Le bloc calorimétrique du micro DSC III est constitué d'un cylindre métallique doré possédant une conductivité thermique élevée. Ce montage assure une température très homogène, précisément régulée et contrôlée, qui détermine la très bonne stabilité de la ligne de base du calorimètre.

Deux cavités usinées dans le bloc reçoivent les cellules expérimentales. La cellule de mesure reçoit l'échantillon solide ou liquide à analyser. La cellule de référence contient un témoin inerte pour compenser l'effet thermique lié à l'échauffement de l'échantillon (**Figure 13a**). Différents types de cellules expérimentales, selon les applications à réaliser, sont utilisables. Pour l'étude de la réaction entre un polymère et un liquide, la cellule « batch » de mélange est utilisée, elle propose deux chambres séparées pour conditionner les échantillons (**Figure 13b**). Le MIP et la

solution d'iprodione sont mis en présence et mélangés à l'aide d'une tige poussoir. Cette tige, solidaire du premier compartiment assure en outre l'agitation du mélange. Cette cellule est particulièrement bien adaptée à l'étude de réactions enzymatiques, de mouillage, de mélange, etc. Le flux de chaleur est tracé en fonction du temps.

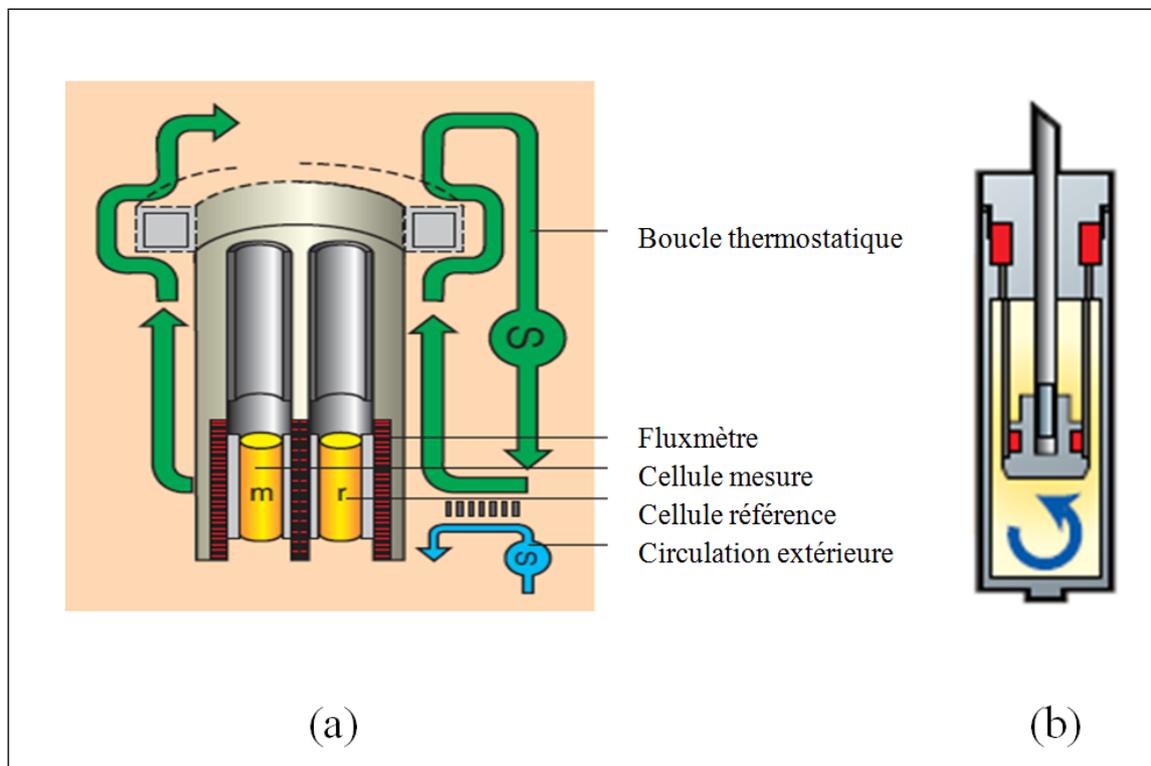
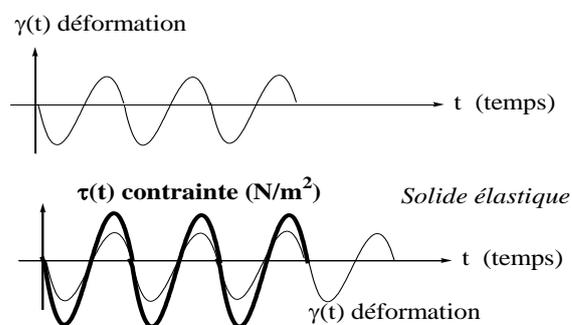


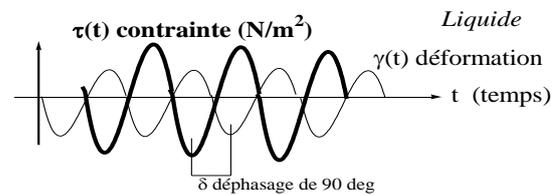
Figure 13 (a) Le bloc calorimétrique du micro DSC III et (b) la cellule batch.

3.5 Photo-rhéologie : Suivi in-situ de la photo-polymérisation radicalaire des MIPs et des NIPs

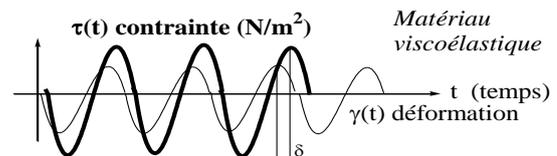
La réponse d'un solide élastique à une déformation est en phase avec cette déformation.



La réponse d'un liquide est en déphasage de 90 degrés par rapport à la déformation.



Pour un matériau viscoélastique, le module de relaxation de contrainte s'écrit sous la forme :



$$G(t) = \frac{\text{Rep}(t)}{\text{DI}(t)} = \frac{\sigma(t)}{\varepsilon(t)}$$

avec $\text{Rep}(t)$ la réponse du produit (c'est-à-dire la contrainte, σ) à une déformation imposée ($\varepsilon \in \mathbb{C}$).

Après des calculs mathématiques (voir annexe 3), nous obtenons l'équation suivante :

$$G(t) = |G(\omega)| \cdot (\cos(\delta) + \sin(\delta) \cdot i) = G' + i \cdot G''$$

G' est le module de conservation (appelé parfois module d'élasticité) et G'' est le module de perte (appelé encore module de viscosité).

Pour étudier les propriétés viscoélastiques des polymères au cours de la polymérisation, nous avons utilisé la photo-rhéologie in situ. L'irradiation UV est appliquée à l'intérieur du rhéomètre. Un spectromètre UVIKON 941 UV/Vis a été utilisé. La source UV est une lampe Hammamatsu mercure/xénon, qui propose un large choix de l'intensité lumineuse, qui va du $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ au W/cm^2 . Un filtre 365 nm a été utilisé pour avoir une lumière monochromatique.

Un rhéomètre « ARES Rheometric Scientific » a été utilisé. Le support de la plaque supérieure a été creusé pour permettre l'insertion d'un miroir 458, qui a été utilisé pour réfléchir la lumière UV sur l'échantillon. Tandis que la plaque haute était immobile, celle du bas a été utilisée pour transmettre la contrainte. L'échantillon qui consistait en quelque mL du mélange des réactifs de synthèse a été comprimé entre les deux plaques (transmission > 95 % à 365 nm). La

déformation était imposée à 0,5 %. La fréquence était de 1 rad/s. La longueur d'onde utilisée était la plus proche de celle utilisée dans nos manipes de synthèse des MIPs : 365nm. L'intensité était de 200 $\mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$. La déformation était diminuée à 0,05 une fois le monolithe est obtenu. Des essais ont été faits en modifiant la puissance (20 %, 22 %, et 100 %), cela n'a pas eu d'influence sur les résultats. Les réactifs ont été mélangés, l'ajout de l'initiateur a été fait en dernier juste avant l'exposition du liquide à la lampe UV pour lancer la polymérisation. Pour chaque échantillon, nous avons fait la mesure avec et sans dégazage. Nous n'avons pas obtenu de courbes différentes suivant les deux cas.

4 Application : extraction en phase solide à l'aide de cartouche ou MISPE (molecularly imprinted solid phase extraction)

Pour faciliter l'application des MIP et pouvoir passer à des milieux plus complexes, nous avons appliqué les MIPs obtenus sur des cartouches SPE en tant que phase stationnaire. Il s'agit de la MISPE (*molecularly imprinted solid phase extraction*).

Pour ce faire, des tubes SPE vides en polypropylène (1 mL, Supelco, Bellfonte, USA) avec des frittés en Polyéthylène PE (20 μm de porosité) ont été reliés à une pompe à vide. 20 mg de MIP (ou NIP) ont été mis en suspension dans de l'acétonitrile puis introduits dans les cartouches. Après tassement de la phase solide, un second fritté a été inséré à la surface des particules du polymère. Les cartouches ainsi préparées, ont été conditionnées à l'aide de 5 mL d'acétonitrile, 5 mL de méthanol et 5 mL d'une solution 10% v/v d'éthanol dans l'eau. Les échantillons dopés à l'iprodione (Vin de Bourgogne Chardonnay 2011, Charles Renoir ou vin modèle) ont été ensuite percolés sur les cartouches. Après l'étape de percolation, les cartouches ont été lavées successivement avec 5 mL d'une solution 10 % d'éthanol dans de l'eau puis séchées à l'air pendant 5 min sous vide (14 psi). L'iprodione a été éluée avec différents solvants d'éluion pour optimiser la pré-concentration. Enfin, après les étapes de percolation, de lavage et d'éluion, les éluats ont été analysés par HPLC-UV. Le comportement du NIP dans ces conditions de SPE (NISPE) a été évalué et comparé avec le MIP correspondant.

L'objectif de cette thèse est la synthèse d'un MIP spécifique de l'iprodione et l'étude de ses propriétés de reconnaissance. Dans le premier chapitre de la partie suivante « Résultats et discussion » nous présenterons la synthèse d'un premier MIP et la comparaison de son efficacité par rapport à un polymère non imprimé. Dans le deuxième chapitre, l'influence des principaux facteurs intervenant pendant la synthèse sur les caractéristiques des MIPs sera présentée. Ensuite, le troisième chapitre aura pour objectif d'étudier les isothermes de sorption d'eau sur les MIPs du plan d'expériences afin de déduire une relation entre l'adsorption de l'iprodione et l'adsorption de l'eau. Enfin, une application du MIP sur des solutions de vin ainsi que des tests de sélectivité en utilisant la technique MISPE (molecularly imprinted solid phase extraction) seront présentés.

Références bibliographiques

- Alexander, C., Andersson, H. S., Andersson, L. I., Ansell, R. J., Kirsch, N., Nicholls, I. A., O'Mahony, J., & Whitcombe, M. J. (2006). Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *Journal of Molecular Recognition*, 19(2), 106-180.
- Andersson, L. I., Hardenborg, E., Sandberg-Ställ, M., Möller, K., Henriksson, J., Bramsby-Sjöström, I., Olsson, L.-I., & Abdel-Rehim, M. (2004). Development of a molecularly imprinted polymer based solid-phase extraction of local anaesthetics from human plasma. *Analytica Chimica Acta*, 526(2), 147-154.
- Ansell, R., & Mosbach, K. (1997). Molecularly imprinted polymers by suspension polymerisation in perfluorocarbon liquids, with emphasis on the influence of the porogenic solvent. *Journal of Chromatography A*, 787, 55-66.
- Avramides, E. J., Lentza-Rizos, C., & Mojasevic, M. (2003). Determination of pesticide residues in wine using gas chromatography with nitrogen-phosphorus and electron capture detection. *Food Additives and Contaminants*, 20(8), 699 - 706.
- Baggiani, C., Biagioli, F., Anfossi, L., Giovannoli, C., Passini, C., & Giraudi, G. (2013). Effect of the mimic structure on the molecular recognition properties of molecularly imprinted polymers for ochratoxin A prepared by a fragmental approach. *Reactive and Functional Polymers*, 73(6), 833-837.
- Bailey, H. D., Armstrong, B. K., de Klerk, N. H., Fritschi, L., Attia, J., Scott, R. J., Smibert, E., Milne, E., & for the Aus, A. L. L. C. (2011). Exposure to professional pest control treatments and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Cancer*, 129(7), 1678-1688.
- Bérengrère, C. (2007). Intérêt des polymères à empreintes moléculaires pour la préparation d'échantillons par extraction solide-liquide. Applications aux triterpènes dans les plantes et aux dopants dans les urines.: Université d'Orléans.
- Brooks, B. R., Brooks, C. L., Mackerell, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., Kuczera, K., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R. W., Post, C. B., Pu, J. Z., Schaefer, M., Tidor, B., Venable, R. M., Woodcock, H. L., Wu, X., Yang, W., York, D. M., & Karplus, M. (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, vol. 30 (pp. 1545-1614): Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.
- Cabras, P., & Angioni, A. (2000). Pesticide Residues in Grapes, Wine, and Their Processing Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 967-973.
- Cabras, P., & Conte, E. (2001). Pesticide residues in grapes and wine in Italy. *Food Additives and Contaminants*, 18(10), 880 - 885.
- Caro, E., Marcé, R. M., Cormack, P. A. G., Sherrington, D. C., & Borrull, F. (2006). Novel enrofloxacin imprinted polymer applied to the solid-phase extraction of fluorinated

- quinolones from urine and tissue samples. *Analytica Chimica Acta*, 562(2), 145-151.
- Caro, E., Masqué, N. r., Marcé, R. M., Borrull, F., Cormack, P. A. G., & Sherrington, D. C. (2002). Non-covalent and semi-covalent molecularly imprinted polymers for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from water samples. *Journal of Chromatography A*, 963(1-2), 169-178.
- Carter, S. R., & Rimmer, S. (2002). Molecular Recognition of Caffeine by Shell Molecular Imprinted Core–Shell Polymer Particles in Aqueous Media. *Advanced Materials*, 14(9), 667-670.
- Cheong, S.-H., Rachkov, A. E., Park, J.-K., Yano, K., & Karube, I. (1998). Synthesis and binding properties of a noncovalent molecularly imprinted testosterone-specific polymer. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 36(11), 1725-1732.
- Cormack, P. A. G., & Elorza, A. Z. (2004). Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B*, 804(1), 173-182.
- Cormack, P. A. G., & Mosbach, K. (1999). Molecular imprinting: recent developments and the road ahead. *Reactive and Functional Polymers*, 41(1-3), 115-124.
- Curcio, P. (2009). Approche semi-covalente pour la préparation de polymères imprimés par la technique de polymérisation en mini-émulsion, *PhD*, Université de Strasbourg.
- Fuchs, Y., Soppera, O., & Haupt, K. (2012). Photopolymerization and photostructuring of molecularly imprinted polymers for sensor applications. *Analytica Chimica Acta*, 717(0), 7-20.
- Gallego-Gallegos, M., Munoz-Olivas, R., Camara, C., Mancheno, M. J., & Sierra, M. A. (2006). Synthesis of a pH dependent covalent imprinted polymer able to recognize organotin species. *Analyst*, 131(1), 98-105.
- Geai, J.-P. (2013). Message in bottle. *Que choisir*.
- Gómez-Pineda, L. E., Pina-Luisa, G. E., Cuán, Á., García-Calzón, J. A., & Díaz-García, M. E. (2011). Physico-chemical characterization of flavonol molecularly imprinted polymers. *Reactive and Functional Polymers*, 71(4), 402-408.
- Gonzlez, G. P., Hernando, P. F., & Alergia, J. S. D. (2006). A morphological study of molecularly imprinted polymers using the scanning electron microscope. *Analytica Chimica Acta*, 557(1-2), 179-183.
- Hosoya, K., Yoshihako, K., Shirasu, Y., Kimata, K., Araki, T., Tanaka, N., & Haginaka, J. (1996). *Journal of Chromatography*, 728, 139.
- Huang, X., Zou, H., Chen, X., Luo, Q., & Kong, L. (2003). Molecularly imprinted monolithic stationary phases for liquid chromatographic separation of enantiomers and diastereomers. *Journal of Chromatography A*, 984(2), 273-282.
- Hugon-Chapuis, F., & Pichon, V. (2007). Polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de composés de milieux biologiques. *Annales de Toxicologie Analytique*, 19(3), 239-251.
- Kawaguchi, M., Hayatsu, Y., Nakata, H., Ishii, Y., Ito, R., Saito, K., & Nakazawa, H. (2005). Molecularly imprinted solid phase extraction using stable isotope labeled

- compounds as template and liquid chromatography-mass spectrometry for trace analysis of bisphenol A in water sample. *Analytica Chimica Acta*, 539(1-2), 83-89.
- Kempe, M., & Mosbach, K. (1995). Receptor binding mimetics: A novel molecularly imprinted polymer. *Tetrahedron Letters*, 36(20), 3563-3566.
- Kim, H., Kaczmarek, K., & Guiochon, G. (2006). Thermodynamic analysis of the heterogenous binding sites of molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1101(1-2), 136-152.
- Kunath, S., Marchyk, N., Haupt, K., & Feller, K.-H. (2013). Multi-objective optimization and design of experiments as tools to tailor molecularly imprinted polymers specific for glucuronic acid. *Talanta*, 105(0), 211-218.
- Le Moullec, S., Bégos, A., Pichon, V., & Bellier, B. (2006). Selective extraction of organophosphorus nerve agent degradation products by molecularly imprinted solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 1108(1), 7-13.
- Lei, J.-D., & Tong, A.-J. (2005). Preparation of Z-1-Phe-OH-NBD imprinted microchannel and its molecular recognition study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61, 1029-1033.
- Li, J., Zhang, X., Liu, Y., Tong, H., Xu, Y., & Liu, S. (2013). Preparation of a hollow porous molecularly imprinted polymer using tetrabromobisphenol A as a dummy template and its application as SPE sorbent for determination of bisphenol A in tap water. *Talanta*, 117(0), 281-287.
- Liu, Y., Hoshina, K., & Haginaka, J. (2009). Monodispersed, molecularly imprinted polymers for cinchonidine by precipitation polymerization. *Talanta*, 85, 1713-1718.
- Liu, Z.-S., Xu, Y.-L., Yan, C., & Gao, R.-Y. (2005). Mechanism of molecular recognition on molecular imprinted monolith by capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1087(1-2), 20-28.
- Lok (2009). Application of molecularly imprinted polymers in food sample analysis. *International Food Research Journal*, 16(2), 127-140.
- Lu, Y., Li, C., Liu, X., & Huang, W. (2002). Molecular recognition through the exact placement of functional groups on non-covalent molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 950(1-2), 89-97.
- Lu, Y., Li, C., Wang, X., Sun, P., & Xing, X. (2004). Influence of polymerization temperature on the molecular recognition of imprinted polymers. *Journal of Chromatography B*, 804(1), 53-59.
- Matsui, J., Doblhoff-Dier, O., & Takeuchi, T. (1997). 2-(Trifluoromethyl)acrylic acid: a novel functional monomer in non-covalent molecular imprinting. *Analytica Chimica Acta*, 343(1-2), 1-4.
- Mayes, A., & Whitcombe, M. (2005). Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1742-1778.
- Meier, F., Schott, B., Riedel, D., & Mizaikoff, B. (2012). Computational and experimental study on the influence of the porogen on the selectivity of 4-nitrophenol molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, 744(0), 68-74.
- Mosbach, K. (1994). Molecular imprinting. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(1), 9-14.

- Nomachi, M., Kubo, T., Hosoya, K., & Kaya, K. (2006). Solvent effects in the preparation of molecularly imprinted polymers for melatonin using propionyl-5-methoxytryptamine as the pseudo template. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384(6), 1291-1296.
- Nougadère, A., Sirot, V., Kadar, A., Fastier, A., Truchot, E., Vergnet, C., Hommet, F., Baylé, J., Gros, P., & Leblanc, J.-C. (2012). Total diet study on pesticide residues in France: Levels in food as consumed and chronic dietary risk to consumers. *Environment International*, 45(0), 135-150.
- Qi, P., Wang, J., Wang, L., Li, Y., Jin, J., Su, F., Tian, Y., & Chen, J. (2010). Molecularly imprinted polymers synthesized via semi-covalent imprinting with sacrificial spacer for imprinting phenols. *Polymer*, 51(23), 5417-5423.
- Sellergren, B. (1989). Molecular imprinting by noncovalent interactions. Enantioselectivity and binding capacity of polymers prepared under conditions favoring the formation of template complexes. *Die Makromolekulare Chemie*, 190(11), 2703-2711.
- Sellergren, B., & Andersson, L. (1990). Molecular recognition in macroporous polymers prepared by a substrate analog imprinting strategy. *The Journal of Organic Chemistry*, 55(10), 3381-3383.
- Sellergren, B., Rückert, B., & Hall, A. (2002). Layer-by-Layer Grafting of Molecularly Imprinted Polymers via Iniferter Modified Supports. *Advanced Materials*, 14(17), 1204-1208.
- Sergeyeva, T. A., Gorbach, L. A., Piletska, E. V., Piletsky, S. A., Brovko, O. O., Honcharova, L. A., Lutsyk, O. D., Sergeeva, L. M., Zinchenko, O. A., & El'skaya, A. V. (2013). Colorimetric test-systems for creatinine detection based on composite molecularly imprinted polymer membranes. *Analytica Chimica Acta*, 770(0), 161-168.
- Shea, K. J., & Dougherty, T. K. (1986). Molecular recognition on synthetic amorphous surfaces. The influence of functional group positioning on the effectiveness of molecular recognition. *Journal of the American Chemical Society*, 108(5), 1091-1093.
- Shea, K. J., & Thompson, E. (1978). Template synthesis of macromolecules. Selective functionalization of an organic polymer. *The Journal of Organic Chemistry*, 43(21), 4253-4255.
- Shi, Y., Zhang, J.-H., Shi, D., Jiang, M., Zhu, Y.-X., Mei, S.-R., Zhou, Y.-K., Dai, K., & Lu, B. (2006). Selective solid-phase extraction of cholesterol using molecularly imprinted polymers and its application in different biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42(5), 549-555.
- Sibrian-Vazquez, M., & Spivak, D. A. (2004). Molecular Imprinting Made Easy. *Journal of the American Chemical Society*, 126(25), 7827-7833.
- Silvestri, D., Borrelli, C., Giusti, P., Cristallini, & Ciardelli, G. (2005). Polymeric devices containing imprinted nanospheres: a novel approach to improve recognition in water for clinical uses. *Analytica Chimica Acta*, 542, 3-13.

- Spivak, D., Gilmore, M. A., & Shea, K. J. (1997). Evaluation of Binding and Origins of Specificity of 9-Ethyladenine Imprinted Polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 119(19), 4388-4393.
- Spivak, D. A. (2005). Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(12), 1779-1794.
- Suedee, R., Seechamnaturakit, V., Canyuk, B., Ovatlarnporn, C., & Martin, G. P. (2006). Temperature sensitive dopamine-imprinted (N,N-methylene-bis-acrylamide cross-linked) polymer and its potential application to the selective extraction of adrenergic drugs from urine. *Journal of Chromatography A*, 1114(2), 239-249.
- Tennikova, T., & Freitag, R. (2000). An Introduction to Monolithic Disks as Stationary Phases for High Performance Biochromatography. *Journal of High Resolution Chromatography*, 23, 27-38.
- Tseng, R.-L. (2007). Physical and chemical properties and adsorption type of activated carbon prepared from plum kernels by NaOH activation. *Journal of Hazardous Materials*, 147(3), 1020-1027.
- Umpleby Ii, R. J., Baxter, S. C., Rampey, A. M., Rushton, G. T., Chen, Y., & Shimizu, K. D. (2004). Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography B*, 804(1), 141-149.
- Urraca, J. L., Marazuela, M. D., Merino, E. R., Orellana, G., & Moreno-Bondi, M. C. (2006). Molecularly imprinted polymers with a streamlined mimic for zearalenone analysis. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2), 127-134.
- Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I., & Mackerell, A. D. (2010). CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry*, 31(4), 671-690.
- Vanommeslaeghe, K., & MacKerell, A. D. (2012). Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: Bond Perception and Atom Typing. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(12), 3144-3154.
- Wang, J., Guo, R., Chen, J., Zhang, Q., & Liang, X. (2005). Phenylurea herbicides-selective polymer prepared by molecular imprinting using N-(4-isopropylphenyl)-N'-butyleneurea as dummy template. *Analytica Chimica Acta*, 540(2), 307-315.
- Whitacre, D. M., Kesavachandran, C., Fareed, M., Pathak, M., Bihari, V., Mathur, N., & Srivastava, A. (2009). Adverse Health Effects of Pesticides in Agrarian Populations of Developing Countries. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 200*, vol. 200 (pp. 33-52): Springer US.
- Wulff, G., Heide, B., & Helfmeier, G. (1986). Enzyme-analog built polymers. 20. Molecular recognition through the exact placement of functional groups on rigid matrixes via a template approach. *Journal of the American Chemical Society*, 108(5), 1089-1091.
- Wulff, G., Vesper, W., Grobe-Einsler, R., & Sarhan, A. (1977). Enzyme-analogue built polymers, 4. On the synthesis of polymers containing chiral cavities and their use

- for the resolution of racemates. *Die Makromolekulare Chemie*, 178(10), 2799-2816.
- Xie, J., Cai, C., Lai, S., Yang, L., Luo, L., Yang, H., Chen, Y., & Chen, X. (2013). Synthesis and application of a molecularly imprinted polymer as a filter to reduce polycyclic aromatic hydrocarbon levels in mainstream cigarette smoke. *Reactive and Functional Polymers*, 73(12), 1606-1611.
- Xie, J., Chen, L., Li, C., & Xu, X. (2003). Selective extraction of functional components derived from herb in plasma by using a molecularly imprinted polymer based on 2,2-bis(hydroxymethyl)butanol trimethacrylate. *Journal of Chromatography B*, 788(2), 233-242.
- Xu, Z.-G., Du, Z., Hu, Y.-L., Hu, Y.-F., Pan, Y.-P., & Li, G.-K. (2012). Preparation of Trimethoprim Molecularly Imprinted Stir Bar Sorptive Extraction and Its Application for Trace Analysis of Trimethoprim and Sulfonamides in Complex Samples. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40(7), 1002-1010.
- Yilmaz, E., Haupt, K., & Mosbach, K. (2000). The Use of Immobilized Templates—A New Approach in Molecular Imprinting. *Angewandte Chemie International Edition*, 39(12), 2115-2118.
- Yoshimatsu, K., Reimhult, K., Krozer, A., Mosbach, K., Sode, K., & Ye, L. (2007). Uniform molecularly imprinted microspheres and nanoparticles prepared by precipitation polymerization: The control of particle size suitable for different analytical applications. *Analytica Chimica Acta*, 584, 112-121.
- Yoshizako, K., Hosoya, K., Iwakoshi, Y., Kimata, K., & Tanaka, N. (1998). Porogen Imprinting Effects. *Analytical Chemistry*, 70(2), 386-389.
- Zhu, Q.-Z., Haupt, K., Knopp, D., & Niessner, R. (2002). Molecularly imprinted polymer for metsulfuron-methyl and its binding characteristics for sulfonylurea herbicides. *Analytica Chimica Acta*, 468(2), 217-227.

PARTIE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

**Chapitre 1 Synthèse d'un polymère à empreintes
moléculaires spécifique d'un fongicide, l'iprodione et étude
de ses propriétés de reconnaissance dans un milieu
hydroalcoolique et dans le vin**

1 Introduction

Le but de ce chapitre est de présenter une méthode de synthèse d'un MIP spécifique de l'iprodione par voie non covalente en utilisant la polymérisation en masse comme méthode de préparation. Le monomère fonctionnel utilisé pour cette synthèse est le méthacrylamide, il a été choisi parmi une bibliothèque de monomères fonctionnels. Le choix a été fait suite à une simulation par modélisation moléculaire de la stabilité des complexes monomères fonctionnels-iprodione formés dans le solvant porogène. En outre, les propriétés de reconnaissance de ce MIP ainsi que celles du polymère non-imprimé (NIP) seront déterminées afin de vérifier qu'une impression moléculaire a eu lieu pendant la synthèse et que des cavités spécifiques de l'iprodione ont été formées.

Les principaux objectifs de ce chapitre sont alors:

- La synthèse d'un iprodione-MIP pouvant adsorber spécifiquement l'iprodione avec des interactions dipôle-dipôle dans un milieu dipolaire.
- La caractérisation des propriétés de reconnaissance du MIP et du NIP.

Des études d'extraction de l'iprodione par « batch » dans des solutions hydroalcooliques ont été menées. Les cinétiques de recapture ont été suivies et les isothermes ont été tracées à 25°C. L'équilibre d'extraction de l'iprodione est atteint au bout de 20 minutes et le mécanisme correspondant est un pseudo- second ordre, avec une constante plus élevée pour le MIP que pour le NIP. Cela montre une plus forte interaction entre le MIP et l'iprodione par rapport à l'interaction entre le NIP et l'iprodione. L'isotherme de Scatchard a révélé la présence de deux types de sites dans le MIP et d'un seul type de site dans le NIP. Après calcul du nombre de sites, de la constante d'affinité, de la capacité ainsi que de l'énergie d'adsorption de chaque polymère, les isothermes de Freundlich et de Dubinin - Radushkevich

ont montré que le MIP est plus efficace que le NIP pour l'absorption de l'iprodione. Enfin, une extraction en phase solide à empreintes moléculaires (MISPE) a été appliquée à la pré-concentration de l'iprodione dans un échantillon de vin. L'utilisation du MIP comme phase stationnaire dans une cartouche SPE pour la pré-concentration de l'iprodione a été démontrée.

Les principaux résultats obtenus sont:

- La synthèse d'un MIP spécifique de l'iprodione capable d'interagir de façon spécifique et non covalente (interaction dipôle-dipôle) avec ce fongicide malgré la nature dipolaire du milieu hydro-alcoolique.
- L'utilisation de ce MIP comme phase de préconcentration de l'iprodione dans un milieu réel comme le vin.

2 Article 1 Binding characteristics of molecularly imprinted polymer for iprodione fungicide based on dipole-dipole interactions in hydroalcoholic media

Manal Bitar, Elias Bou-Maroun, Adrien Lerbret, Naim Ouaini, Philippe Cayot.

2.1 Abstract

An iprodione-MIP (molecularly imprinted polymer) was prepared by copolymerization of methacrylamide and ethylene glycol dimethacrylate. Methacrylamide was chosen after molecular dynamic simulations. Batch studies in hydroalcoholic solutions were conducted. The equilibrium time for the removal of iprodione is 20 minutes, and the corresponding mechanism follows the pseudo-second order, with a higher constant for the MIP than for the non-imprinted polymer (NIP). A Scatchard analysis revealed that two types of sites are found in the MIP, and one in the NIP. Freundlich and Dubinin-Radushkevich isotherms were used.

The MIP was found to be more efficient than the NIP for the uptake of iprodione, as revealed by its higher adsorption energy, affinity, and capacity. Lastly, a MISPE (molecularly imprinted solid phase extraction) was successfully applied to pre-concentrate iprodione in a wine sample. In this paper, the feasibility of using the MIP as enrichment sorbent to bind selectively iprodione from complex was demonstrated.

2.2 Introduction

Growing public concern about environmental pollution and health problems has led to a focus on the presence of toxic residues in the human diet. Pesticides are an important class of toxic organics that might be present in our food and drink. It is suspected that they are linked to a broad spectrum of medical problems such as cancer, neurotoxic effects, reproductive health concerns and endocrine disruption (Bailey et al., ; Nougadère et al., 2012; Whitacre et al., 2009). Although there are extensive regulations about pesticide residues in fruits, vegetables, and drinking water, scarce attention is paid to derived products such as wine (Mosbach, 1994) which may contain these commodities as an ingredient. Iprodione is a pesticide that inhibits the germination of fungal spores on the surface of fruits and is used also as a four-season fungicide for lawn. It is widely used in vineyards against botrytis for example, but it is a harmful substance for humans (R22, R40), toxic for aquatic organisms (R50/53), and is not readily biodegradable. Because of its poor biodegradability and the risk of accumulation, the use of iprodione for crops will expire on 31 October 2016 (Commission Regulation (EU) No 823/2012 of 14 September 2012). The Pesticide-Action-Network EU have published a study (2008) indicated that 100% of conventional wines around the world contain pesticides. Same observations (92/92 are contaminated) in a study of “Que Choisir” journal (Geai, 2013) publicized by radios, that leads to a deterioration of the image of the wine. More seriously, iprodione has been detected in more than 90 % of French wine according to a survey by the French Ministry of Agriculture (Curgier J-P, 2005).

Molecular imprinting is widely recognized as a promising separation technique because of its capacity to identify target molecules. This arises from the synthesis procedure followed in preparing MIPs, in which a functional monomer and a cross linker are copolymerized in the presence of a template molecule, thereby encoding molecular information (shape, size, functional groups, and groups orientation) in bulk materials (Andersson, Müller, Vlatakis &

Mosbach, 1995; Mosbach, 1994; Sellergren, 1989; Sellergren et al., 1990; Shea et al., 1986; Spivak et al., 1997; Wulff et al., 1986).

One of the important parameters in the preparation of MIPs is the choice of the optimal functional monomer that presents the best interactions with the template. Molecular simulation approaches can be used to study the interaction between the template and the functional monomers (Chianella et al., 2002; Piletsky, Piletska, Karim, Foster, Legge & Turner, 2004).

Different models of interaction are used to analyze the relationship between a molecule and a solid support (Andersson et al., 1995; Seebach & Seidel-Morgenstern, 2007; Umpleby Ii, Baxter, Bode, Berch Jr, Shah & Shimizu, 2001). Binding models can be grouped into two general classes: discrete and continuous distribution models. The most commonly applied binding models, the Langmuir and bi-Langmuir isotherms, are both examples of discrete binding models. Discrete binding models simplify a distribution into a finite number of different classes of sites, with each class of site having a different binding affinity. The discrete Langmuir and bi-Langmuir models are attractive because they are particularly easy to implement via Scatchard plots and readily generate the corresponding binding parameters. In homogeneous systems, the Scatchard plot falls on a straight line. In contrast, the Scatchard plots for most MIPs are not linear, but curved. This curvature has been cited as evidence of binding site heterogeneity. Heterogeneity can still be accommodated using the Scatchard analysis by modeling the curved isotherm as two or more separate straight lines. The steepest line then measures the high-affinity sites and the flattest line the low-affinity sites. Due to the shortcomings of a discrete binding model in characterizing heterogeneity, continuous distribution models, such as the Freundlich one, have been more recently applied to MIPs. These continuous distribution models are attractive as they can more accurately approximate the broad unimodal distribution in MIPs. They should also yield more appropriate binding parameters. A second advantage is that the corresponding distribution and heterogeneity can be quantitatively measured.

SPE involving MIPs, so-called MISPE, has been a rapid expanding research as a popular tool capable of overcoming the selectivity problems of the conventional SPE sorbent and a very promising technique for the development of selective extraction and accurately determination

methods for traces analysis. The use of MIPs as selective materials allows customized sample treatment prior to the final determination. Thus, their use in SPE is by far the most advanced technical application of MIPs (Martín-Esteban, 2013).

Several studies have reported the efficiency of the molecular imprinting in the recognition of polymers targeted at pesticides. Molecularly imprinted polymers for carbaryl (Yao, Fang, Gao & Cheng, 2008), pyrimethanil (Baggiani, Baravalle, Giraudi & Tozzi, 2007b), triazine and atrazine (Matsui, Fujiwara & Takeuchi, 2000) have been synthesized. The only work on molecular imprinting and iprodione as template molecule is presented by (Kobaisi, Tate, Rix, Jakubov & Mainwaring, 2007). In this work the authors were especially interested to study the influence of the template and of the polymerization conditions on the pore size and on the surface area of the obtained polymers.

In the present work, we aimed to investigate the study of binding properties of an iprodione-MIP in wine model solutions and its applicability to real samples such as wine. The functional monomer was chosen by molecular simulation from a library of the most common functional monomers used in non-covalent synthesis. The non participation of iprodione in the polymerization was checked, which is, so far, not reported in any similar work in the literature. The binding properties of the polymers obtained toward iprodione were studied in a diluted wine model solution (polar solvent) using Langmuir, Freundlich, and Dubinin-Radushkevich isotherms with a MIP based on dipole-dipole interactions. In order to evaluate the usability of MIP in traces analysis, a MISPE procedure was carried out. To our knowledge, this work presents the first attempt of using iprodione-MIP as selective SPE sorbent for the pre-concentration of the iprodione in wine samples.

2.3 Experimental section

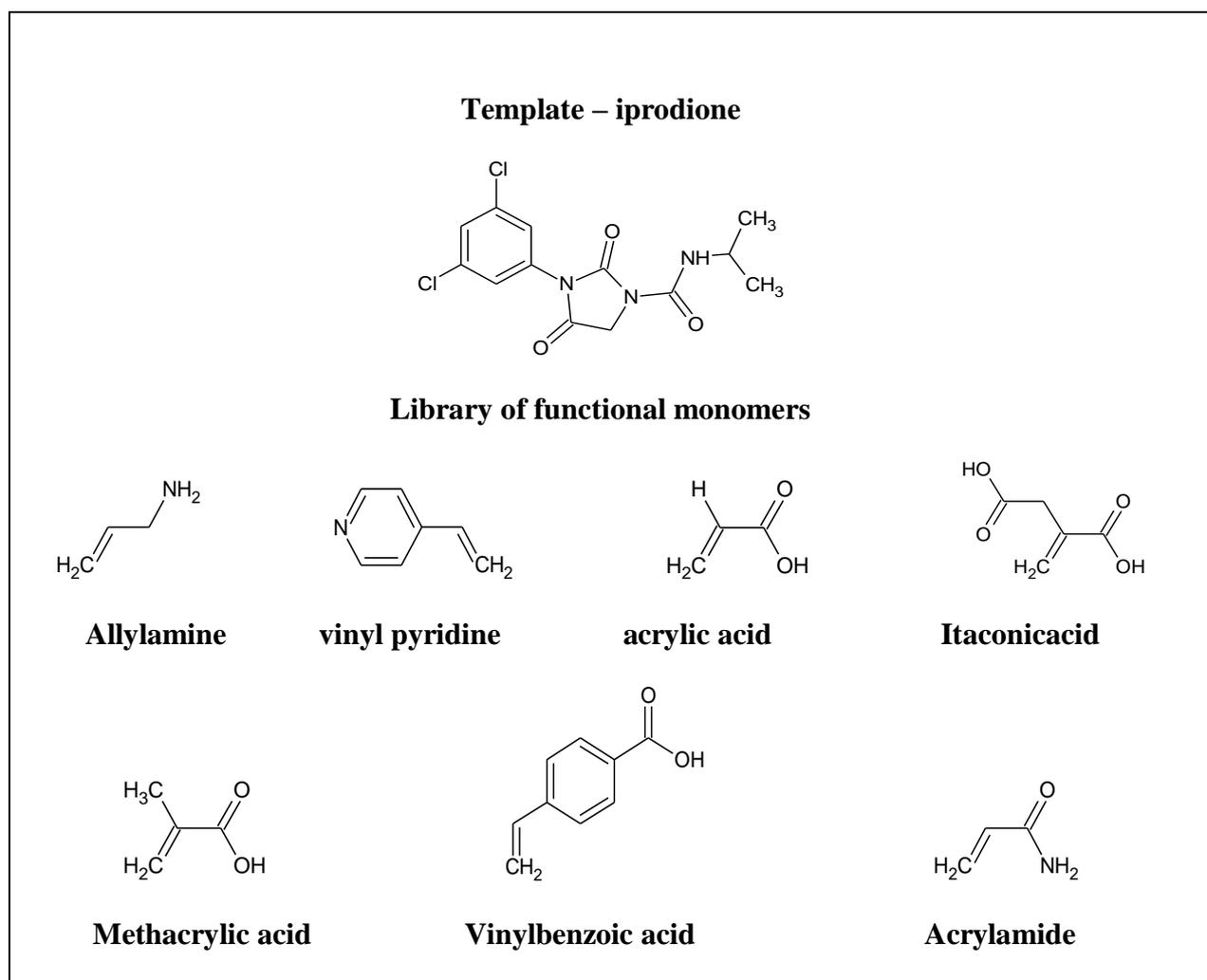
2.3.1 Chemicals

Iprodione [CAS number 36734-19-7], methacrylamide (MAM) [CAS number 79-39-0], ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) [CAS number 97-90-5], 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPAP) [CAS number 24650-42-8], toluene, acetonitrile, ethanol and acetic acid were purchased from Sigma Aldrich, France. Solvents were HPLC grade and were used without any purification. High purity de-ionized water, obtained with an Elga Ionic

system PURELAB Option, was used in the batch experiments and in the mobile phase mixture.

2.3.2 Molecular simulation

Molecular dynamics (MD) of prepolymerization mixtures were simulated. These mixtures were composed of iprodione and 10 of the most frequently used functional monomers capable of forming non covalent interactions with iprodione (**Figure 14**). For this purpose, the CHARMM program was used (Brooks et al., 2009a) with the parameters of the CGenFF force field (Vanommeslaeghe et al., 2010) (version 2b7), which were generated automatically by the CGenFF program (Vanommeslaeghe et al., 2012) (version 0.9.6), accessible at paramchem.org. No further optimization of these parameters was performed.



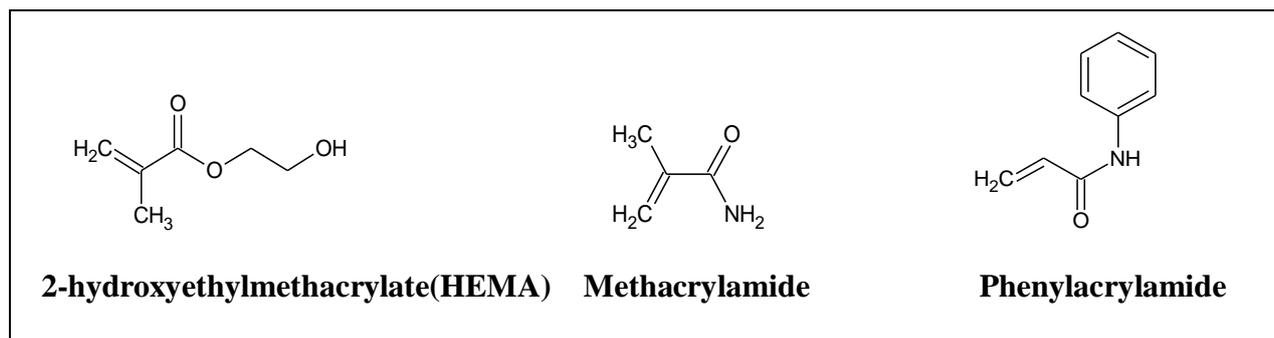


Figure 14 The structure of the template and the functional monomers included in the virtual library and used in the computer simulation

The SHAKE algorithm was employed to restrain the length of all the bonds involving a hydrogen atom and the equations of motion were integrated with the Verlet leapfrog algorithm using a time step of 1 fs. Van der Waals interactions were smoothly force switched to zero between 8 and 10 Å and Lorentz-Berthelot mixing rules were used for cross-interaction terms. The particle mesh Ewald method was considered to account for electrostatic interactions, with the fast-Fourier grid spacing set to ~ 1 Å.

Toluene has been the solvent used for polymerization experiment. The mixtures were prepared as follows: First, a cubic simulation box containing 128 toluene molecules was generated. Then, the iprodione template was superimposed at the center of this box, and the functional monomers were subsequently inserted with random positions and orientations, with minimal template-monomer and monomer-monomer distance criteria of 4 and 5 Å, respectively. Finally, each toluene molecule that overlapped with either the template or the monomers was removed. The configurations generated were first minimized by means of the steepest descent algorithm (1000 iterations) in three successive steps: (i) with frozen atomic positions of the template and the monomers, (ii) with fixed positions of the heavy atoms of the template, and (iii) with no constraint on any atom of the simulation box.

A final minimization of 2000 steps with the conjugate gradient algorithm was conducted. A 10-ps MD simulation in the microcanonical (N,V,E) ensemble was then performed to heat the system from 100 K to 298 K. Finally, MD simulations in the isothermal-isobaric (N,P,T) ensemble with $T = 298$ K and $p = 1$ atm were run for 2 ns.

2.3.3 *Analysis equipment*

Reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was performed using a C18 column on a Shimadzu LC equipped with a 25 μ L loop injector, an SPD 20AT UV-visible absorbance detector and an LC-20AT liquid pump, the limit of quantification is about 10^{-7} M. Acetonitrile/water (60/40 v/v) was used as the mobile phase and the flow rate was 1.0 mL.min⁻¹. Detection was performed at 220 nm, which is the maximum adsorption wavelength of iprodione. UV spectra were measured on a UV-Vis Jasco V530 UV-spectrometer.

2.4 Polymer preparation

2.4.1 *Synthesis*

MIPs in bulk were prepared by using MAM as the functional monomer and EGDMA as the crosslinker. The synthesis of the MIP was done using a molar ratio of 5/1 EGDMA/MAM (0.84 g / 0.5012 g) and 2 % m/v of template (0.16 g). The polymerization was carried out in toluene (5 mL) with DMPAP (65 mg) as the initiator.

MAM and iprodione were weighed in a test tube and dissolved in toluene. After the addition of EGDMA and DMPAP, the mixture was degassed in an ultrasonic bath for 10 minutes. The tube was then sealed and exposed to ultraviolet radiation overnight. The resulting MIP was ground into powder.

For comparison purposes, a non-imprinted polymer (NIP) was prepared similarly to the process described above, except that the polymerization mixture did not contain the template.

In order to remove the template, the polymer particles were soaked in the mixed solvent of acetic acid and ethanol (30/70 v/v) and subjected to ultrasonic treatment for 10 minutes. This mixture is meant to break the hydrogen bonds between iprodione and the polymer. Washing in ethanol continued until the template could no longer be detected with HPLC. The solvent was then removed by centrifugation, and the fine particles were dried at 65 °C overnight. These fine particles were used in the subsequent experiments.

2.4.2 *2,2-diphenyl-1-picrylhydrozyl test*

The templates have to be ideally chemically inert during the free radical polymerization. In order to check that iprodione does not participate in the polymerization reaction, the 2,2-

diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH[•]) test was used to confirm that iprodione has no radical scavenging ability and cannot participate in the radical polymerization. In its radical form DPPH[•] presents an absorption band at 515 nm which disappears upon reduction by an antiradical compound. Therefore, iprodione was mixed with DPPH[•] in ethanol and the absence of optical density decrease during 10-days indicates that this species is unable to scavenge the DPPH radical.

2.4.3 Evaluation of the iprodione-MIP by batch rebinding experiments

Equilibrium isotherm data were obtained in a batch wise approach. 10 mg of cleaned imprinted polymer or non-imprinted polymer were suspended in 20 mL of hydro-alcoholic solutions containing from 1×10^{-5} to 1.1×10^{-3} M of iprodione. These isotherms were made with 50:50 (v/v) ethanol/water solutions. The mixture was shaken continuously for 2 hours at 25 °C. After removal of the polymer particles by filtration (0.45µm filter), the solution was analyzed by HPLC-UV. The concentration of iprodione bound to the polymer, B (mol.L⁻¹), was calculated by subtracting the concentration of free iprodione, F (mol.L⁻¹) from the initial iprodione concentration.

2.4.4 Characterization of the iprodione-MIP using adsorption models

The data of the adsorption isotherms were further processed using different binding models in order to calculate binding parameters. In this way, the heterogeneous distribution of binding sites and the affinity of the polymers for the iprodione were evaluated.

2.4.4.1 Discrete distribution model: Langmuir isotherms

The following equation describes the binding equilibrium between iprodione (I) and the binding sites (S):



The binding affinity constant (K) is given by:

$$K = \frac{[IS]}{[I][S]} \quad (2)$$

This constant is related to the number of binding sites (N_i) by

$$K = \frac{B}{F(N_t - B)} \quad (3)$$

where B is the concentration of bound iprodione at equilibrium and F the concentration of free iprodione at equilibrium.

The parameters K and N_t were obtained by linear regression of the Langmuir model via Scatchard plots, owing B and F calculation with HPLC data:

$$\frac{B}{F} = KN_t - KB \quad (4)$$

The dimensionless separation factor, R_L , informs about the type of adsorption process. It was calculated from the equation:

$$R_L = \frac{1}{(1 + KC_0)} \quad (5)$$

where C_0 is the initial iprodione concentration (mol.L^{-1}) and K is the Langmuir adsorption equilibrium constant (L.mol^{-1}) obtained from equation (4) (Tseng, 2007).

2.4.4.2 Continuous distribution model: Freundlich isotherm

The Freundlich isotherm (FI) was obtained with a power regression connecting B and F :

$$B = aF^m \quad (6)$$

Where m corresponds to the heterogeneity index. It varies from 0 to 1, with 1 being homogeneous values and 0 being heterogeneous values, and a is a measure of the capacity $N(K_x)$ and the average affinity (K_x).

Systems that can be modeled by the FI are generally considered to contain an exponentially decaying distribution of binding sites with respect to $\log K$ (Umpleby *et al.*, 2004), the affinity distribution (AD), given by (Stanley *et al.*, 2003):

$$N(K) = 2.303am(1 - m^2)e^{-2.303m \log K} \quad (7)$$

The number of sites, $N_{K_1-K_2}$ and the weighted average affinity $K_{K_1-K_2}$ were measured with two sets for K_1 and K_2 values which are within the boundaries K_{\min} and K_{\max} (Umpleby Ii *et al.*, 2004):

$$K_{min} = \frac{1}{F_{max}} \text{ \& } K_{max} = \frac{1}{F_{min}} \quad (8)$$

$$N_{K_1-K_2} = a(1 - m^2)(K_1^{-m} - K_2^{-m}) \quad (9)$$

$$K_{K_1-K_2} = \frac{m}{m - 1} \frac{K_1^{1-m} - K_2^{1-m}}{K_1^{-m} - K_2^{-m}} \quad (10)$$

2.4.4.3 The Dubinin-Radushkevich model

The free energy (E , $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) of the interaction between the iprodione and the MIP is calculated with the following relation:

$$E = (2K_{DR})^{-1/2} \quad (11)$$

The Dubinin-Radushkevich constant (K_{DR} , $\text{kJ}^2\cdot\text{mol}^{-2}$) as well as the maximum adsorption capacity of MIP (B_m , $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) were calculated using the following equation:

$$\ln B = \ln B_m - K_{DR}\varepsilon^2 \quad (12)$$

The Polanyi potential, ε , was calculated from the following relation (Baggiani et al.):

$$\varepsilon = RT \ln\left(1 + \frac{1}{F}\right) \quad (13)$$

2.4.4.4 Kinetic adsorption curves

The kinetic adsorption experiments were performed in a batch wise approach with 10 mg of polymer in 20 mL of 10^{-3} M iprodione. The study temperature was 25 °C and the study medium was ethanol/water (50/50 v/v). Samples were taken at predetermined time intervals from the mixture and were immediately filtered. The adsorption rate was determined based on Lagergren's pseudo first order and pseudo second order kinetic equation (Ho & McKay, 1999):

$$\log(B_e - B_t) = \log B_e - \frac{k_1}{2.303} t \quad (14)$$

$$\frac{t}{B_t} = \frac{1}{k_2 B_e^2} + \frac{t}{B_e} \quad (15)$$

where B_e ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) is the adsorption amount of iprodione at equilibrium, B_t ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) is the adsorption amounts of iprodione at any time t (min), and k_1 (min^{-1}) and k_2 ($\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{min}^{-1}$) are the pseudo first order and pseudo second order adsorption rate constants, respectively. Based on this model, the initial adsorption rate u and the adsorption half-time $t_{1/2}$ were defined according to the following equations:

$$u = k_2 B_e^2 \quad (16)$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_2 B_e} \quad (17)$$

2.4.5 Application of MISPE method to white wine samples

In order to evaluate the specificity of the MIP for the iprodione in complex matrices, MISPE method was applied on white wine samples (Bourgogne Chardonnay 2011, Charles Renoir) spiked with iprodione ($1.6\cdot 10^{-5}$ M). Empty polypropylene SPE tubes (1 mL, supelco, Bellfonte, USA) with PE frits (20 μm porosity) were connected to a vacuum manifold, and 20 mg of the MIP (or NIP) were slurried with acetonitrile and packed into the cartridges. A second frit was inserted on top of the solvent bed. The cartridges were conditioned using 5 mL of acetonitrile, 5 mL of methanol and 5 mL of 13 % ethanol in water. 6 mL of the wine sample were loaded. The cartridges were washed sequentially with 5 mL of 13 % ethanol in water and 2 mL of 30 % acetonitrile in water. The cartridges were air-dried for 5 min under vacuum (14 psi) after the final stage of the wash step. The iprodione was eluted using 2 mL of acetonitrile. Finally, the loading, washing and eluting solutions were analyzed by HPLC-UV. The behavior of the NIP under these SPE conditions (NISPE) was evaluated and compared with the corresponding MIP.

2.5 Results and discussion

2.5.1 Preliminary analysis: choice of monomer owing to molecular simulation

The prearrangement phase is an important step in polymer synthesis. During this phase, a complex is formed between the template and a functional monomer. Here is our hypothesis: the more stable or stronger this complex, the more selective the MIP is supposed to be. In order to determine the best functional monomer that can complex with iprodione in toluene, molecular dynamic (MD) simulations of prepolymerization mixtures composed of iprodione and 10 monomers were performed. The average number of monomers in contact with iprodione was determined in the MD simulations. A given monomer was considered to belong to the coordination shell of iprodione if either: (1) at least one hydrophilic atom (oxygen or nitrogen) of the monomer was within 3.5 Å of one hydrophilic atom of iprodione, or (2) a heavy atom of the monomer was within 4.5 Å of a carbon or a chloride atom of iprodione. The average number of monomers found in the coordination shell of iprodione is given in **Table 1**.

Table 1 Mean number of functional monomers found in the coordination shell of iprodione, averaged over either the whole MD simulations or over only the last ns of the simulations.

Time interval	0-2 ns	1-2 ns
Monomer		
Allylamine	1.91 ± 1.17	2.25 ± 1.22
Vinylpyridine	1.56 ± 0.86	1.20 ± 0.71
Acrylic acid	3.47 ± 1.58	2.72 ± 1.30
Itaconic acid	2.27 ± 1.36	1.60 ± 0.91
Methacrylic acid	1.89 ± 1.04	2.34 ± 0.96
Vinylbenzoic acid	1.24 ± 0.62	1.08 ± 0.27
Acrylamide	1.97 ± 1.27	2.03 ± 1.29
2-hydroxyethyl methacrylate	1.29 ± 1.24	1.87 ± 1.38
Methacrylamide	3.04 ± 1.46	3.54 ± 1.24
Phenylacrylamide	2.58 ± 1.39	3.08 ± 1.15

The large standard deviations reflect a highly fluctuating coordination shell of iprodione. For instance, the number of MAM molecules in contact with iprodione fluctuates between 0 and 7 over the MD simulation.

MAM was selected for the polymer preparation because it gave the largest coordination number especially over the last ns of the simulations. Examples of complexes formed between iprodione and MAM are shown in **Figure 15**.

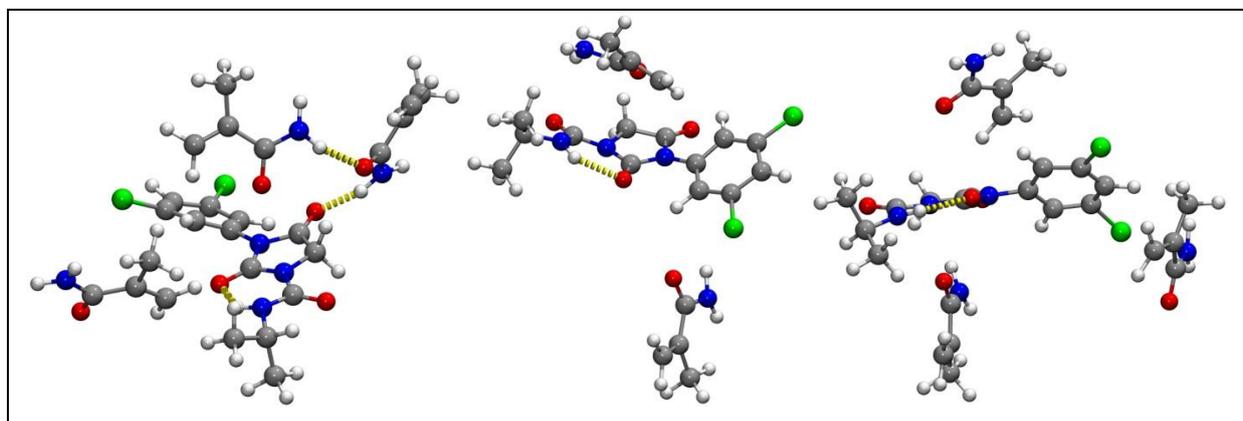


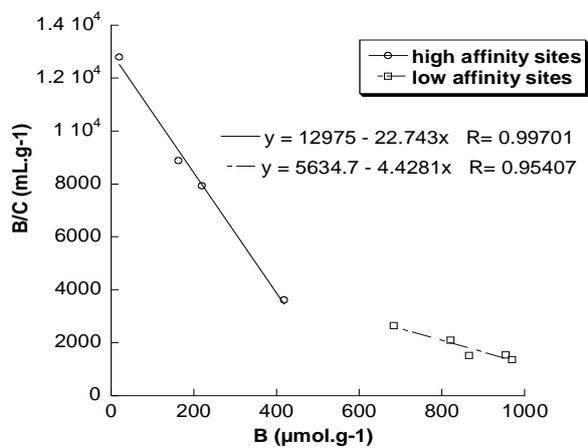
Figure 15 Typical complexes formed between iprodione and methacrylamide in the MD simulations. Hydrogen bonds are shown as dashed yellow lines. For clarity, toluene solvent molecules are omitted as well as the methacrylamide molecules lying outside the coordination shell of iprodione.

2.5.2 Analysis of binding properties in the discrete distribution model: Langmuir isotherm

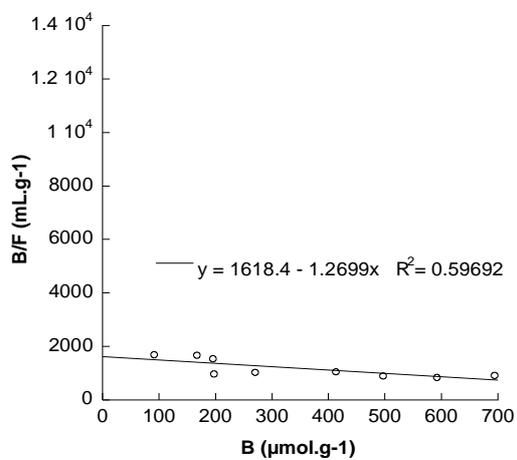
A simplified wine model solution (ethanol/water; 10/90 v/v) was chosen first as the solvent for binding experiments of iprodione with MIP. Iprodione has a low solubility in water ($13.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$). This low solubility prevents the construction of an equilibrium isotherm, as the process requires a high concentration range. The maximum concentration of iprodione in pure ethanol is $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. The proportion of ethanol in the hydro-alcoholic solvent was increased in order to achieve a wide range of concentrations. The solvent used was finally a 50/50 (v/v) hydro-alcoholic mixture.

The Scatchard plot of the batch rebinding essay in the range $10 - 1100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of iprodione solutions indicates that the recognition sites in this imprinted polymer are not consistent in nature. Two types of binding sites may be found, one of high affinity (site 1) and the other of low affinity (site 2) (**figure 16Aa**).

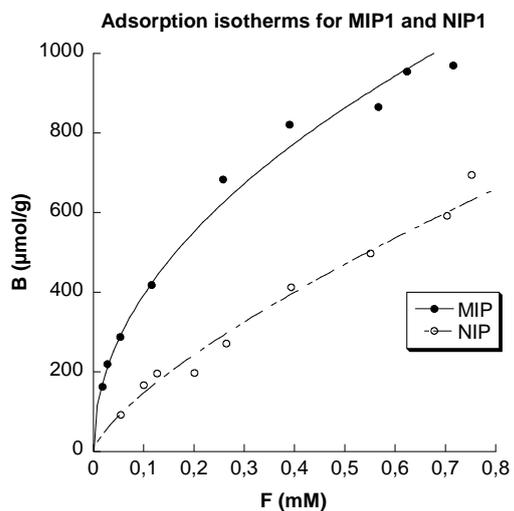
A a)



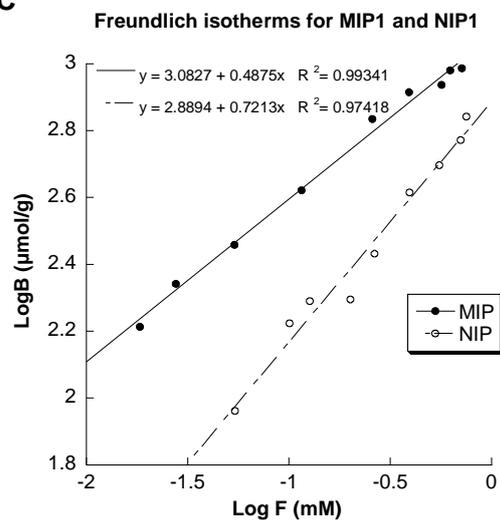
A b)



B



C



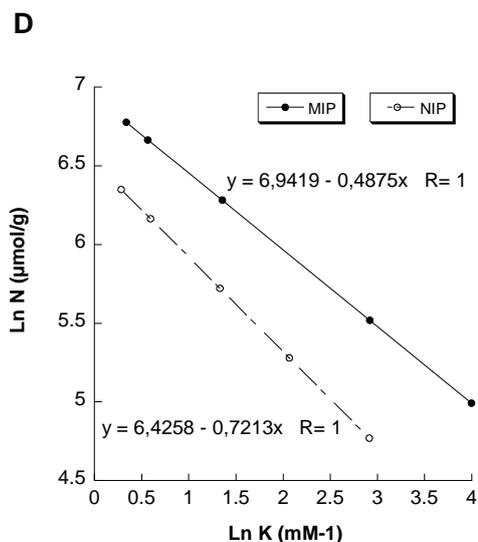


Figure 16 (A) Scatchard plot for (a) iprodione-MIP and (b) iprodione-NIP, (B) Experimental isotherms and Freundlich fits for iprodione imprinted MIP and non-imprinted NIP polymers, (C) Affinity distributions based on the Freundlich model plotted in log format and (D) Kinetic adsorption curves of iprodione on MIP and NIP in ethanol/water (50/50 v/v) at 25 °C. [iprodione] = 10⁻³ M.

The binding constant of the high affinity sites of the Molecular Imprinted Polymer we synthesised, K1iprodione-MIP, is 22.7 mL.µmol⁻¹ (2.27.10⁴ M⁻¹) as determined by the slope of the Scatchard regression equation within the iprodione concentration range of 10 – 613 µmol.L⁻¹:

K1 iprodione-MIP is about 5 times greater than the K2 iprodione-MIP value of the low affinity sites (4.4 mL.µmol⁻¹). The binding constant of the high affinity sites of iprodione-MIP is almost 17 times greater than the K iprodione-NIP value for the non-imprinted polymer (**figure 16Ab**) suggesting that the affinity of these binding sites is not very resilient. The maximum number of interaction sites, N1iprodione-MIP, is 570 µmol.g⁻¹. It was determined from the y-intercept of the Scatchard plot (equation 18). The calculated R_L values versus the initial concentration of iprodione were computed from equation 5. They vary between 0 and 1, indicating that the adsorption on the binding sites was favorable under the studied conditions.

2.5.3 *Analysis of binding properties in the continuous distribution model: FIAD*

MIP heterogeneity is well described by a continuous binding model, such as the Freundlich model. These continuous distribution models approximate the broad unimodal distribution in MIPs. They are supposed to give more appropriate binding parameters. With these models, the heterogeneity of binding sites can be quantitatively measured.

The adsorption isotherm was successfully depicted by the Freundlich isotherm adsorption model (**Figure 16B**). The lower heterogeneity parameter of the MIP ($m = 0.49$), obtained from the slope of the Freundlich isotherm, with respect to that of the control polymer NIP ($m = 0.75$) indicates that MIP is less heterogeneous than NIP. These values can be explained by the fact that the imprinting process increases the heterogeneity of the polymer. The “a” values show that the MIP has a higher binding capacity than the NIP.

Furthermore, the calculated imprinting factor, i.e. the ratio of the partition coefficient of iprodione on the MIP and the NIP was about 1.9, which corroborates the formation of imprinted cavities.

The affinity distribution calculated with the Freundlich model has been measured using the FIAD method in order to examine differences between MIP and NIP. This method evaluates the average number of binding sites $N_{K_{\min}-K_{\max}}$ which is a measure of the binding capacities of these polymers and weighted average affinity $K_{K_{\min}-K_{\max}}$.

The affinity distribution has been plotted in terms of $\ln(N(K))$ vs. $\ln(K)$ using the data obtained from the Freundlich isotherms (**Figure 16C**). It shows a visible difference between the respective ADs of MIP and NIP. The higher positioning of the MIP AD indicates a higher capacity of the MIP compared to NIP. They were calculated for $K_{\min} = 1.4 \text{ M}^{-1}$ and $K_{\max} = 54.4 \text{ M}^{-1}$.

The comparison of the average number of binding sites $N_{K_{\min}-K_{\max}}$ confirms that the imprinted polymer displayed much higher binding capacities than the corresponding non-imprinted polymer. Moreover, the average association constant $K_{K_{\min}-K_{\max}}$ is two times greater for the MIP than for the NIP.

2.5.4 *Analysis of binding properties in the Dubinin-Radushkevich model*

The mean adsorption energy E between the sorbate (iprodione) and the adsorbate (polymethacrylamide) was calculated from the Dubinin–Radushkevich model (equation 11). The MIP adsorption energy E_{MIP} was valued at $100 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ which is about 7 times higher than the NIP adsorption energy: 14 kJ mol^{-1} . These values of mean adsorption energy reveal the strength of the dipolar interactions and especially hydrogen bond forces between the MIP and the template and confirm that we successfully produced an MIP capable of concentrating iprodione before analysis of foods or beverages.

2.5.5 *Interpretation of kinetic results*

The adsorption kinetics processes of iprodione on MIP and NIP were studied in hydro-alcoholic solution and the results are shown in: **Figure 16D**.

The adsorption amount B of iprodione increased with time and flattens out after 20 min. MIP showed higher adsorption capacity than NIP. Under current conditions, iprodione adsorption by MIP is fastest in the first 10 min and equilibrium is reached in 20 min. To evaluate the adsorption kinetics and study the adsorption mechanisms such as mass transfer and the reactions involved, we fitted the experimental data using the pseudo-first order and the pseudo-second order kinetic models.

The Lagergren first order rate constants, k_1 and the calculated amount of adsorbed iprodione, $B_{e,cal}$ were determined using equation (14) by plotting $\log (B_e - B_t)/B_t$ vs. t . The experimental kinetic data were further analyzed using the pseudo second order kinetic model to determine k_2 and $B_{e,cal}$ using equation (15) by plotting t/B_t vs. t . The adsorption constants and linear regression values for the pseudo-first order are summarized in **Table 2** and for the pseudo-second order in

Table 3.

Table 2 Pseudo-first order parameters and correlation coefficients for the adsorption of iprodione on MIP and NIP at 25 °C.

	Experimental Be (mg.g ⁻¹)	Pseudo-first-order model		Calculated Be (mg.g ⁻¹)
		k ₁ (min ⁻¹)	R ²	
MIP	621	260	0.9681	455
NIP	367	155	0.9402	190

Table 3 Pseudo-second order parameters and correlation coefficients for the adsorption of iprodione on MIP and NIP at 25 °C.

	Experimental Be (mg.g ⁻¹)	Pseudo-second-order model				Calculated Be (mg.g ⁻¹)
		k ₂ (g.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	R ²	u (mg.g ⁻¹ .min ⁻¹)	t ^{1/2} (min)	
MIP	621	1.60×10 ⁻³	0.9997	625	1	625
NIP	367	3.80×10 ⁻⁴	0.9999	526	7.1	370

It is plain that the pseudo second order kinetic model provides higher values of correlation for the adsorption of iprodione onto MIP and NIP than the pseudo first order kinetic model.

This result suggests that the rate-determining step may be a strong interaction named chemical sorption in the MIP field. This result is consistent with the conclusion derived from the application of the Dubinin-Radushkevich model.

The applicability of these models to describe the adsorption process is further validated by the relative error, RE (%), which is defined as:

$$RE\% = 100 \times \frac{(|Be, cal - Be, exp|)}{Be, exp}$$

where B_{e,exp} and B_{e,cal} (mg.g⁻¹) are the experimental and the calculated adsorption uptakes at equilibrium and at any time t. The RE was calculated using the pseudo-second-order kinetic model. It is equal to 0.8 % for NIP and 0.6 % for MIP. These very low values validate the pseudo-second order model.

2.5.6 Application of MISPE in real samples: white wine.

A white wine sample spiked with iprodione was loaded onto MISPE and NISPE columns. **Figure 17A** shows the loaded amount of iprodione onto the two columns. It shows also the sorbed and the eluted amount of iprodione from MISPE and NISPE columns. Iprodione is retained in the NISPE column due to nonspecific interactions, unlike the MISPE column where iprodione is retained due to specific and nonspecific interactions. The specific interactions explain the higher sorbed amount of iprodione on the MISPE column in comparison with the NISPE column. The washing step eliminates the iprodione bound to the MIP and the NIP polymers by nonspecific interactions. The elution step recovers the iprodione bound to the MIP polymer by specific interactions.

The recovery calculated including iprodione determined after washing and elution was about 103 % for the MISPE and 96 % for the NISPE. The capacity of the MIP was determined at 23 μg per 20 mg polymer. The applicability of the synthesized MIP under real conditions is demonstrated since several conditions are met i) the high column capacity with the MIP of 1.12 mg/g polymer, ii) the quantitative recovery of iprodione, and iii) the specific elution of iprodione.

The chromatograms of wine sample spiked with iprodione, of MISPE and NISPE eluting solutions are displayed in Figure 17B. The peak of iprodione could not be observed from chromatogram of the wine sample before preconcentration on the SPE columns. After the preconcentration and especially after the elution step with the MISPE column, the peak of iprodione (retention time: 5.8min) appeared distinctly and other irrelevant compounds in the real samples were almost eliminated compared to the initial chromatogram. The chromatograms confirmed that iprodione in wine samples was selectively preconcentrated by MISPE column and recovered by the eluting step. As shown in Figure 17B, the extraction efficiency of the NISPE column is much lower than that of the MISPE column since the iprodione peak is remarkably smaller in the case of the NISPE than MISPE.

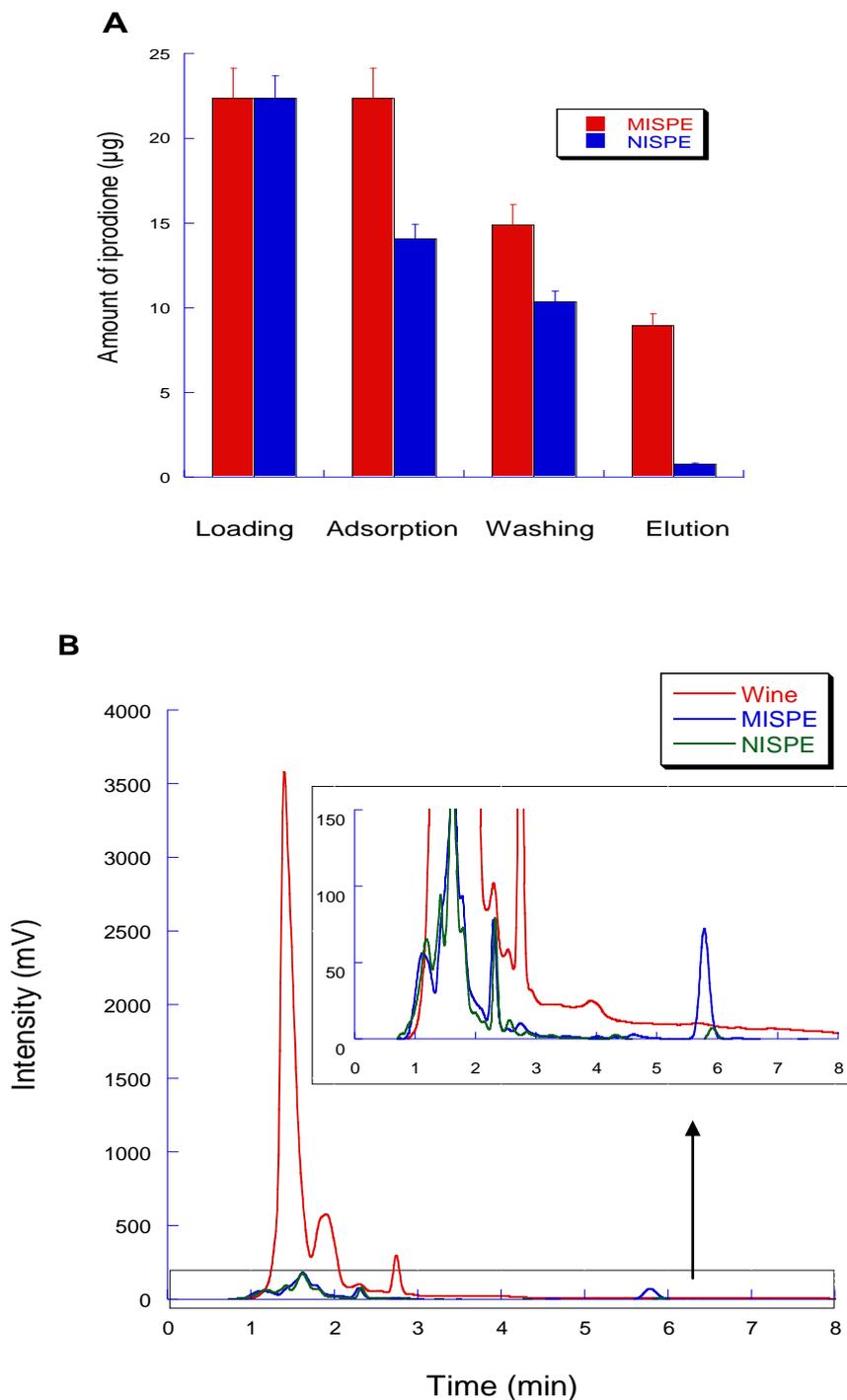


Figure 17 Adsorbed and recovered amount of iprodione after the washing step and the elution step from SPE columns packed with MIP (MISPE) and with NIP (NISPE), **(B)** Chromatograms of: the wine sample spiked with iprodione (wine) and eluting solutions from MISPE (EMIP) and NISPE (ENIP).

2.6 Conclusion

Iprodione-MIP was synthesized using iprodione as the template and methylacrylamide (MAM) as the functional monomer. MAM was selected from a series of 10 neutral, basic or acidic monomers because it had the strongest interaction with iprodione in the MD simulations that we performed. The solvent toluene was chosen in accordance with common practice in MIP synthesis, but further investigation on the effect of the type of solvent on the iprodione-MIP selectivity and efficiency is needed: toluene can interact by π - π interaction with the benzene ring of iprodione and thus influence cavity synthesis. DMPAP as initiator and EGDMA as crosslinking agent were chosen after a literature review, but an optimization of their proportions is required to improve the capacity of the MIP.

The iprodione adsorption behavior of MIP indicated that the adsorption equilibrium was reached in 20 min, with an imprinting factor of 1.9, showing that a better adsorption property was obtained toward iprodione than toward the control polymer. The adsorption isotherm studies indicated that the imprinting process provides two types of binding sites: low affinity and high affinity. Moreover, the imprinting process exhibits a continuous distribution of binding sites. The AD spectra were a useful tool in relating the number of binding sites to their associated energy. Furthermore, the high energy value calculated from the Dubinin-Radushkevich model indicated that the adsorption process revealed a high affinity of binding sites toward the template. The kinetic study confirmed this suggestion, showing a pseudo second order kinetics for the adsorption process. Finally, we demonstrated that the iprodione-MIP could be used as SPE (Solid Phase Extraction) enrichment sorbent in wine without prior sample treatment. Furthermore, its applicability on a hydroalcoholic solutions and wine sample outlined here may prove useful in complex matrices especially in aqueous media and needs further investigation in environmental water samples and optimization (higher imprinted factor and higher binding site).

3 Données supplémentaires

Dans cette partie, nous allons exposer les résultats obtenus suite au test du DPPH qui n'ont pas été détaillés dans l'article 1. Le test au DPPH a été utilisé pour vérifier que l'iprodione ne participe pas à la réaction de polymérisation radicalaire ce qui est une des conditions pour choisir ce fongicide comme molécule empreinte. Nous comparons ensuite les spectres du MIP et du NIP obtenus après une caractérisation par le moyen infrarouge à transformée de Fourier.

3.1 Vérification de la non-participation de la molécule empreinte à la synthèse : Test au DPPH

Pour pouvoir utiliser l'iprodione comme molécule empreinte, le test au DPPH a été réalisé afin de vérifier que l'iprodione est compatible avec la polymérisation radicalaire et qu'il ne participe pas au mécanisme réactionnel pendant la synthèse des MIP. La **Figure 18** montre que la densité optique du mélange DPPH[•]-iprodione reste stable au cours du temps. Par conséquent, l'iprodione n'a pas de capacité anti-radicalaire, ce qui nous a permis dans la suite des travaux de l'utiliser comme molécule empreinte dans la synthèse de nos MIPs.

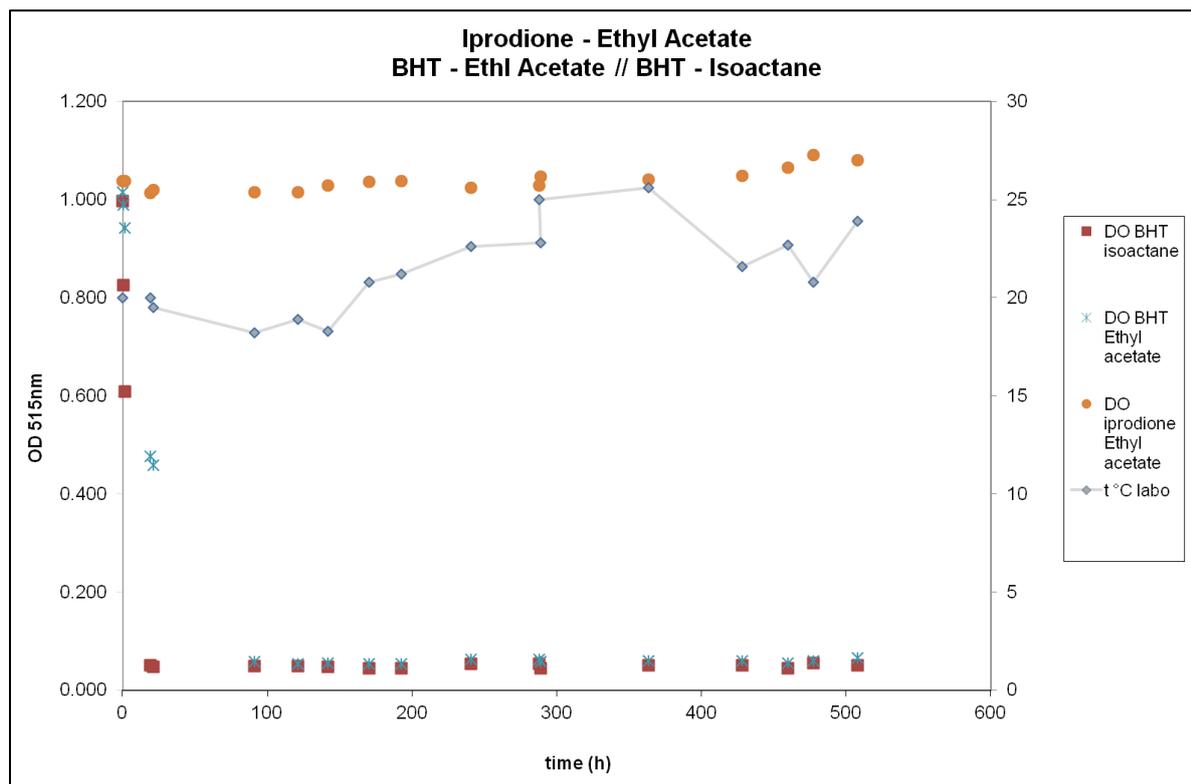


Figure 18 Suivi de la densité optique à 515 nm des mélanges DPPH-iprodone dans l'acétate d'éthyle (DO stable), et des mélanges de référence DPPH-BHT dans l'acétate d'éthyle et l'isooctane (décroissance de la DO).

3.2 Moyen infrarouge à transformée de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy FTIR*)

Le MIP et le NIP correspondant ont été caractérisés par FTIR et leurs spectres ont été comparés (**Figure 19**). Les bandes caractéristiques du MIP sont les mêmes que celles qui caractérisent le NIP : 1640 cm^{-1} (N-H de la fonction amide); 1690 cm^{-1} (C=O des groupements amides) ; 1259 cm^{-1} , 1053 cm^{-1} et 1728 cm^{-1} (C-O et C=O de la fonction ester).

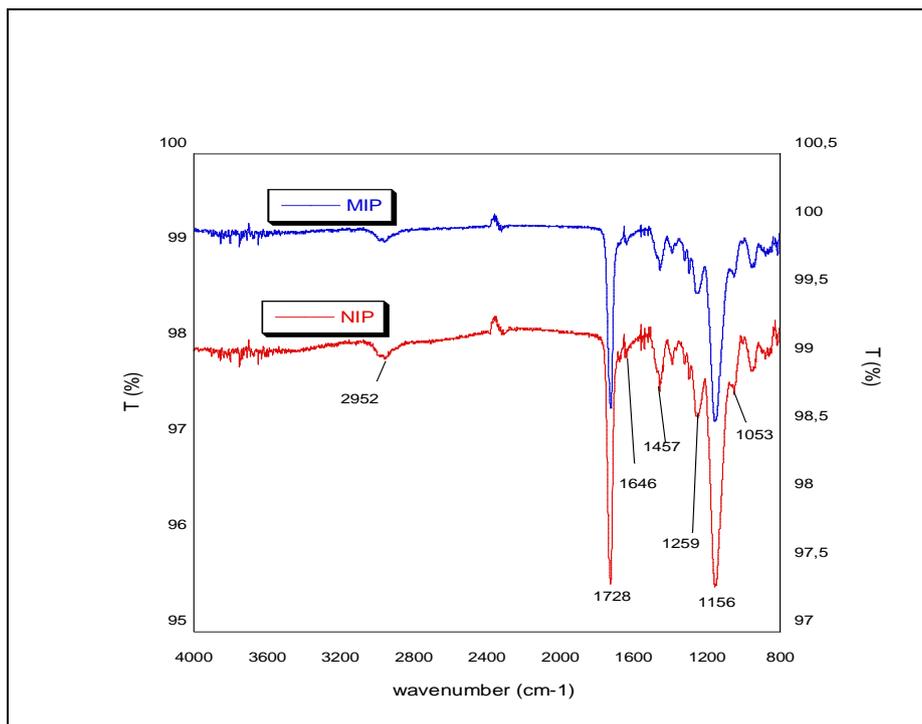


Figure 19 Spectres Infra-Rouge du MIP et du NIP

En conclusion, le MIP et le NIP ont la même structure physique et la même composition chimique. La spécificité du MIP par comparaison avec celle du NIP est due à la présence des sites spécifiques qui ont été créés dans le polymère imprimé grâce à la présence de la molécule empreinte pendant l'étape de synthèse.

4 Références

- Andersson LI, Müller R, Vlatakis G, & Mosbach K (1995). Mimics of the binding sites of opioid receptors obtained by molecular imprinting of enkephalin and morphine, 92, 4788-4792.
- Baggiani C, Baravalle P, Giraudi G, & Tozzi C (2007). Molecularly imprinted solid-phase extraction method for the high-performance liquid chromatographic analysis of fungicide pyrimethanil in wine. *Journal of Chromatography A*, 1141(2), 158-164.
- Bailey HD, Armstrong BK, de Klerk NH, Fritschi L, Attia J, Scott RJ, Smibert E, Milne E, & for the Aus ALLC (2011). Exposure to professional pest control treatments and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Cancer*, 129(7), 1678-1688.
- Brooks BR, Brooks CL, Mackerell AD, Nilsson L, Petrella RJ, Roux B, Won Y, Archontis G, Bartels C, Boresch S, Caflisch A, Caves L, Cui Q, Dinner AR, Feig M, Fischer S, Gao J, Hodoscek M, Im W, Kuczera K, Lazaridis T, Ma J, Ovchinnikov V, Paci E, Pastor RW, Post CB, Pu JZ, Schaefer M, Tidor B, Venable RM, Woodcock HL, Wu X, Yang W, York DM, & Karplus M (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, 30, 1545-1614.
- Chianella I, Lotierzo M, Piletsky SA, Tothill IE, Chen B, Karim K, & Turner APF (2002). Rational Design of a Polymer Specific for Microcystin-LR Using a Computational Approach. *Analytical Chemistry*, 74(6), 1288-1293.
- Curgier J-P BS (2005). Plan de surveillance résidus en viticulture. Campagnes viticoles 1990-2003. Direction générale de l'alimentation. sous direction de la qualité et de la protection des végétaux.
- Geai J-P (2013). Message in bottle. *Que choisir*.
- Ho YS, & McKay G (1999). Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochemistry*, 34(5), 451-465.
- Kobaisi M, Tate M, Rix C, Jakubov T, & Mainwaring D (2007). The effect of molecular imprinting on the pore size distribution of polymers. *Adsorption*, 13(3-4), 315-321.
- Martín-Esteban A (2013). Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 45(0), 169-181.
- Matsui J, Fujiwara K, & Takeuchi T (2000). Atrazine-Selective Polymers Prepared by Molecular Imprinting of Trialkylmelamines as Dummy Template Species of Atrazine. *Analytical Chemistry*, 72(8), 1810-1813.
- Mosbach K (1994). Molecular imprinting. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(1), 9-14.
- Nougadère A, Sirot V, Kadar A, Fastier A, Truchot E, Vergnet C, Hommet F, Baylé J, Gros P, & Leblanc J-C (2012). Total diet study on pesticide residues in France: Levels in food as consumed and chronic dietary risk to consumers. *Environment International*, 45(0), 135-150.
- Piletsky S, Piletska E, Karim K, Foster G, Legge C, & Turner A (2004). Custom synthesis of molecular imprinted polymers for biotechnological application: Preparation of a polymer selective for tylosin. *Analytica Chimica Acta*, 504(1), 123-130.
- Seebach A, & Seidel-Morgenstern A (2007). Enantioseparation on molecularly imprinted monoliths-Preparation and adsorption isotherms. *Analytica Chimica Acta*, 591(1), 57-62.

- Sellergren B (1989). Molecular imprinting by noncovalent interactions. Enantioselectivity and binding capacity of polymers prepared under conditions favoring the formation of template complexes. *Die Makromolekulare Chemie*, 190(11), 2703-2711.
- Sellergren B, & Andersson L (1990). Molecular recognition in macroporous polymers prepared by a substrate analog imprinting strategy. *The Journal of Organic Chemistry*, 55(10), 3381-3383.
- Shea KJ, & Dougherty TK (1986). Molecular recognition on synthetic amorphous surfaces. The influence of functional group positioning on the effectiveness of molecular recognition. *Journal of the American Chemical Society*, 108(5), 1091-1093.
- Spivak D, Gilmore MA, & Shea KJ (1997). Evaluation of Binding and Origins of Specificity of 9-Ethyladenine Imprinted Polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 119(19), 4388-4393.
- Tseng R-L (2007). Physical and chemical properties and adsorption type of activated carbon prepared from plum kernels by NaOH activation. *Journal of Hazardous Materials*, 147(3), 1020-1027.
- Umpleby Ii RJ, Baxter SC, Bode M, Berch Jr JK, Shah RN, & Shimizu KD (2001). Application of the Freundlich adsorption isotherm in the characterization of molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, 435(1), 35-42.
- Umpleby Ii RJ, Baxter SC, Rampey AM, Rushton GT, Chen Y, & Shimizu KD (2004). Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography B*, 804(1), 141-149.
- Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J, Darian E, Guvench O, Lopes P, Vorobyov I, & Mackerell AD (2010). CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry*, 31(4), 671-690.
- Vanommeslaeghe K, & MacKerell AD (2012). Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: Bond Perception and Atom Typing. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(12), 3144-3154.
- Whitacre DM, Kesavachandran C, Fareed M, Pathak M, Bihari V, Mathur N, & Srivastava A (2009). Adverse Health Effects of Pesticides in Agrarian Populations of Developing Countries. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 200, 33-52.
- Wulff G, Heide B, & Helfmeier G (1986). Enzyme-analog built polymers. 20. Molecular recognition through the exact placement of functional groups on rigid matrixes via a template approach. *Journal of the American Chemical Society*, 108(5), 1089-1091.
- Yao W, Fang Y, Gao GLZ, & Cheng Y (2008). Adsorption of carbaryl using molecularly imprinted microspheres prepared by precipitation polymerization. *Polymers for Advanced Technologies*, 19(7), 812-816.

**Chapitre 2 Etude par plan d'expériences de l'influence des
paramètres de la synthèse sur les propriétés de
reconnaissance d'un iprodione-MIP et choix du polymère
optimal spécifique de l'iprodione dans un milieu
hydroalcoolique.**

1 Introduction

Dans le chapitre précédent nous avons présenté la synthèse d'un MIP spécifique de l'iprodione à partir du méthacrylamide comme monomère fonctionnel et l'EGDMA comme agent réticulant. Dans la synthèse d'un MIP, il est indispensable de réduire le nombre de sites non spécifiques. En partant de cet objectif, nous avons cherché les facteurs qui peuvent avoir une influence sur la formation des sites non spécifiques. Un de ces facteurs est la nature de l'agent réticulant puisqu'il constitue la charpente du polymère qui est responsable des interactions non spécifiques. Dans le but d'augmenter la spécificité du polymère, nous avons voulu renforcer les interactions spécifiques. Pour cela, nous avons utilisé au cours de la synthèse un deuxième monomère fonctionnel (styrène) pouvant établir avec l'iprodione des interactions π - π qui viennent s'ajouter aux interactions hydrogène formées entre l'iprodione et le méthacrylamide. En outre, la synthèse par polymérisation en masse nécessite le broyage du monolithe formé ; ce qui pourrait provoquer la perte d'une partie des sites imprimés spécifiques et donc diminuer la spécificité du polymère. Pour cette raison, nous avons opté pour une synthèse par polymérisation par précipitation.

Les principaux objectifs sont:

- Obtenir un MIP plus performant que celui obtenu dans le premier chapitre.
- Comprendre l'effet des paramètres : nature de l'agent réticulant, type de monomère fonctionnel et voie de polymérisation sur les propriétés de reconnaissance des MIPs.

La méthode des plans d'expériences a été appliquée pour l'étude de l'influence de trois facteurs sur la synthèse l'iprodione-MIP. Les facteurs étaient: la méthode de polymérisation, la nature de l'agent réticulant et le type de monomère fonctionnel. Pour chaque facteur, deux niveaux ont été étudiés: la polymérisation en masse et la polymérisation par précipitation pour le premier facteur, le triméthylolpropane triméthylate (TRIM) et le diméthacrylate d'éthylène glycol (EGDMA) pour le second facteur, et le méthacrylamide (MAM), seul ou avec le styrène, pour le troisième facteur. Les réponses étaient : le facteur d'impression, le nombre de sites et la constante d'affinité apparente. Nous avons étudié la performance des MIPs vis-à-vis de l'iprodione en milieu hydro-alcoolique après une extraction en « batch ». Le polymère le plus performant était synthétisé en utilisant la polymérisation par précipitation, le méthacrylamide comme monomère fonctionnel et l'EGDMA comme agent réticulant. Une extraction en phase solide à empreintes moléculaires (MISPE) a été réalisée en utilisant le meilleur MIP et ceci pour tester son efficacité sur une solution de vin modèle (90/10, v/v, eau/éthanol) dopée par de l'iprodione. Cette étude a montré que le MIP le plus performant pourrait être utilisé pour pré-concentrer l'iprodione dans des solvants polaires, il pourrait être appliqué sur des matrices alimentaires telles que des le vin ou environnementales telles que l'eau.

Les principaux résultats obtenus sont:

- La synthèse d'un polymère de performances satisfaisantes. Il a été obtenu suite à une polymérisation par précipitation après une copolymérisation du méthacrylamide et de l'EGDMA.
- L'utilisation de ce MIP pour des applications alimentaires et environnementales.
- L'utilisation du TRIM à la place de l'EGDMA n'améliore pas la spécificité du MIP.
- L'ajout du styrène diminue la spécificité du MIP lorsque la synthèse se fait dans le toluène. Ce dernier est capable de former des interactions $\pi-\pi$, il entre en compétition avec le styrène pour interagir avec l'iprodione dans le complexe de prépolymérisation.

2 Article 2 : Experimental design approach in the synthesis of molecularly imprinted polymers specific for iprodione

Manal Bitar, Jacqueline Maalouly, Hanna Chebib, Adrien Lerbret, Philippe Cayot, Elias Bou-Maroun.

2.1 Abstract

An experimental design (ED) approach was applied to study the influence of three factors on the synthesis of a molecularly imprinted polymers (MIP) specific for the fungicide iprodione. The objective was to obtain a high specific optimal polymer. Iprodione MIPs were synthesized by non-covalent method and the ED factors were: the polymerization method, the crosslinker nature and the functional monomer type. For each factor, two levels were studied: bulk and precipitation polymerization for the first factor, trimethylolpropane trimethylate TRIM and ethylene glycol dimethacrylate EGDMA for the second factor, and methacrylamide (MAM) alone or with styrene for the third factor. The ED responses were: the imprinting factor, the sites number and the apparent affinity constant, they were compared to study the effect of the ED factors on the MIP's performance in hydro-alcoholic medium. The optimal polymer of the ED was synthesized using MAM as functional monomer, EGDMA as crosslinker and precipitation polymerization. It has 2.4 as imprinting factor, 1172 as sites number and 19.36 as affinity constant. Molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) was carried out using the optimal MIP to test its efficiency on a wine model solution and the MISPE was found to be 2.5 times more efficient than the NISPE (non-imprinted SPE) for the preconcentration of iprodione. The optimal polymer could be used to pre-concentrate iprodione in polar solvents; it could be applied on food samples such as wine or environmental samples such as water.

2.2 Introduction

Although chemical fungicides have been used to deal with the problems of the common fungicide encountered in viticulture pests, they can be non-specific and therefore can act on organisms other than the target fungus, including other naturally occurring beneficial or pathogenic organisms (Calhelha, Andrade, Ferreira & Estevinho, 2006). Despite numerous merits, pesticides may also be toxic, mobile, long-term stable and capable of bioaccumulation. These compounds have been detected in all types of water circulating in the ecosystem, creating a potential source of exposure to life and health of all living organisms. Therefore, constant monitoring of these xenobiotics in the environment is needed (Cabras et al., 2000;

Tankiewicz, Fenik & Biziuk, 2010; Tankiewicz, Morrison & Biziuk, 2013). Chemical residues can build up in the soil and throughout the food chain. Consumers world-wide are increasingly conscious of the potential associated with the build-up of toxic chemicals, particularly in food products (Calhelha et al., 2006). Pesticides are an important class of toxic organics that could be present in our food and are suspected of being linked to a broad spectrum of medical problems such as cancer, neurotoxic effects, reproductive health concerns and endocrine disruption. The increasing public concern about the potential environmental and health problems posed by the presence of these toxic residues in the human diet has focused a lot of attention on food quality and safety (Bailey et al., 2011; Nougadère et al., 2012; Whitacre et al., 2009). In spite of extensive regulations about pesticide residues in fruits, vegetables, and drinking water, scarce attention is paid to derived products such as wine which may contain these commodities as ingredients. The Pesticide-Action-Network EU have published a study (2008.) indicating that 100% of conventional wines around the world contain pesticides. A study of “Que choisir” journal (Geai, 2013) publicized by radios found similar observations (all 92 examined samples were contaminated) which deteriorates the image of the wine.

In particular, iprodione, a contact fungicide used for a variety of crops, has been detected in more than 90 % of French wines according to a survey by the French Ministry of Agriculture (CUGIER & BRUCHET, 2005.). It is a pesticide that inhibits the germination of fungal spores on the surface of fruits, but it is also a harmful substance for humans (R22, R40), toxic for aquatic organisms (R50/53), and not readily biodegradable. Because of its poor biodegradability and the risk of accumulation, the use of iprodione for crops will expire on 31 October 2016 .

However, pesticides are often present at low concentrations and have diverse physicochemical properties (e.g. polarity, solubility, volatility, and acidic/base characteristics) (Flamini & Panighel, 2006; Tankiewicz et al., 2013), which may make difficult their extraction and analysis may be difficult (Tankiewicz et al., 2013).

Due to its wide field of application, the molecularly imprinted polymer (MIP) technique is one of the most important separation techniques in terms of specific recognition and selectivity. Nowadays, molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) technique is the most advanced technical application of MIPs (Singh Saini & Kaur, 2012). During the MIP synthesis, functional monomers establish binding interactions in a porogen with a target compound named template. In the succeeding polymerization, a crosslinker enwraps the pre-arranged complex. Subsequent removal of the template molecules leads to specific binding sites that match completely with the template in shape and functionality (Haupt & Mosbach, 2000; Mosbach, 1994; Yao et al., 2008). So far, the molecular imprinting has been applied to the analysis and determination of some pesticides (Baggiani et al., 2007b; Kobaisi et al., 2007; Matsui et al., 2000; Yao et al., 2008). In the MIP synthesis, a considerable number of parameters take part, so that a very large number of synthesis mixtures is required with different reaction conditions for the one-variable-at-a-time approach. Another approach based on the concepts of experimental design leads to a significant reduction in the number of synthesis trials. A multi-variable experimental design, in which several synthesis variables are changed at the same time, can be applied to the synthesis of molecularly imprinted polymers (MIP) in order to investigate the factors influencing the MIP's performance, and to select the optimal experimental synthesis strategy.

The experimental design was applied so far in a dozen of publications from the MIP's field to optimize amounts of the proportions used in the pre-polymerization mixture (Ceolin, Navarro-Villoslada, Moreno-Bondi, Horvai & Horvath, 2009; Davies, De Biasi & Perrett, 2004; Kunath, Marchyk, Haupt & Feller, 2013; Navarro-Villoslada, Vicente & Moreno-Bondi, 2004), the initiator and polymerization type (i.e. thermal or UV initiation) (Ceolin et al., 2009; Mijangos et al., 2006; Navarro-Villoslada et al., 2004), the polymerization time and the temperature (Mijangos et al., 2006), as well as the type of monomers and/or the porogen (Navarro-Villoslada et al., 2004). Nevertheless, the interactions between the influence of using different polymerization approaches (i.e. bulk, precipitation, suspension...), the effect of a copolymerization using two functional monomers and changing the crosslinker type have not been studied yet using the experimental design approach.

The aim of the present work is to study the influence of three factors (the polymerization method, the crosslinker nature and the functional monomer type) on the recognition properties of a molecularly imprinted polymer specific for a fungicide found as residue in food, especially in wine samples: the iprodione. For this purpose, we used the experimental design approach. We varied the influencing factors, and studied their effect on three dependant variables describing the recognition capacity of the MIP: the association constant (K), the sites number (N) and the imprinting factor (IF). Finally, the efficiency of the optimal MIP was tested on wine model solution using MISPE.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Chemicals

Iprodione [CAS number 36734-19-7], methacrylamide (MAM) [CAS number 79-39-0], Styrene [CAS number 100-42-5] ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) [CAS number 97-90-5], trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM) [3290-92-4] 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPAP) [CAS number 24650-42-8], toluene, acetonitrile, ethanol and acetic acid were purchased from Sigma Aldrich, France. Solvents were HPLC grade and were used without any purification. High purity de-ionized water, obtained with an Elga Ionic system PURELAB Option, was used in the batch experiments and in the mobile phase mixture.

2.3.2 Polymers preparation

2.3.2.1 Experimental design

A 2^3 full factorial experimental design was utilized in this study; three parameters, namely: the crosslinker (X_1), the functional monomer (X_2) and the polymerization method (X_3) were selected as the factors whose influence on the three following variables: the sites number (Y_1), the affinity constant (Y_2) and the imprinting factor (Y_3) has to be systematically studied. Two levels, expressed as coded values (+1) and (-1), were considered for each of the three factors under investigation.

Table 4 shows the coded levels of the 2^3 experimental design. All other synthesis conditions were kept invariant throughout the study. The calculated model was of the form:

$$Y \text{ (response)} = b_0 + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_3 \cdot X_3 + b_{12} \cdot (X_1 \cdot X_2) + b_{13} \cdot (X_1 \cdot X_3) + b_{23} \cdot (X_2 \cdot X_3) + b_{123} \cdot (X_1 \cdot X_2 \cdot X_3).$$

Where b_0 is the average of the responses, b_1 , b_2 and b_3 denote the coefficients of the factors X_1 , X_2 and X_3 (representing the effect of each factor ordered within -1 , $+1$) and b_{12} , b_{13} and b_{23} stand for the coefficients of the first order interactions. b_{123} is coefficient of the second order interaction. This statistical analysis was performed employing NEMRODW® software (Nemrodw, L.P.R.A.I., Marseille, France). It provided several informations: i) the regression quality was evaluated by the determination coefficient R^2 and the adjusted determination coefficient R^{2a} which takes into account the freedom degree of the system. ii) the standard deviation, SD. iii) the coefficients values b_i and their SD.

Table 4 Coded levels and corresponding physical values of the 2^3 factorial experimental design.

Factors	X1	X2	X3
Levels	Crosslinker (C)	Functional monomer (FM)	Polymerization method (PM)
-1	Trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM)	Methacrylamide (NoS)	Monolith (M)
+1	Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)	Methacrylamide+styrene (S)	Precipitation (P)

2.3.2.2 Polymers synthesis

MIPs in bulk were prepared with 1 mmol of the functional monomer, 4 mmol of the crosslinker and 0.1 mmol of the template. The polymerization was carried out in 1 mL of toluene using 0.05 mmol of DMPAP initiator. The MIPs synthesized following the precipitation approach contained 20 mL of the toluene porogen.

In a typical synthesis, the functional monomer and the iprodione were weighed in a test tube and dissolved in toluene. After the addition of EGDMA and DMPAP, the mixture was degassed in an ultrasonic bath for 10 minutes. The tubes were then sealed and exposed to ultraviolet radiation overnight. The polymers obtained by precipitation were separated and dried, whereas bulk polymers were grounded into powder.

For comparison purposes, corresponding non-imprinted polymers (NIP) were prepared in accordance with the process described above, except that the polymerization mixture did not contain the template.

2.3.2.3 Template removal

In order to remove the template, the polymer particles were soaked in the mixed solvent of acetic acid and ethanol (30/70, v/v) and subjected to ultrasonic treatment for 10 minutes. This mixture was meant to break the dipole-dipole interactions between iprodione and the polymer. Washing in ethanol continued until the template could no longer be detected with HPLC. The solvent was then removed by centrifugation, and the fine particles were dried at 65 °C overnight. These fine particles were used in the subsequent experiments.

2.3.3 Instrumentation

Reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was performed using a C18 column on a Shimadzu LC equipped with a 25 μ L loop injector, an SPD 20AT UV-visible absorbance detector and an LC-20AT liquid pump. Acetonitrile/water (60/40, v/v) was used as mobile phase and the flow rate was 1.0 mL \cdot min⁻¹. Detection was performed at 220 nm, which is the maximum adsorption wavelength of iprodione.

2.3.4 Rebinding experiments and response parameters

Equilibrium isotherm data were obtained in a batch wise approach. 10 mg of cleaned imprinted polymer or non-imprinted polymer were suspended in 20 mL of hydro-alcoholic solutions containing from 1×10^{-5} to 1.1×10^{-3} M of iprodione. These isotherms were made with 50:50 (v/v) ethanol/water solutions. The mixture was shaken continuously for 2 hours at 25 °C. After removal of the polymer particles by filtration (0.45 µm filter), the solution was analyzed by HPLC-UV. The amount of iprodione rebound per gram of dry polymer, B ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$), was calculated using the concentration of free iprodione, F ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and based on the weight of the polymer and the initial iprodione concentration in the rebinding solution. A direct calculation of bound-iprodione is impossible because of remaining iprodione in MIP after several washing.

2.3.4.1 Binding sites number (N) and affinity constant (K)

The Freundlich equation is determined to be a suitable binding isotherm model for MIPs when an acceptable fit is obtained. In this case, the regression coefficient R^2 is equal to 0.97–0.99. The equation for the affinity distribution can be written, incorporating the parameters of the Freundlich equation into:

$$N(K) = 2.303am(1 - m^2)e^{-2.303m \log K} \text{ (García-Calzón & Díaz-García, 2007)}$$

Where “m” corresponds to the heterogeneity index of polymers, it reflects the homogeneity of binding sites and “a” is a Freundlich parameter related to the binding affinity.

The sites number and the weighted average affinity $N_{K_1-K_2}$ and $K_{K_1-K_2}$ can be measured for any set of $K_1 - K_2$ values that are within the boundaries K_{\min} and K_{\max} .

$$K_{\max} = \frac{1}{F_{\min}} \quad \text{and} \quad K_{\min} = \frac{1}{F_{\max}}$$

Further, when comparing binding parameters $N_{K_1-K_2}$ and $K_{K_1-K_2}$, it is important to calculate them over the same range of binding sites (K_1 and K_2) (Umpleby Ii et al., 2001):

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

$$K_{K_1-K_2} = \frac{m}{m-1} \frac{K_1^{1-m} - K_2^{1-m}}{K_1^{-m} - K_2^{-m}}$$

2.3.4.2 Imprinting factor

The imprinting factor was calculated by the equation $IF = K_{pMIP}/K_{pNIP}$ (Sellergren, Schillinger & Lansa, 2009), where K_p is the partition constant $K_p = B/F$. It was chosen as a response for its ability to evaluate both the efficiency of every MIP of the experimental design and the strength of iprodione-monomer interactions under every polymerization conditions.

2.3.5 *Molecular dynamic simulations*

Molecular dynamics (MD) simulations of prepolymerization mixtures were performed. These mixtures were composed of iprodione and methacrylamide as a monomer, or methacrylamide and styrene as co-monomers. For this purpose, the CHARMM program was used (Brooks et al., 2009b) with the parameters of the CGenFF force field (Vanommeslaeghe et al., 2010) (version 2b7), which were generated automatically by the CGenFF program (Vanommeslaeghe & MacKerell, 2011) (version 0.9.6), accessible at paramchem.org. No further optimization of these parameters was performed.

The SHAKE algorithm (Ryckaert, Ciccotti & Berendsen, 1977) was employed to restrain the length of all the bonds involving a hydrogen atom and the equations of motion were integrated with the Verlet leapfrog algorithm using a time step of 1 fs. Van der Waals interactions were smoothly force switched to zero between 8 and 10 Å and Lorentz-Berthelot mixing rules were used for cross-interaction terms. The particle mesh Ewald method was considered to account for electrostatic interactions, with $\kappa = 0.33 \text{ \AA}^{-1}$ and the fast-Fourier grid spacing set to $\sim 1 \text{ \AA}$.

The mixtures were prepared as follows: First, a cubic simulation box containing 128 toluene molecules was generated. Then, the iprodione template was superimposed at the center of this box, and the functional monomers were subsequently inserted with random positions and orientations. Finally, each toluene molecule that overlapped with either the template or the monomers was removed. The configurations generated were first minimized by means of the

steepest descent algorithm (1000 iterations) in three successive steps: (i) with frozen atomic positions of the template and the monomers, (ii) with fixed positions of the heavy atoms of the template, and (iii) with no constraint on any atom of the simulation box. A final minimization of 2000 steps with the conjugate gradient algorithm was conducted. A 10-ps MD simulation in the microcanonical (N,V,E) ensemble was then performed to heat the system from 100 K to 298 K. Finally, MD simulations in the isothermal-isobaric (N,P,T) ensemble with $T = 298$ K and $p = 1$ atm were run for 10 ns and only the last 9 ns were considered for analysis. Three independent simulations were performed for each system

2.3.6 *Molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE)*

MISPE method was applied on wine model solutions composed of water/ethanol (90/10, v/v) and spiked with iprodione ($1.6 \cdot 10^{-5}$ M). Empty polypropylene SPE tubes (1 mL, supelco, Bellfonte, USA) with PE frits (20 μ m porosity) were connected to a vacuum manifold, and 20 mg of the MIP (or NIP) were slurried with acetonitrile and packed into the cartridges. A second frit was inserted on top of the solvent bed. The SPE cartridges were activated with 5 mL of methanol and conditioned with 5 mL of 10 % ethanol in water. Samples were applied to the cartridges and washed sequentially with 5 mL of 10 % ethanol in water. The cartridges were dried for 5 min under vacuum (14 psi) after the final stage of the wash step.

In order to get the optimal eluting solution, different eluting compositions were tested using ethanol-water mixtures, with different eluent strengths, keeping the same conditions for the other steps. SPE steps were controlled by analyzing iprodione in the effluents by HPLC-UV. The behavior of the NIP under these SPE conditions (NISPE) was evaluated and compared with the corresponding MIP.

2.4 Results and discussion

2.4.1 *Rebinding experiments and response parameters*

Factors of the 2^3 factorial experimental design C, FM and PM are presented in **Table 5**.

Table 5 Overview of the experimental design results–responses: N, K and IF, from variation of the selected factors: C, FM and PM.

Experience number	Polymer	C	FM	PM	N	K	IF
1	MIP1	TRIM	MAM	M	702	8.78	1.70
2	MIP2	EGDMA	MAM	M	538	5.32	1.90
3	MIP3	TRIM	MAM+S	M	667	8.82	1.00
4	MIP4	EGDMA	MAM+S	M	726	10.28	1.00
5	MIP5	TRIM	MAM	P	737	8.61	2.36
6	MIP5a	TRIM	MAM	P	823	7.77	2.23
7	MIP5b	TRIM	MAM	P	823	7.36	2.34
8	MIP5c	TRIM	MAM	P	844	8.27	2.32
9	MIP5d	TRIM	MAM	P	737	6.45	2.34
10	MIP5e	TRIM	MAM	P	738	6.57	2.35
11	MIP6	EGDMA	MAM	P	1172	19.36	2.40
12	MIP7	TRIM	MAM+S	P	623	7.36	1.00
13	MIP8	EGDMA	MAM+S	P	685	7.49	1.80

It leads to 8 MIPs: MIP1 to MIP8. MIP5 experiment was performed in six times in order to calculate the standard deviation. Sites number N, affinity constant K and imprinting factor IF are the experimental design responses; they were calculated by fitting the adsorption isotherms $B(\mu\text{mol.g}^{-1})$ vs. $F(\text{mmol.L}^{-1})$ to different binding models: Langmuir, bi-Langmuir, Langmuir-Freundlich and Freundlich. Since the Freundlich model gave the best fit among the tested models ($R^2 > 0.96$), it was chosen to calculate the response of the experimental design, and the corresponding parameters (m and a) are presented in Table 6.

Table 6 The Freundlich parameters of the MIPs and the corresponding regression coefficient.

	MIP1	MIP2	MIP3	MIP4	MIP5	MIP6	MIP7	MIP8
R²	0.9743	0.9778	0.9996	0.9786	0.9885	0.9685	0.9677	0.9885
m	0.49	0.59	0.5	0.48	0.32	0.35	0.72	0.32
a	1310	1241	1328	1326	2122	2190	2902	1451

2.4.2 The factors effects on the response parameters

The processing of the experimental design generated model equations that provided a means of evaluating changes in the binding sites number Y1, the affinity constant Y2 and the imprinting factor Y3 due to changes in the dependent variables levels. The suggested polynomial equations that represent these responses are:

$$Y1 = 737.12 + 43.13*X1 - 61.87*X2 + 78.87*X3 - 12.88*(X1*X2) + 69.38*(X1*X3) - 100.12*(X2*X3) - 68.63*(X1*X2*X3).$$

$$Y2 = 9.36 + 1.25*X1 - 0.88*X2 + 1.06*X3 - 0.85*(X1*X2) + 1.75*(X1*X3) - 2.13*(X2*X3) - 2.08*(X1*X2*X3).$$

$$Y3 = 1.64 + 0.13*X1 - 0.44*X2 + 0.24*X3 + 0.07*(X1*X2) + 0.08*(X1*X3) - 0.04*(X2*X3) *X + 0.12*(X12*X3).$$

In the represented charts of Figure 20, the bar lengths are proportional to the absolute value of the estimated effects, which helps in comparing the relative importance of the effects. If the bars tend to the right, the relative effect is positive; if the bars tend to the left, the relative effect is negative. Moreover, a dashed line shows the results of the statistical significance study for each estimate (standard deviation). In the charts a, b and c of Figure 20, the second order interactions between the three factors, b123 significantly influence all the responses. In this case, the influence of each factor on the responses depends on the level of the other factors.

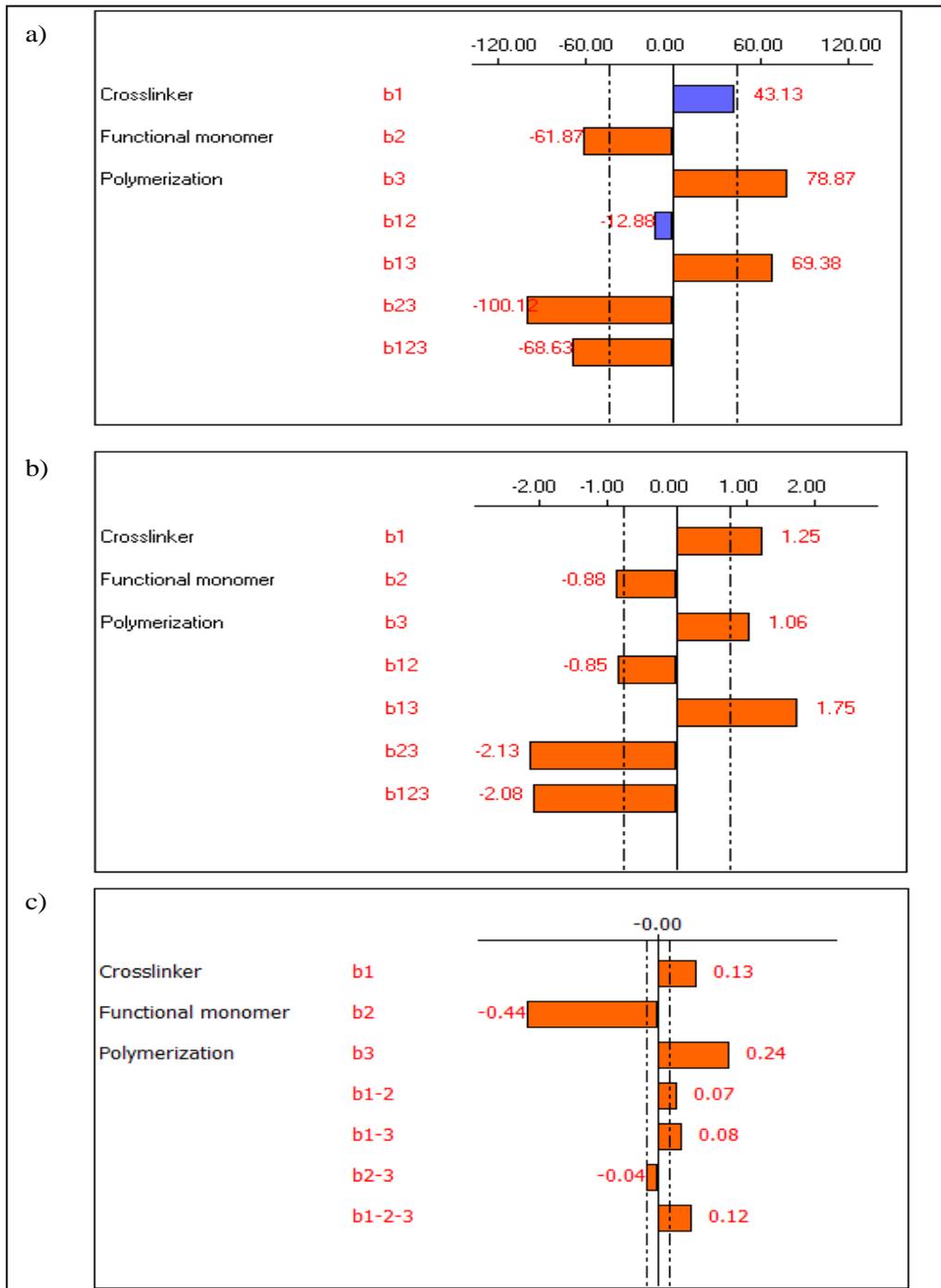


Figure 20 . Charts of the effects of (a) Y1= N; (b) Y2 = K and (c) Y3 = IF. The dashed lines show the results of the statistical significance study for each estimate (standard deviation).

The interpretation of the factors effects will be based on the second order interactions that will be discussed here after and they are represented in **Figure 21** for the three experimental design responses.

The sites number and the affinity constant of the MAM-co-TRIM bulk polymer are higher than those of the MAM-co-EGDMA (charts a) and c) red color). This could be explained by the hydrophobic interaction between template and monomer. The TRIM hydrophobicity: $\log P(\text{TRIM}) = 3.32$ is higher than that of EGDMA: $\log P(\text{EGDMA}) = 1.61$ (Nantasenamat, Isarankura-Na-Ayudhya, Bülow², Ye² & Prachayasittikul, 2006) and the partition coefficient of iprodione is 2.29. Similar results about the higher capacity of the TRIM were described in the literature. Nevertheless, this higher capacity should be attributed to a gain in the non-specific sites (based on dipole-dipole interactions) in line with the lower imprinting factor in the case of TRIM. The imprinting factor takes into account the non-specific interactions which are due to the interaction between the template and the crosslinker.

The results for polymers synthesized by bulk polymerization with TRIM are no longer valid when using the precipitation polymerization with the MAM as FM (charts b and d red color). In the latter case, interestingly, the EGDMA shows the higher values in terms of sites number and affinity constant. This apparent contradiction could be explained by returning to the difference in the polymerization step. In the precipitation polymerization, particle growth occurs predominantly via entropic precipitation of gel (seed) particles followed by continuous capture of oligomers from solution. The particles formation originates from the decrease of solubility of the growing polymer chains in the porogen solvent (the toluene in this case). The difference of capacities could result from the difference of polarity between TRIM and EGDMA, which controls how early the separation phase occurs during polymerization, once the formed polymer nuclei have precipitated. However, the imprinting factor seems to be unaffected by the use of EGDMA as crosslinker instead of the TRIM (chart f, red color).

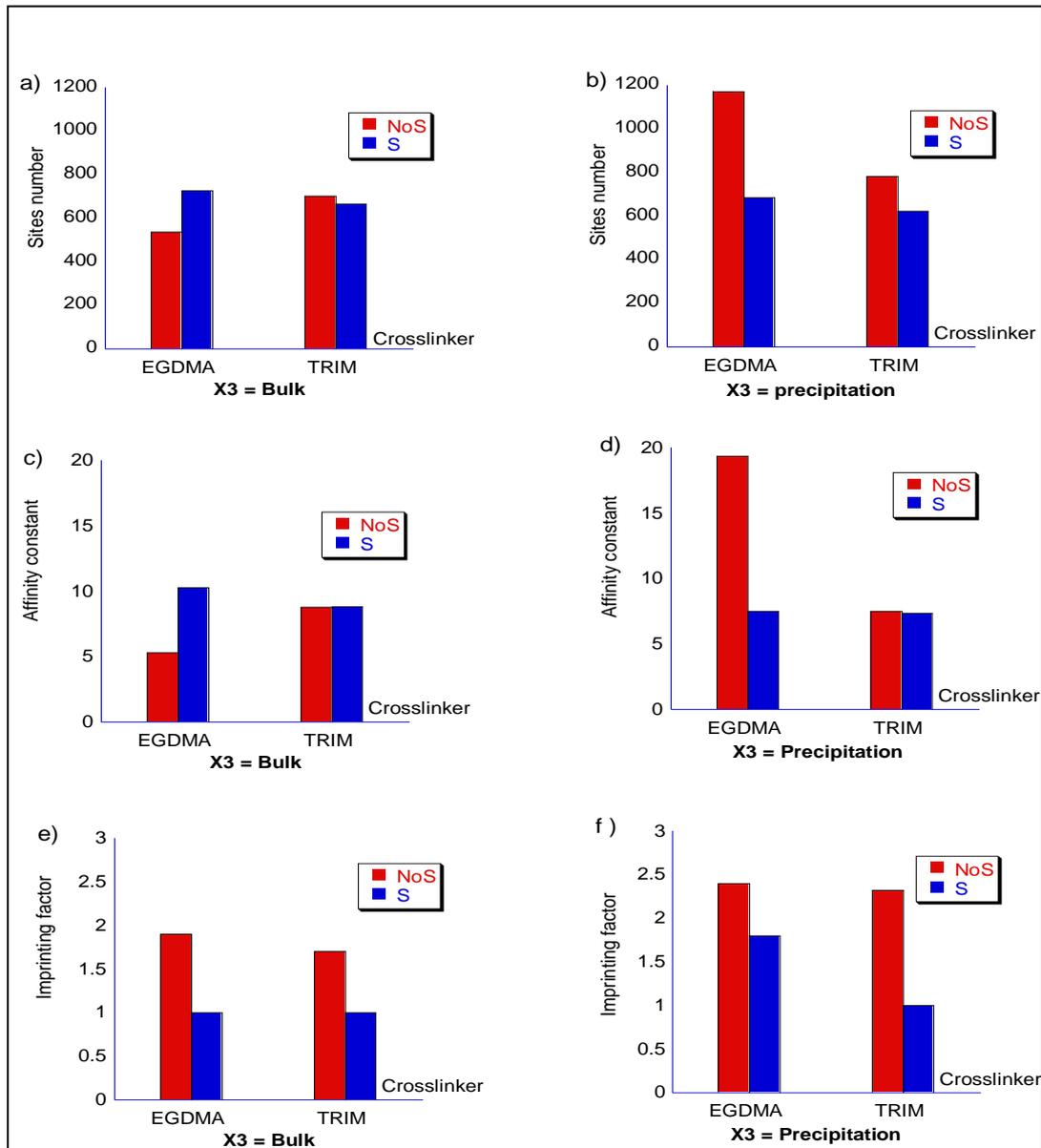


Figure 21 Second order interaction $X1 \cdot X2 \cdot X3$ for the sites number (a and b), the affinity constant (c and d) and the imprinting factor (e and f) when the factor $X3$ is fixed at bulk polymerization (left charts) and precipitation polymerization (right charts).

As it is possible to note in Figure 21, the addition of the styrene influences significantly the effect of the crosslinker and the polymerization method on the affinity constant and the sites number.

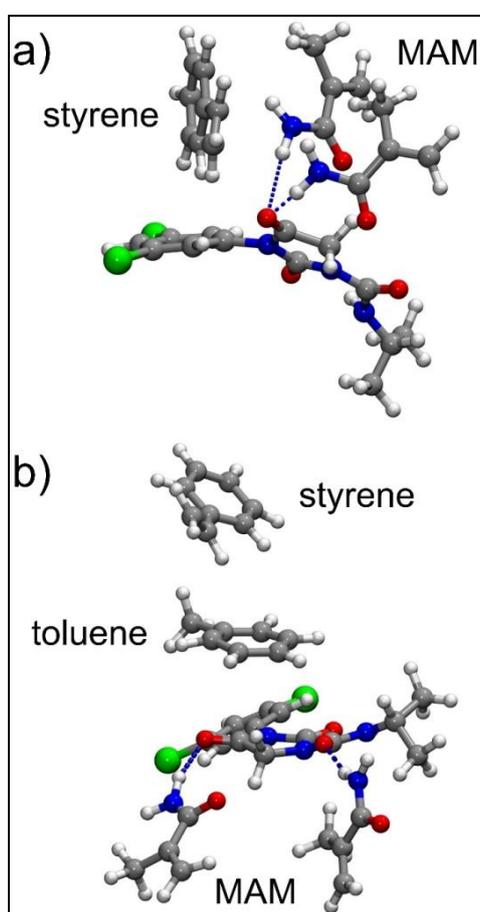


Figure 22 Examples of pre-polymerization complexes (a) where iprodione interacts with 2 MAM molecules by hydrogen bonding interactions (blue broken lines) and 1 styrene by a T-shaped π - π interaction, and (b) where iprodione forms hydrogen bonds only with 2 MAM molecules because of the toluene solvent molecule that prevents styrene from interacting with iprodione. The other functional monomers and toluene molecules from the simulation box are not shown for clarity.

By adding styrene as a co-functional monomer, we expected that the imprinting step could be better accomplished given that π - π interactions would occur in addition to the dipole-dipole interactions as in the complex presented in Figure 22(a).

The results shown in the Figure 21 (charts a and c) in the case of EGDMA are in agreement with this hypothesis due to the larger sites number and the higher affinity constant. However, except for this latter case, all of the charts of the Figure 21 show a decrease of responses, so of recognition properties, as a consequence of adding the styrene to the pre-polymerization mixture. The ability of MIP to recognize iprodione arises from: i) the fundamental phase wherein the monomers are prearranged around the template by means of specific interactions, ii) the stability of monomer template complexes present in the solution prior to polymerization and iii) the polymerization reaction itself which plays a dominant role in determining the recognition performance of the polymers. Indeed, the stability of the pre-polymerization complex formed between the functional monomers (MAM and styrene) and the template (iprodione) during the pre-polymerization step of MIP synthesis is affected by the presence of the toluene. The toluene is a competing molecule that could interplay to form π - π interactions and prevent the formation of a stable complex between iprodione and styrene (Figure 22b). This hypothesis was verified by molecular simulations (Table 7) where we compared average the number of functional monomers molecules that interacts with the iprodione in a cubic simulation box containing only methacrylamide (10 molecules) and another one containing a mixture of methacrylamide and styrene (5 molecules for each species). This number is slightly lower in presence of styrene, which seems in line with most of the results shown in Figure 21.

Table 7 Mean number of functional monomers, N, found in the coordination shell of iprodione in the MD simulations. A given functional monomer was considered to belong to the coordination shell of iprodione if either: (1) at least one hydrophilic atom (oxygen or nitrogen) of the monomer was within 3.5 Å of one hydrophilic atom of iprodione, or (2) a heavy atom of the monomer was within 4.5 Å of a carbon or a chloride atom of iprodione. Means and standard deviations from the means were determined from three independent MD simulations.

	N
Monomer	
Methacrylamide	3.03 ± 0.12
Methacrylamide	1.79 ± 0.02
+ Styrene	+ 0.82 ± 0.01

The charts of the Figure 21 clearly prove that the precipitation polymerization of the MAM-co-TRIM and MAM-co-EGDMA MIPs leads to better capacity and recognition properties than the bulk precipitation. This could be related to the porosity that determines the transfer in the polymer, whereby the pore size depends on the proportion of the porogen which is in excess in a polymerization by precipitation by comparison to the bulk polymerization. The pore size (at macro, meso and microscopic scales) depends on the synthesis conditions, i.e. the nature, proportion of the porogen, the crosslinker and the temperature.

2.4.3 Application of the optimal MIP to enrichment purpose on real samples

The optimal MIP of the experimental design was used as stationary phase on a SPE cartridge, in order to prove its applicability in real samples and its efficiency for pre-concentration of iprodione. The sample solvent chosen for iprodione loading was a wine model solution (10% aqueous ethanol). The loaded amount is 0.03 mg of iprodione as shown in Figure 23.

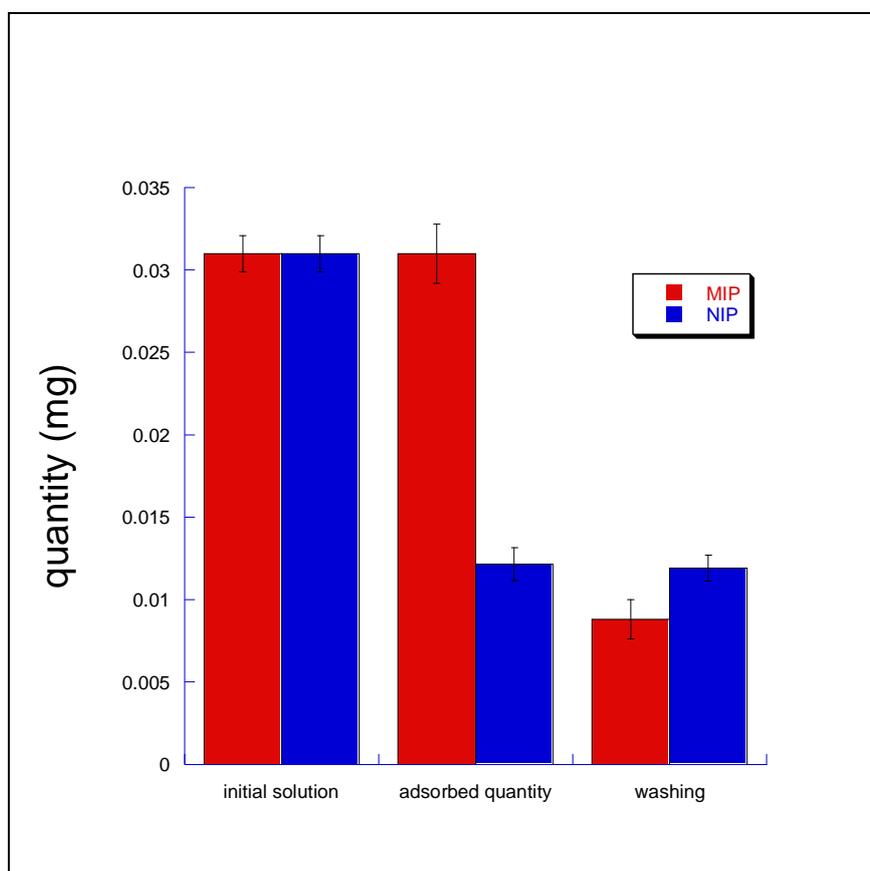


Figure 23 Adsorbed and recovered amount of iprodione after the washing step from SPE columns packed with MIP and with NIP.

To evaluate the difference between the extraction efficiency of the MIP and that of the NIP, we can compare the adsorbed quantities. The MISPE was found to be 2.5 times more efficient than the NISPE for the adsorption of iprodione, with the higher specific interactions involving the specificity of the recognition sites. The adsorbed amount on NISPE reveals the quantity of the non-specific interactions on the NIP, but also on the MIP material. This value is consistent with the quantities obtained after the washing step, which eliminated the iprodione bound on the NIP and on the MIP by non-specific interactions.

The more is the strength of the specific interaction between the iprodione and the MISPE phase, the higher is the required solvent eluent strength. In order to get the optimal eluting

solvent, but also to evaluate the strength of the interaction between iprodione and the polymer, eluting profiles were constructed.

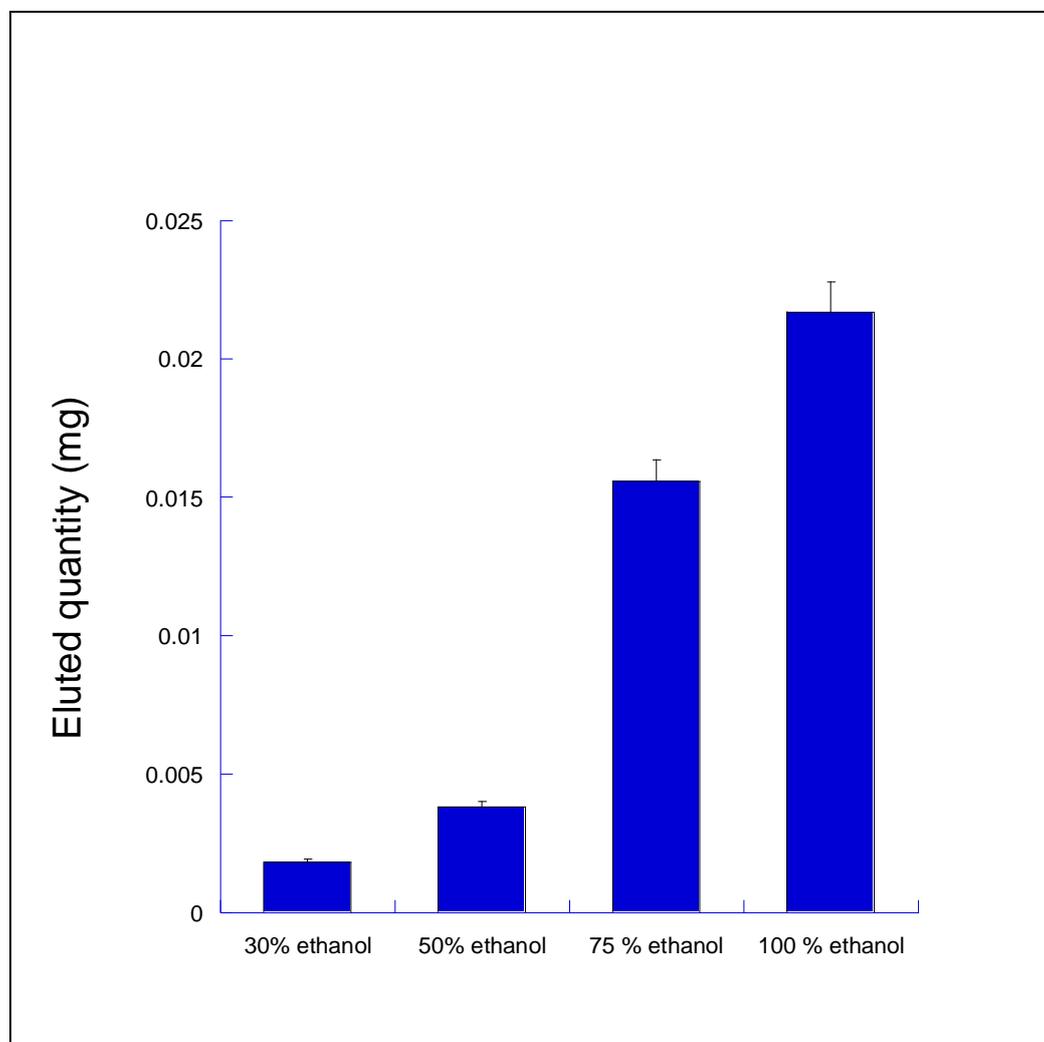


Figure 24 Recovered quantity of iprodione after the elution step with different proportions of aqueous ethanol solutions.

For this aim, we assayed aqueous ethanol solutions covering the range from 30 % to 100 % ethanol. According to the recoveries (Figure 24), the eluent strength increases by adding ethanol. A satisfactory recovery was not reached with the lowest eluent strength which confirms that the involved interactions are not low. The pure ethanol was able to elute in a

single-step elution the whole amount of the adsorbed analyte remaining after the washing step, which is an advantage since the MIP will be used for enrichment purpose.

2.5 Conclusion

It is the first time that an experimental design having as factors the nature of crosslinker, functional monomer and polymerization method is used in order to synthesis a MIP and to study the influence of the factors interaction on the polymer recognition properties of an analyte. The experimental design applied in this study shows that by reducing the number of MIP synthesis, we can obtain a satisfactory polymer specific for a wine fungicide: iprodione. The latter was synthesized by precipitation polymerization using methacrylamide as functional monomer and EGDMA as crosslinker. It presents the best imprinting factor while keeping the largest sites number and the highest affinity constant. The analytical applicability of the optimal polymer to preconcentrate iprodione was demonstrated by solid phase extraction in a wine model solution. The optimal polymer could be used to preconcentrate iprodione in food and environmental samples.

3 Données supplémentaires

Afin de comprendre et d'expliquer les différences entre les polymères, nous avons effectué des caractérisations de la structure et de la texture des polymères. Des études ont consisté en un suivi des propriétés viscoélastiques durant la synthèse, et d'autres études ont été faites pour comprendre et décrire les différences structurales entre les polymères comme la porosité et la surface spécifique (d'après la théorie BET), enfin des caractérisations ont été faites par RMN des solides.

3.1 Photo-rhéologie : Suivi in-situ de la photo-polymérisation radicalaire des MIPs et des NIPs

Des expériences de photo-rhéologie in situ ont été réalisées sur quelques polymères (MIPs et NIPs) pour suivre leurs propriétés viscoélastiques au cours de la photopolymérisation. Pour effectuer cette étude, nous avons choisi deux MIPs synthétisés par polymérisation en masse, ils ont donné des différences par rapport aux NIPs surtout en termes de facteur d'impression, et un MIP synthétisé par précipitation. Les polymères étudiés sont :

- MIP 1 et NIP 1 synthétisés en format de monolithes avec le méthacrylamide et le TRIM.
- MIP 2 et NIP 2 synthétisés de la même manière que les polymères MIP1 et NIP1 en substituant le TRIM par l'EGDMA.
- MIP 6 et NIP6 synthétisés par précipitation en utilisant le méthacrylamide et l'EGDMA.

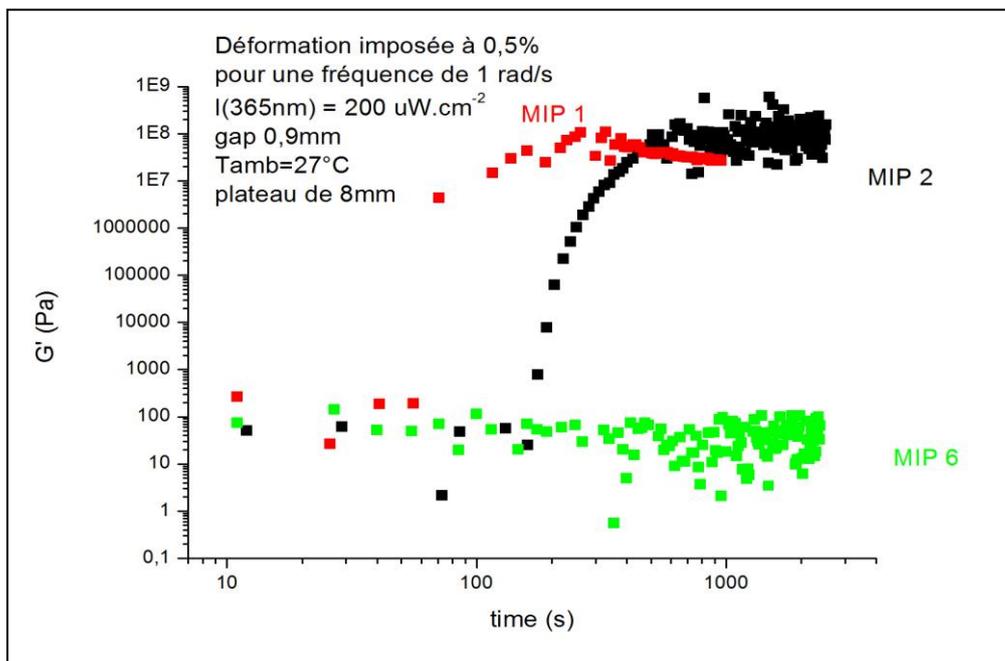


Figure 25 schéma représentant la variation du module de conservation G' des polymères MIP1, MIP2 et MIP6 en fonction du temps de photopolymérisation in situ.

Pour les polymères synthétisés sous forme de monolithes, une augmentation de l'ordre de 10^5 fois de G' (le module de conservation) a lieu lorsque le monolithe est formé. La polymérisation du MIP1 s'effectue avant le MIP2 (Figure 25). Le MIP6 a gardé des faibles valeurs non significatives de G' , bien que le précipité soit formé. Une régression linéaire après avoir tracé $\log G' = f(1/t)$ permet la détermination de G'_∞ et ainsi la comparaison entre les polymères (Figure 26).

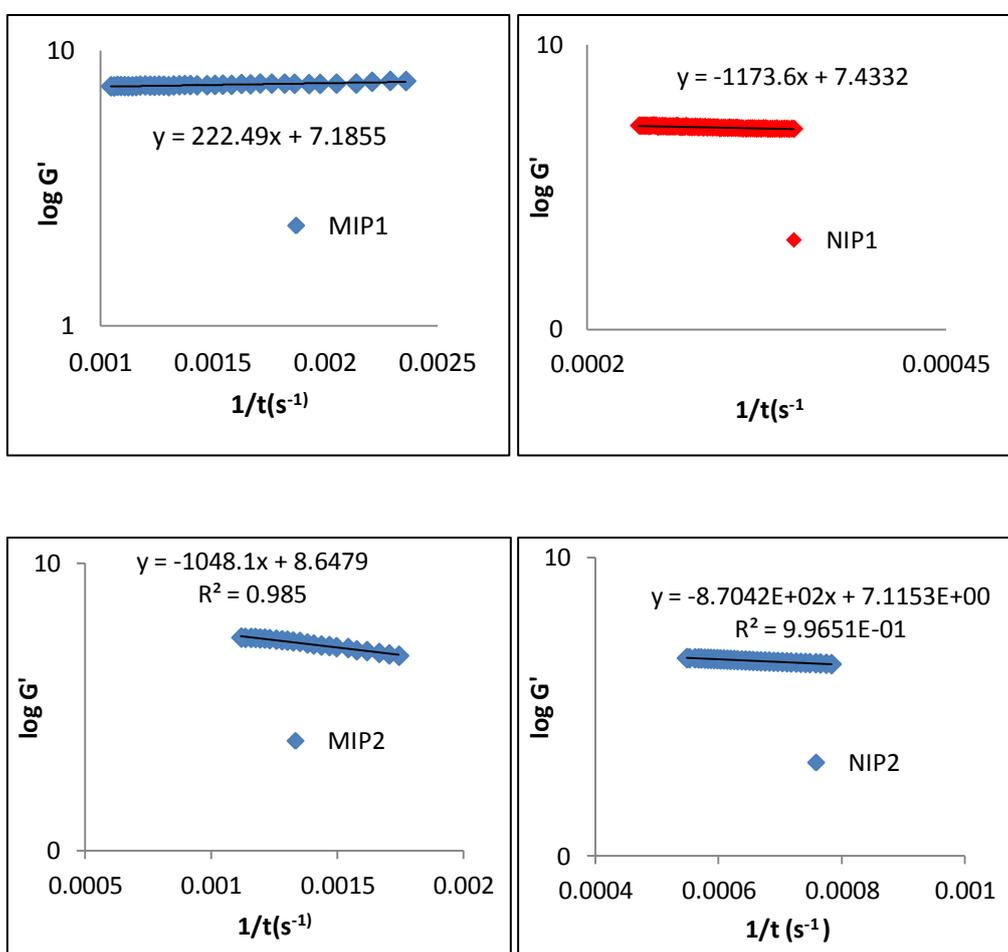


Figure 26 Régression linéaire permettant la détermination de G'_∞ : G'_∞ (MIP1) = $1.53E^{+07}$, G'_∞ (NIP1) = $2.69E^{+07}$, G'_∞ (MIP2) = $4.45E^{+08}$ et G'_∞ (NIP2) = $1.30E^{+07}$.

D'après la Figure 27, G' est supérieure pour le MIP2 que pour le MIP1. En comparant la performance analytique des deux polymères MIP1 et MIP2, on remarque que le facteur d'impression du MIP2 est supérieur à celui du MIP1 ($IF (MIP_1)=1,7$ et $IF (MIP_2)=1,9$, l'écart-type étant de 0,04). Cela pourrait être expliqué par la vitesse de la synthèse ; le MIP2, se formant plus lentement, permettrait au complexe de polymérisation de garder son préarrangement et donnerait lieu à une structure plus organisée du polymère. La formation du MIP1 avant le MIP2 pourrait avoir pour origine la différence des longueurs d'onde de maximum d'absorbance des 2 agents réticulants, en l'occurrence l'EGDMA et le TRIM.

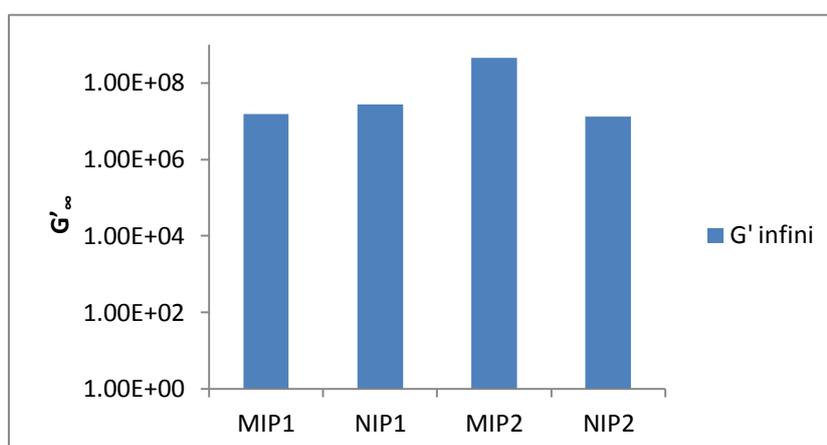


Figure 27 Les modules de conservation G'_{∞} des différents polymères. Cette valeur est différente suivant les polymères et entre un polymère imprimé et son homologue non imprimé.

La non-obtention d'un point de gel pour les polymères MIP6 et NIP6 serait due au fait que la concentration en monomères est tellement faible que même après polymérisation, G'' (module de perte) reste supérieure à G' (module de conservation). Donc, la concentration en monomère est inférieure à la concentration limite (CL) entre la formation d'un précipité et d'un monolithe (ou un gel). Cette concentration limite est une valeur importante à déterminer.

3.2 Analyse volumétrique : porosité et surface spécifique

Les études ont été faites sur deux polymères synthétisés par précipitation : le MIP6 qui a un facteur d'impression de 2,5 et qui est le plus performant parmi les polymères synthétisés et le MIP7 qui a un facteur d'impression de 1 et qui ne présente pas de spécificité par rapport à la molécule cible. Les résultats sont présentés dans le Tableau 8. On peut constater que le MIP6 a une surface spécifique supérieure à celle du MIP7 mais aussi à celle du NIP6 ce qui justifie la capacité plus élevée obtenu dans les isothermes.

Tableau 8 Données volumétriques des polymères : MIP6, NIP6, MIP7 et NIP7

	S BET (m ² /g)	V total (cm ³ /g)	Micropores V (cm ³ /g)	Mésopores V (cm ³ /g)	%	Macropores V %	(cm ³ /g)	Diamètre (Å)
MIP 6	407	0,6	0,03	0,48	80,0	0,09	15,0	20-200
NIP 6	292	0,617	0,02	0,42	68,1	0,18	29,1	20-200
MIP 7	155	0,405	0	0,276	68,1	0,13	32,1	20-150
NIP 7	180	0,397	0	0,3	75,6	0,09	22,7	20-150

Nous constatons aussi que le MIP6 comporte un pourcentage plus élevé de mésopores que le NIP6 alors que le NIP7 en contient un pourcentage légèrement supérieur au MIP7. La mésostructure du MIP6 est confirmée par l'hystérésis présente dans l'isotherme de sorption (Figure 28).

L'isotherme du MIP6 est du type IV (Cf. annexe 1), elle caractérise les échantillons mésoporeux. L'hystérésis est du type E suivant De Boer, ce qui montre que les pores sont du type « col de bouteille » ou cavité entre des sphères empilées. Ce n'est pas le cas du MIP7 qui suit le type II d'isotherme qui montre que nous sommes en présence d'un matériau plutôt macroporeux.

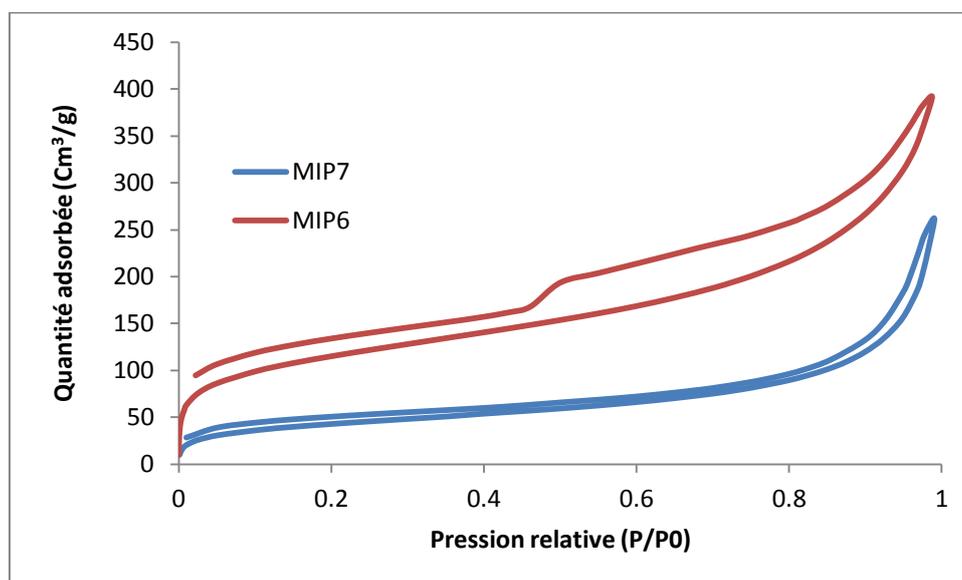


Figure 28 Les isothermes d'adsorption/desorption d'azote du MIP6 et du MIP7

Ces données justifient les meilleures propriétés de reconnaissance de l'iprodione par le MIP6 qui est mésoporeux et qui possède la surface spécifique la plus élevée.

3.3 Résonance magnétique nucléaire (RMN) ; La spectrométrie RMN du solide CP-MAS (*Cross Polarisation Magic Angle Spinning, Polarisation croisée et rotation à l'angle magique*)

Le but d'utiliser cette technique était, d'une part de montrer l'efficacité de la technique RMN du solide dans la caractérisation des polymères imprimés et d'autre part de comparer les interactions MIP-molécule empreinte après synthèse et sans lavage du polymère synthétisé et les interactions MIP-molécule cible après synthèse, lavage et recapture de l'iprodione. Pour ce faire, le MIP6 a été choisi, il s'agit du polymère le plus performant. Le MIP6 a été synthétisé par précipitation à partir de l'EGDMA et du méthacrylamide. Sans subir aucun lavage pour éliminer la molécule empreinte, le MIP6 a été analysé par RMN du solide CP-MAS et a donné le spectre de la Figure 29.

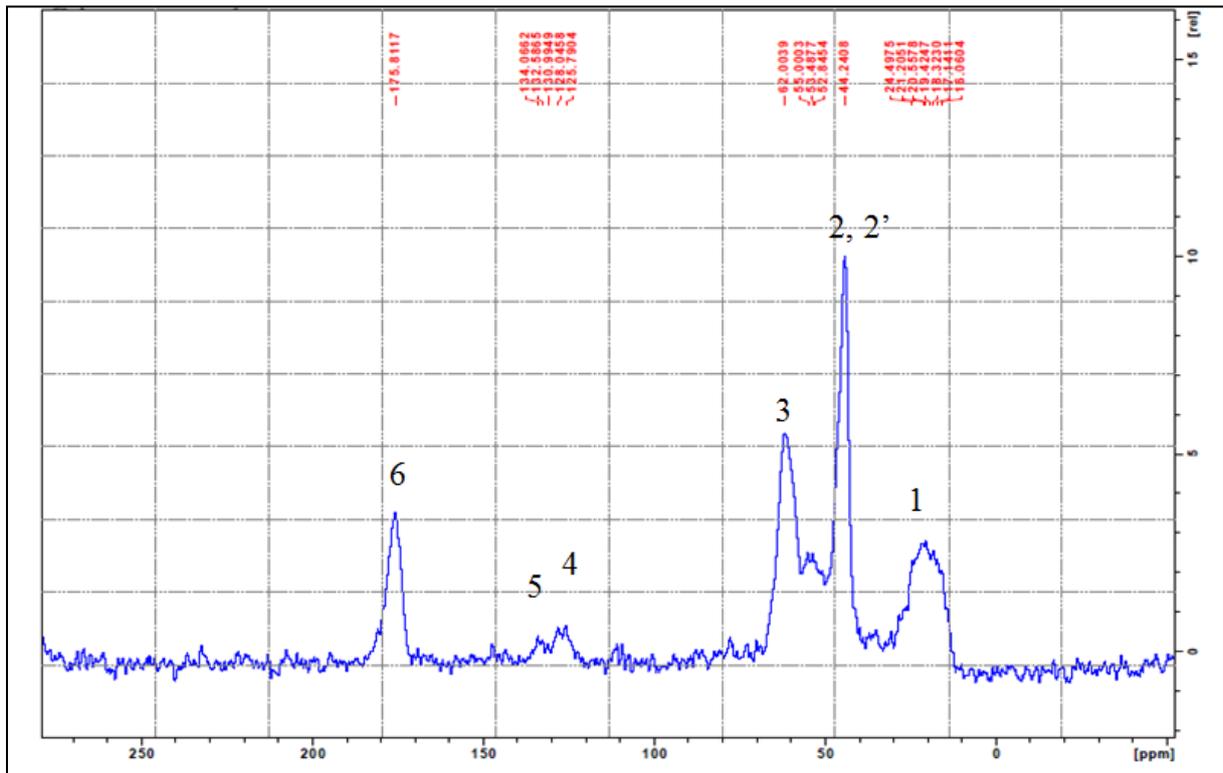


Figure 29 Spectre RMN CP-MAS du carbone ^{13}C du MIP6 non lavé.

Dans le spectre présenté ci-dessus, nous avons fait correspondre les pics aux carbones de la charpente du polymère, de la cavité et de l'iprodione. Une partie du MIP est représentée schématiquement dans la Figure 30.

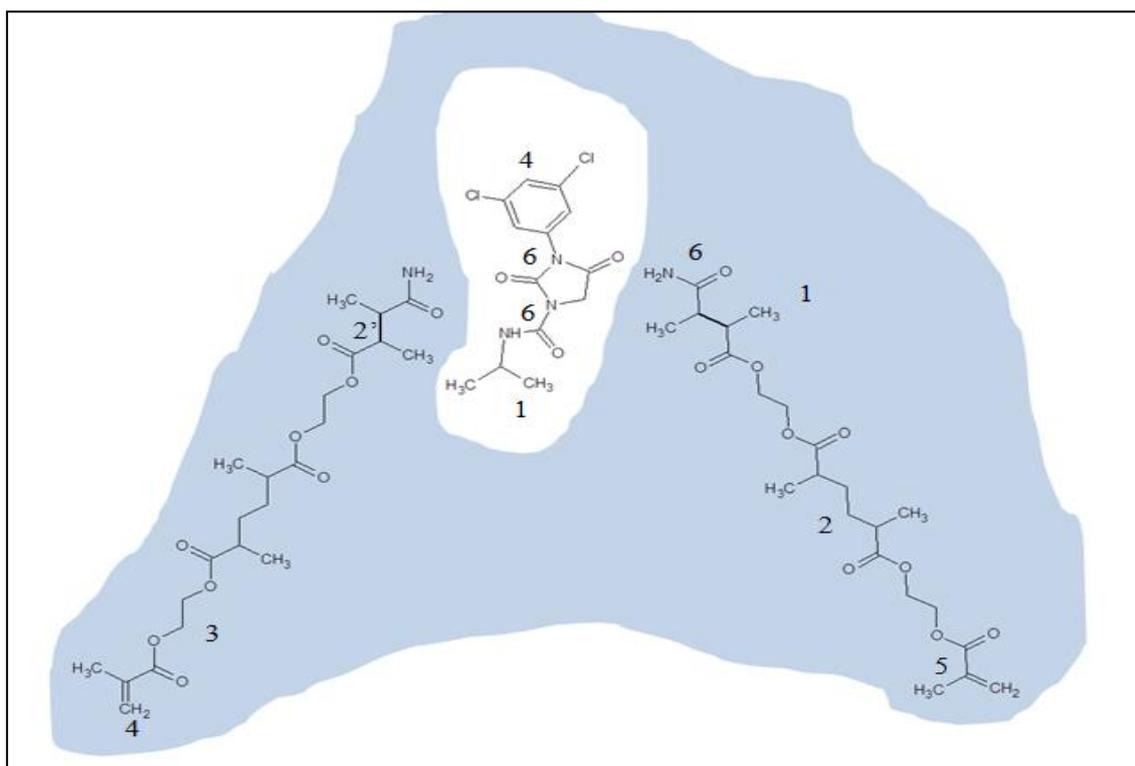


Figure 30 Représentation schématique d'une partie du MIP6 non lavé dont la cavité contient la molécule empreinte (l'iprodione).

Les pics entre 15 et 24 ppm correspondent aux carbones saturés monosubstitué R-CH₃. Les pics à 44 ppm sont les carbones saturés de R₃CH et R₂CH₂. Le pic à 62 ppm est le carbone de l'ester R-CH₂-COOR'. Les pics à 125 et 130 ppm sont ceux du cycle aromatique de l'iprodione et des carbones des doubles liaisons (doubles liaisons qui n'ont pas réagi). A 175 ppm se trouvent les carbones des carbonyles de l'agent réticulant et d'un amide du monomère fonctionnel et de la molécule empreinte.

Les mêmes pics se trouvent dans le MIP6 après recapture de l'iprodione. La Figure 31 montre que les spectres du MIP6 non lavé et du MIP 6 après recapture sont identiques et superposables.

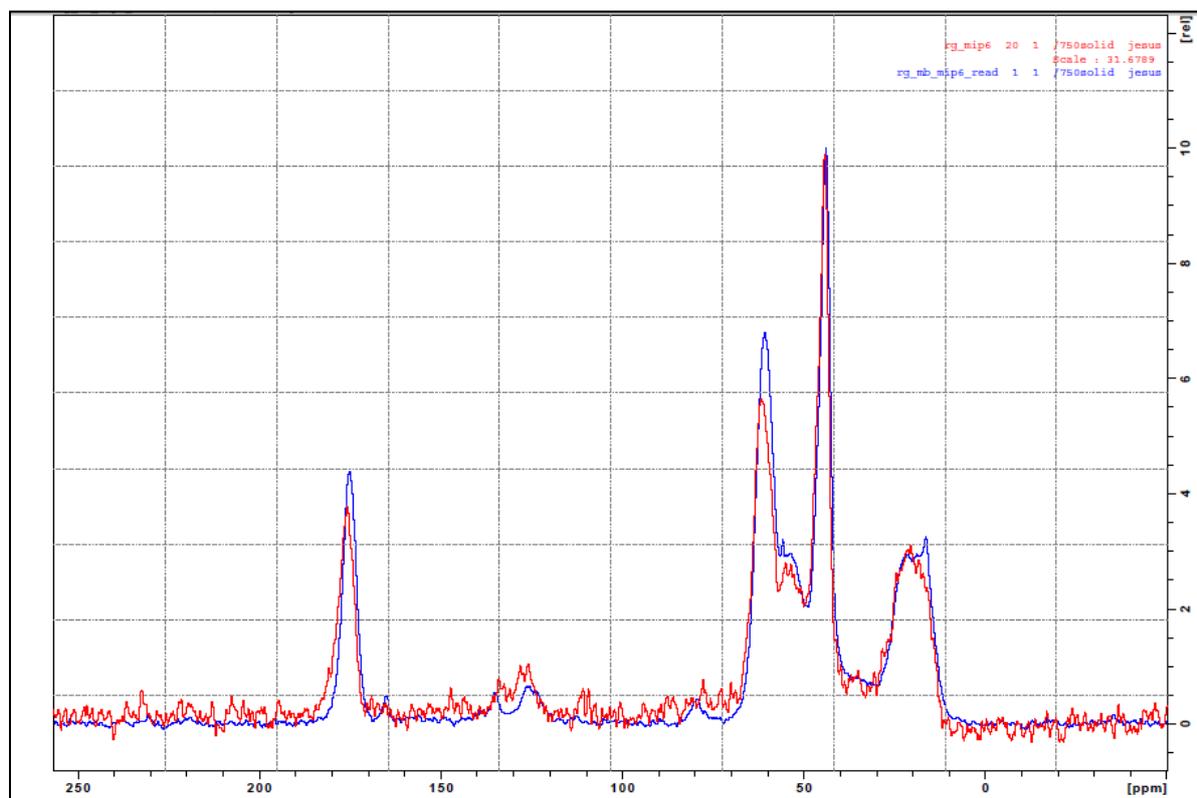


Figure 31 Superposition des spectres RMN du ¹³C du MIP6 non lavé (rouge) et après recapture de l'iprodione (bleu).

Les spectres RMN 2D présentés dans les figures ci-dessous (Figure 32 et Figure 33) montrent que les pics correspondants aux interactions ayant lieu après recapture sont plus fins. Ce qui veut dire que les protons ont les mêmes environnements et donc il y a des sites favorables qui sont les cavités spécifiques. On peut constater aussi que les mêmes interactions ont lieu ce qui vérifie l'hypothèse que la recapture de l'iprodione reproduit les mêmes positions et conformations spatiales que pendant la formation des empreintes.

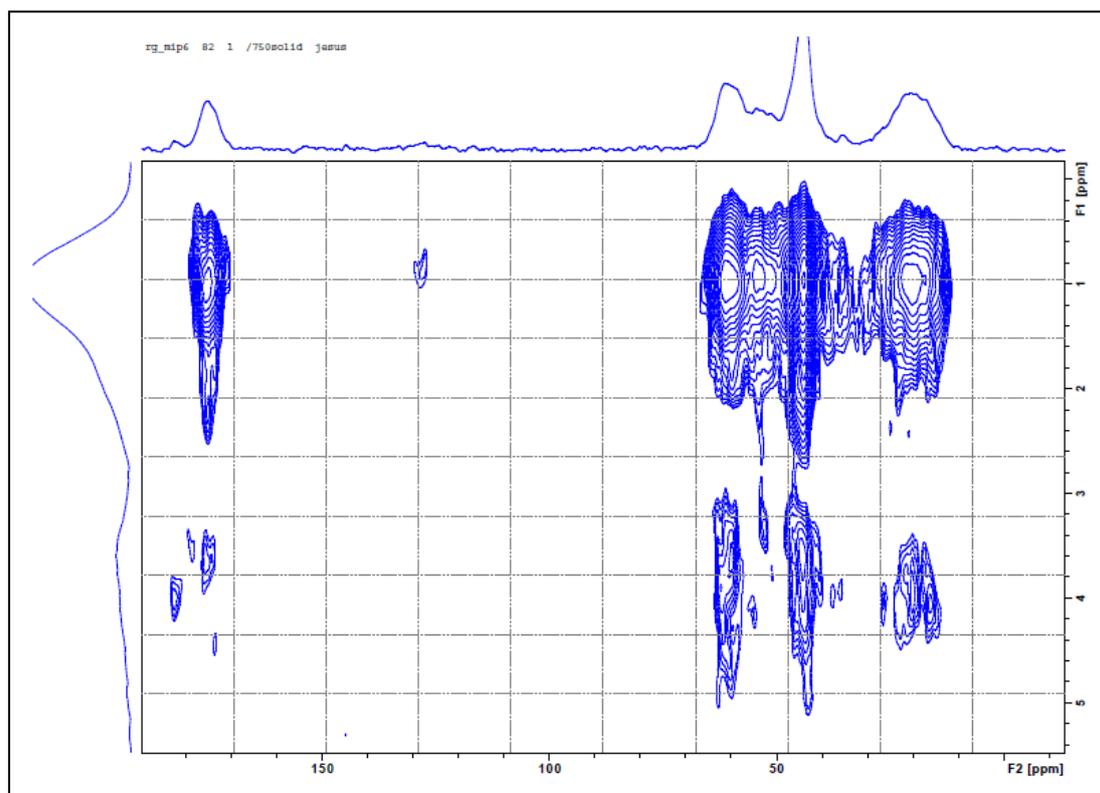


Figure 32 Spectre RMN 2D HETCOR ^{12}C - ^1H du MIP6 non lavé.

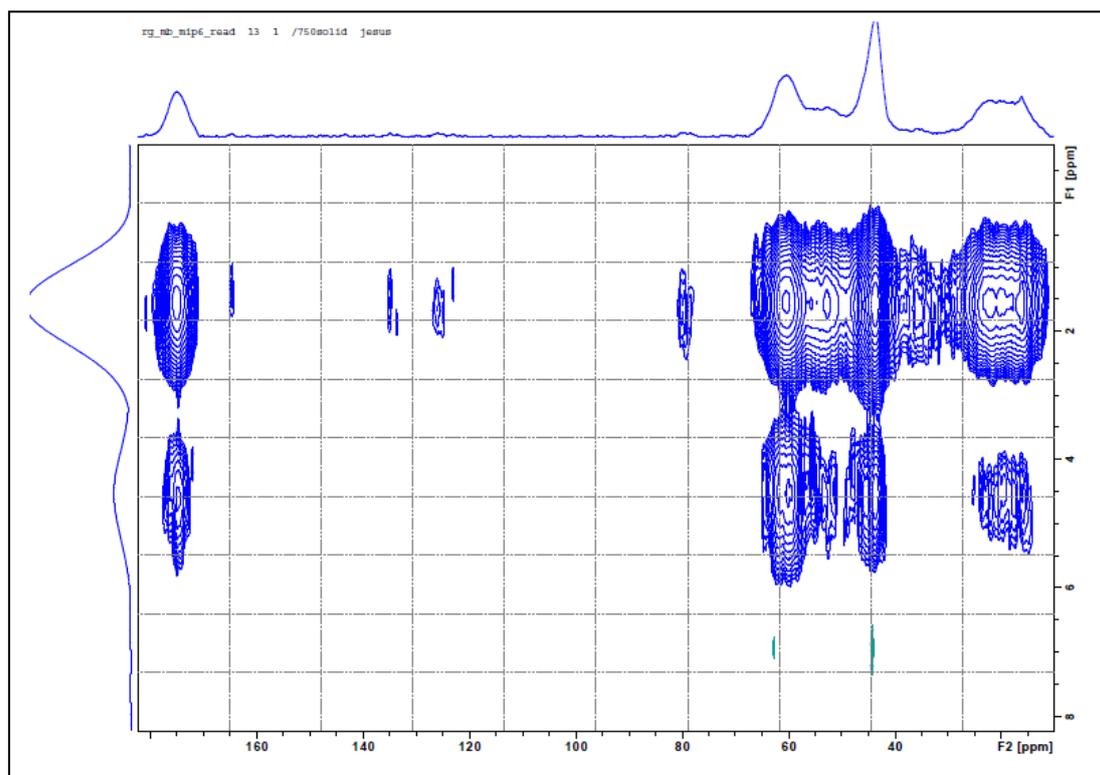


Figure 33 Spectre RMN 2D HETCOR ^{13}C - ^1H du MIP6 après recapture de l'iprodione.

4 Références

- Derogating from Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the expiry dates of the approval of the active substances. . Official Journal of the European Union. COMMISSION REGULATION (EU) No 823/2012.
- PAN(2008.). Etude vin, Pan-Europe. « Message dans une bouteille ». Etude sur la présence de résidus de pesticides dans le vin. http://www.mdrgf.org/pdf/Rapport_vin_pesticide_fr.pdf. Pesticide Action Network, Europe; MDRGF.
- Baggiani, C., Baravalle, P., Giraudi, G., & Tozzi, C. (2007). Molecularly imprinted solid-phase extraction method for the high-performance liquid chromatographic analysis of fungicide pyrimethanil in wine. *Journal of Chromatography A*, *1141*(2), 158-164.
- Bailey, H. D., Armstrong, B. K., de Klerk, N. H., Fritschi, L., Attia, J., Scott, R. J., Smibert, E., Milne, E., & for the Aus, A. L. L. C. (2011). Exposure to professional pest control treatments and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Cancer*, *129*(7), 1678-1688.
- Brooks, B. R., Brooks, C. L., Mackerell, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., Kuczera, K., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R. W., Post, C. B., Pu, J. Z., Schaefer, M., Tidor, B., Venable, R. M., Woodcock, H. L., Wu, X., Yang, W., York, D. M., & Karplus, M. (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, *30*(10), 1545-1614.
- Cabras, P., & Angioni, A. (2000). Pesticide Residues in Grapes, Wine, and Their Processing Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(4), 967-973.
- Calhella, R. C., Andrade, J. o. V., Ferreira, I. C., & Estevinho, L. c. M. (2006). Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. *Food Microbiology*, *23*(4), 393-398.
- Ceolin, G., Navarro-Villoslada, F., Moreno-Bondi, M. C., Horvai, G., & Horvath, V. (2009). Accelerated Development Procedure for Molecularly Imprinted Polymers Using Membrane Filterplates. *Journal of Combinatorial Chemistry*, *11*(4), 645-652.
- CUGIER, J.-P., & BRUCHET, S. (2005.). Plan de surveillance résidus en Viticulture (Campagnes viticoles 1990-2003). <http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/enqueteraisin.pdf>. Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et de la Ruralité.
- Davies, M. P., De Biasi, V., & Perrett, D. (2004). Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, *504*(1), 7-14.
- Flamini, R., & Panighel, A. (2006). Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part II: The consumer protection. *Mass Spectrometry Reviews*, *25*(5), 741-774.
- García-Calzón, J. A., & Díaz-García, M. E. (2007). Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *123*(2), 1180-1194.

- Geai, J.-P. (2013). Message in bottle. *Que choisir*.
- Haupt, K., & Mosbach, K. (2000). Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors. *Chemical Reviews*, 100(7), 2495-2504.
- Kobaisi, M., Tate, M., Rix, C., Jakubov, T., & Mainwaring, D. (2007). The effect of molecular imprinting on the pore size distribution of polymers. *Adsorption*, 13(3-4), 315-321.
- Kunath, S., Marchyk, N., Haupt, K., & Feller, K.-H. (2013). Multi-objective optimization and design of experiments as tools to tailor molecularly imprinted polymers specific for glucuronic acid. *Talanta*, 105(0), 211-218.
- Matsui, J., Fujiwara, K., & Takeuchi, T. (2000). Atrazine-Selective Polymers Prepared by Molecular Imprinting of Trialkylmelamines as Dummy Template Species of Atrazine. *Analytical Chemistry*, 72(8), 1810-1813.
- Mijangos, I., Navarro-Villoslada, F., Guerreiro, A., Piletska, E., Chianella, I., Karim, K., Turner, A., & Piletsky, S. (2006). Influence of initiator and different polymerisation conditions on performance of molecularly imprinted polymers. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(3), 381-387.
- Mosbach, K. (1994). Molecular imprinting. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(1), 9-14.
- Nantasenamat, C., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Bülow, L., Ye2, L., & Prachayasittikul, V. (2006). In silico design for synthesis of molecularly imprinted microspheres specific towards bisphenol A by precipitation polymerization. *EXCLI Journal*, 5, 103-117.
- Navarro-Villoslada, F., Vicente, B. S., & Moreno-Bondi, M. I. a. C. (2004). Application of multivariate analysis to the screening of molecularly imprinted polymers for bisphenol A. *Analytica Chimica Acta*, 504(1), 149-162.
- Nougadère, A., Sirot, V., Kadar, A., Fastier, A., Truchot, E., Vergnet, C., Hommet, F., Baylé, J., Gros, P., & Leblanc, J.-C. (2012). Total diet study on pesticide residues in France: Levels in food as consumed and chronic dietary risk to consumers. *Environment International*, 45(0), 135-150.
- Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G., & Berendsen, H. J. C. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, 23(3), 327-341.
- Sellergren, B., Schillinger, E., & Lanza, F. (2009). *Combinatorial Methods for Chemical and Biological Sensors*. New York: Springer.
- Singh Saini, S., & Kaur, A. (2012). Molecularly Imprinted Polymers for the Detection of Food Toxins: A Minireview. *Advances in Nanoparticles*, 2, 60-65.
- Tankiewicz, M., Fenik, J., & Biziuk, M. (2010). Determination of organophosphorus and organonitrogen pesticides in water samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(9), 1050-1063.
- Tankiewicz, M., Morrison, C., & Biziuk, M. (2013). Multi-residue method for the determination of 16 recently used pesticides from various chemical groups in aqueous samples by using DI-SPME coupled with GC-MS. *Talanta*, 107(0), 1-10.
- Umpleby Ii, R. J., Baxter, S. C., Bode, M., Berch Jr, J. K., Shah, R. N., & Shimizu, K. D. (2001). Application of the Freundlich adsorption isotherm in the characterization of molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, 435(1), 35-42.

- Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I., & Mackerell, A. D. (2010). CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry*, 31(4), 671-690.
- Vanommeslaeghe, K., & MacKerell, A. D. (2011). Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: Bond Perception and Atom Typing. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(12), 3144-3154.
- Whitacre, D. M., Kesavachandran, C., Fareed, M., Pathak, M., Bihari, V., Mathur, N., & Srivastava, A. (2009). Adverse Health Effects of Pesticides in Agrarian Populations of Developing Countries. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 200*, vol. 200 (pp. 33-52): Springer US.
- Yao, W., Fang, Y., Gao, G. L. Z., & Cheng, Y. (2008). Adsorption of carbaryl using molecularly imprinted microspheres prepared by precipitation polymerization. *Polymers for Advanced Technologies*, 19(7), 812-816.

Chapitre 3

Isothermes d'adsorption de l'eau sur les MIPs.

Relations entre la capacité d'adsorption de l'eau et de la molécule empreinte

1 Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons synthétisé des MIPs spécifiques de l'iprodione et nous avons étudié leurs propriétés de reconnaissance dans un milieu hydroalcoolique et dans le vin. Les résultats ont montré que la spécificité des MIPs est due aux interactions de type « liaison » hydrogène qui s'établissent entre le polymère (la cavité imprimée) et l'iprodione. Par contre, le même type d'interactions a lieu entre l'iprodione et les sites non spécifiques. En se basant sur ces résultats et étant donné que les MIPs vont être utilisés dans des milieux qui contiennent majoritairement de l'eau, nous avons déterminé les isothermes d'adsorption d'eau à 25 °C. Ces isothermes ont été tracées pour les différents polymères synthétisés (MIPs et NIPs) à différentes humidités relatives. Le but était de trouver une relation entre l'adsorption de l'eau et l'adsorption de l'iprodione et de vérifier si une compétition entre les deux molécules existait pour l'adsorption sur les MIPs.

2 Article 3: Water sorption isotherms of molecularly imprinted polymers. Relation between water binding and iprodione binding capacity of MIP

Manal BITAR, Gaëlle ROUDAUT, Jacqueline Maalouly, Régis Gougou, Elias BOUMAROUN, Philippe CAYOT

2.1 Abstract

The water adsorption isotherms of an iprodione molecularly non imprinted and imprinted polymers were determined in a range of water activities 0.05-0.90 at 25 °C. The kinetics of water sorption on the polymers was studied using Peleg's equation. The studied polymers were generated from a 4 factorial experimental design: type of functional monomer, of polymerization approach and of crosslinker. The relation between responses (output) and controlled input (factors) differs according the Peleg's constants: the rate constant (RC)

showed no significant difference whereas the capacity constant (CC) was affected by the factors: the functional monomer, the polymerization approach, the crosslinking agent and the imprinting effect. Comparison between adsorption isotherms showed differences between polymers especially in the high water activity (a_w) range. The GAB isotherm equations (Guggenheim–Anderson–de Boer model) were used to fit the equilibrium data and the GAB parameters: M_0 , C and K were calculated. The results showed no significant difference between K values whereas significant differences in M_0 and C values were obtained between different polymers. The results obtained from both equations were practically coincident. Peleg and GAB models satisfactorily modeled the water sorption on the imprinted and non imprinted polymers.

2.2 Introduction

In recent years, molecularly imprinted polymers (MIPs) have attracted much attention due to their outstanding advantages, such as predetermined recognition ability, stability, relative ease and low cost of preparation, and potential application to a wide range of target molecules (Wang et al., 2014). MIPs have been shown to be able to recognize both biological and chemical molecules (Vasapollo et al., 2011) including amino acids and small proteins (Bossi, Bonini, Turner & Piletsky, 2007), nucleotide derivatives (Longo & Vasapollo, 2008), pollutants (Pichon & Chapuis-Hugon, 2008), drugs and food (Baggiani, Anfossi & Giovannoli, 2007a; Puoci, Cirillo, Curcio, Iemma, Spizzirri & Picci, 2007).

Pesticides are an important class of toxic organics that could be present in our food and are suspected of being linked to a broad spectrum of medical problems (Bailey et al., 2011; Nougadère et al., 2012; Whitacre et al., 2009). The Pesticide-Action-Network EU have published a study (Pan-Europe, 2008a) indicating that 100% of conventional wines around the world contain pesticides. A study of “Que choisir” journal (Geai, 2013) publicized by radios found similar observations (all 92 examined samples were contaminated) which deteriorates the image of the wine. In particular, iprodione, a contact fungicide used for a variety of crops, has been detected in more than 90 % of French wines according to a survey by the French

Ministry of Agriculture (CUGIER et al., 2005.) and its use for crops will expire on 31 October 2016 because of its poor biodegradability and risk of accumulation.

Further application of MIPs to real samples often includes aqueous media, i.e. biological samples (Zhang, Wang & Han, 2013), environmental samples (Hiratsuka, Funaya, Matsunaga & Haginaka, 2013; Lopez-Nogueroles, Lordel-Madeleine, Chisvert, Salvador & Pichon, 2013), beverages (Leite, Santos & Kubota, 2014; Rajabi Khorrami & Narounezhad, 2011).

Adsorption of water into these materials is of both theoretical and practical interest, especially when hydrogen bonds (dipole-dipole interactions) are the prime way interaction between the polymer and the target species (He, Long, Pan, Li & Liu, 2007). It is interesting not only to know how fast the adsorption can be accomplished, but also how it will affect the adsorption of the analyte (the template). Thus, understanding water adsorption on MIPs, as a function of polymer type and relative humidity (RH) is of obvious importance to answer many questions. Studying water adsorption can be used to evaluate the capacity of MIP to establish dipole-dipole interactions. The synthesized MIPs are predestinated to be used as preconcentration phase or as clean-up phase for iprodione in aqueous based media such as water or hydroalcoholic media such as wine. In both cases, the adsorption of water onto polymers may occur during the extraction of iprodione by the polymers. By demonstrating that water adsorption onto polymers takes place with low rate and low capacity, we would claim that it will not interfere during the extraction of iprodione. It is also important to know how fast the water is adsorbed at different relative humidity in order to control the storage conditions of the MIP.

Therefore, the objectives of this work were to study the water adsorption isotherms of different MIPs in order to explain differences between iprodione (a fungicide) MIPs and NIPs (Non Imprinted Polymers) synthesized with different monomers and different polymerization approaches and to examine the potential of the water sorption behavior to predict the applicability of a MIP in water media.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Chemicals

Iprodione [CAS number 36734-19-7], methacrylamide (MAM) [CAS number 79-39-0], styrene [CAS number 100-42-5], ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) [CAS number 97-90-5], trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM) [3290-92-4], 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPAP) [CAS number 24650-42-8], toluene, acetonitrile, ethanol and acetic acid were purchased from Sigma Aldrich, France. Solvents were HPLC grade and used without any purification. High purity de-ionized water, obtained with an Elga Ionic system PURELAB Option, was used in the batch experiments and in the mobile phase mixture.

2.3.2 Preparation of the polymers

2.3.2.1 Experimental design

A 2^4 full factorial experimental design was utilized in this study; four input parameters, namely the crosslinker (X_1), the functional monomer (X_2), the polymerization method (X_3), and the molecular imprinting (X_4) were selected as the factors whose influence on the water adsorption isotherms behaviors has to be systematically studied. Two levels, expressed as coded values (+1) and (-1), were considered for each of the three factors under investigation. **Table 9** shows the coded levels of the 2^4 experimental design.

All other synthesis conditions were kept constant throughout the study.

Table 9 Coded levels and corresponding physical values of the 2⁴ factorial experimental design.

Level	Crosslinker(C)	Functional monomer (FM)	Polymerization method (PM)	Molecular imprinting
-1	Trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM)	Methacrylamide (MAM)	Monolith (M)	Non-imprinted (N.I)
+1	Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)	Methacrylamide styrene (MAM+S)	+ Precipitation (P)	Imprinted (I)

Table 10 Overview of the 2⁴ experimental design

N°Exp	Polymer	Crosslinker	Functional	Polymerization	Impression
1	NIP1	TRIM	MAM	M	N.I
2	NIP2	EGDMA	MAM	M	N.I
3	NIP3	TRIM	MAM+S	M	N.I
4	NIP4	EGDMA	MAM+S	M	N.I
5	NIP5	TRIM	MAM	P	N.I
6	NIP6	EGDMA	MAM	P	N.I
7	NIP7	TRIM	MAM+S	P	N.I
8	NIP8	EGDMA	MAM+S	P	N.I
9	MIP1	TRIM	MAM	M	I
10	MIP2	EGDMA	MAM	M	I
11	MIP3	TRIM	MAM+S	M	I
12	MIP4	EGDMA	MAM+S	M	I
13	MIP5	TRIM	MAM	P	I
14	MIP6	EGDMA	MAM	P	I

15	MIP7	TRIM	MAM+S	P	I
16	MIP8	EGDMA	MAM+S	P	I

Table 10 presents the 2^4 experimental design. This statistical analysis was performed with NEMRODW® software (Nemrodw, L.P.R.A.I., Marseille, France). It provided several information.

- the regression quality, was evaluated by the determination coefficient R^2 and the adjusted determination coefficient R^2_a , which takes into account the freedom degree (FD) of the system.
- the standard deviation, S.D.
- the coefficients values b_i and their S.D.

2.3.2.2 Polymers' synthesis

The synthesis of the polymer proportions was based on previous data (Bitar et al, submitted). Bulk MIPs were prepared with 1 mmol of the functional monomer and 4 mmol of the crosslinker and 0.1 mmol of the template. The polymerization was carried out in toluene (1 mL) with DMPAP (0.05 mmol) as the initiator. The precipitation-synthesized MIPs contained 20 mL of the porogen.

The functional monomer and the iprodione were weighed in a test tube and dissolved in toluene. After addition of EGDMA and DMPAP, the mixture was degassed in an ultrasonic bath for 10 minutes. The tubes were then sealed and exposed overnight to ultraviolet radiation. The polymers obtained by precipitation were separated and slowly dried at room temperature under atmospheric pressure, whereas the bulk polymers were ground into powder.

For comparison purposes, corresponding non-imprinted polymers (NIPs) were prepared with the above described process, except that the polymerization mixture did not contain the template.

2.3.2.3 Template removal

In order to remove the template, the polymer particles were soaked in an acetic acid and ethanol (30/70 v/v) mix and submitted to ultrasonic treatment for 10 minutes. This mix was meant to break the dipole-dipole interactions between iprodione and the polymer. The MIP was washed several times until the template could no longer be detected with HPLC. The solvent was then removed by centrifugation and the fine particles oven-dried at 65 °C overnight. These fine particles were used in subsequent experiments.

2.3.3 Instrumentation

Reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was performed using a C18-column on a Shimadzu LC equipped with a 25 μL loop injector, an SPD 20AT UV-visible absorbance detector and an LC-20AT liquid pump. Acetonitrile/water (60/40 v/v) was used as the mobile phase and the flow rate was 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Detection was performed at 220 nm, which is the maximum adsorption wavelength of iprodione.

2.3.4 Water sorption experiments

An Autosorp (Biosystemes SA, Couternon, France) apparatus was used to determine the moisture sorption isotherms. To control humidity; HPLC water grade was used. Powder samples (250–300 mg), accurately weighed were placed into proper cells. The desired RH conditions varied from 0% to 85%. Samples were weighed periodically with a time interval of 300 min until they attained a constant weight (<0.01 mg/hour variability), where the equilibrium was assumed. The GAB model (Eq. 1) was used to fit the curves for the wide range of water activity (a_w) values.

2.4 Results and discussion

2.4.1 Sorption kinetics

Adsorption kinetic curves are shown in Figure 34 at different relative humidities.

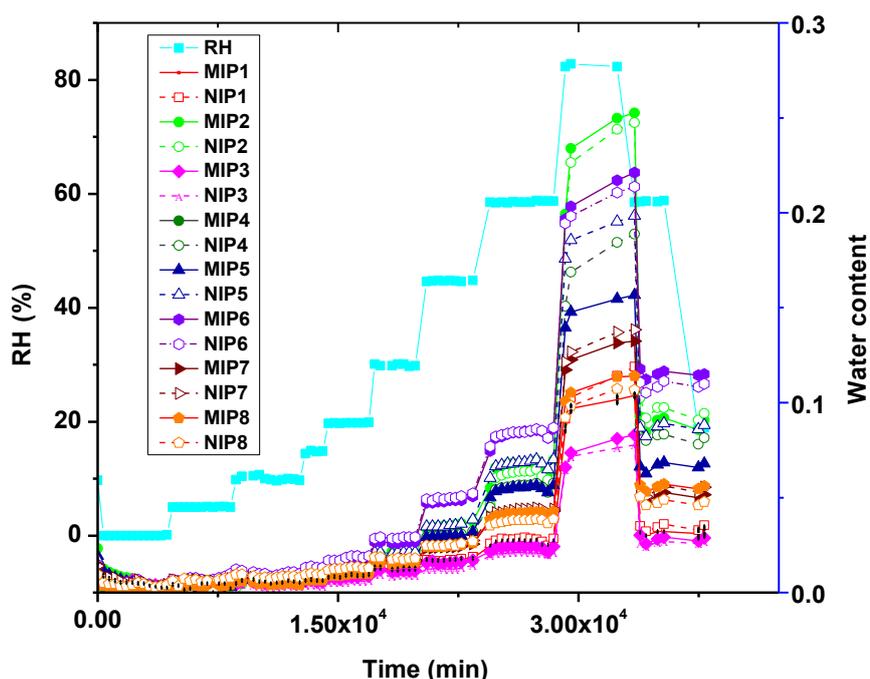


Figure 34 Water sorption kinetic curves at 25 °C for several MIP and NIPs

Curves with the highest and lowest sorption at $a_w=0.85$ are shown in Figure 35. The maximum adsorption capacities are those of the MIP2 and MIP6. Below $a_w=0.85$ the adsorption capacity of the polymer 6 is higher than the polymer 2. For any value of a_w the adsorption capacity of the MIPs have lower capacities than the corresponding NIPs. This behavior was different from that of the polymers 1 and 5 where the reversed case was observed: NIPs adsorbed more water than MIPs. Another surprising behavior was noted, for the polymers MAM-co-TRIM (polymers 1 and 5) the precipitation method led to materials

with higher water adsorption capacity, which was not the case of MAM-co-EGDMA (2 and 6).

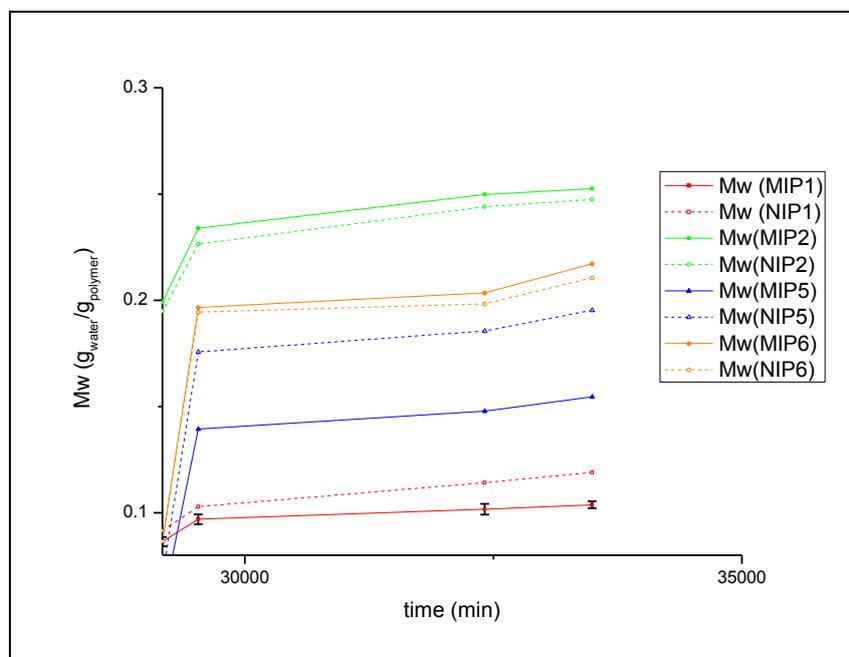


Figure 35 The kinetic curves representing the polymers having the highest and the lowest capacities at a_w 0.85.

The kinetics of the water sorption were more particularly considered at water activity: $a_w = 0.85$, which is the closest to the future application conditions, *i.e.* in aqueous samples, and allows a comparison of the 16 polymer behaviors. We presented in Figure 35 the kinetic curves of the MIPs and the NIPs on relative humidity: $a_w=0.85$.

The obtained curves were fitted using Peleg (Peleg, 1988) equation $M(t) = M_0 + t / (RC + CCt)$ where $M(t)$ is the moisture after time t , M_0 is the initial moisture content and RC is the rate constant ($\text{min}/(\text{g water}/\text{g solids})$) and CC is a adsorption capacity constant ($\text{g solids}/\text{g water}$). As RC is a constant related to mass transfer, the lower RC , the higher the initial water

adsorption rate; CC is a constant related to maximum water adsorption capacity and the lower the CC, the higher the adsorption capacity. The parameters were calculated in order to characterise the water sorption behavior.

Table 11 The values of the Peleg’s constants (RC and CC) with the regression coefficient and the standard variation with a freedom degree DOF = 2.

	RC ± 18.94 (min/(g of water/mg of polymer))	CC± 0.36 (mg of polymer/ g of water)	R²
MIP1	232.31	1332.1	0.98739
NIP1	255.27	1223.85	0.99036
MIP2	112.06	569	0.98741
NIP2	130.52	554.2	0.98721
MIP3	400.85	1781.8	0.98586
NIP3	296.98	1807.4	0.99332
MIP4	191.92	775.67	0.99211
NIP4	190.67	775.67	0.9937
MIP5	112.54	1030.6	0.99546
NIP5	96.441	803.03	0.99658
MIP6	102.21	767.11	0.99742
NIP6	86.366	816.83	0.99767
MIP7	154.49	1127.8	0.99783
NIP7	164.84	1065.2	0.99804
MIP8	242.77	1389.4	0.99858
NIP8	312	1429.7	0.99725

The parameters were determined using a non-linear regression method (matlab R2010a) and the estimated parameters with their standard deviation values are presented in Table 11. The regression coefficient (R²) values varied from 0.986 to 0.998 which confirms that this equation describes adequately the water sorption kinetics. The RC values do not show significant differences between a MIP and a NIP indicating that the initial rate is the same except for polymers 3 and 8. Nevertheless, NIP3 has a higher initial rate than MIP3 whereas the initial rate of NIP8 is lower than MIP8’s. Both polymers 3 and 8 have the lowest initial rates of water adsorption.

On the other hand, CC capacities values were found to show significant differences between the two polymers (either MIP or NIP). The lowest CC values associated with the highest water adsorption capacities were that of polymers 2, 4, 5 and 6.

2.4.2 Adsorption isotherms

Generally, the isothermal equilibrium sorption curves of polymeric networks deviate from Henry's law. The experimental data of water content versus RH yield parabolic or sigmoid curves, which are better, described by power law function. When low temperature sorption of water is a multilayer process, it is usually represented by sigmoid isothermal curves of type II in the Brunauer–Emmet–Teller (BET) classification. This indicates that, initially, sorbed water molecules are able to interact with the binding sites of the polymer, while subsequent molecules associate with the primary layer in liquid water-like structures. The negative and positive deviations of the experimental results from Henry's law of isothermal equilibrium water absorption have been described by the use of the Guggenheim–Anderson–de Boer (GAB) model. This model is an amended form of the classical Brunauer–Emmet–Teller (BET) model and allows us to take into account the experimental data over a broader range of water activity (Shafee & Naguib, 2003); BET model is known to apply only for a limited range of water activity, up to only 0.3–0.4 while GAB represents the range of correct approximation between 0.10 and 0.90 (Timmermann, Chirife & Iglesias, 2001). Guggenheim–Anderson–de Boer (GAB) equation, which has been shown to describe moisture-sorption isotherms of many food products accurately (Sampson, Chang, Rupasinghe & Zaman, 2014), but has also been applied to synthetic polymers (Lim, Britt & Tung, 1999) was used in our study to analyze the equilibrium sorption isotherms. The three parameters GAB equation are:

$$M = M_0 CKa_w / (1 - Ka_w)(1 - Ka_w + KCa_w)$$

where M_0 is the weight fraction measured on a dry basis of the water molecules directly attached to sorption sites, C a parameter related to the energy difference between the water

molecules attached to sorption sites (the first sorption layer) and those absorbed in successive sorption layers, and K the energy difference between water molecules absorbed in the second and successive sorption layers and pure liquid water. When $K = 0$, GAB equation reduces to the BET equation.

The experimental data were fitted to GAB model and the constants calculated (**Table 12**).

Table 12 GAB constants of the polymers

Polymer	C	K	M_0 (g water/g solids)
MIP1	6.18	1.08	1.08
NIP1	7.86	1.09	1.06
MIP2	1.34	1.01	3.97
NIP2	0.44	0.93	7.86
MIP3	8.21	1.06	0.96
NIP3	4.93	1.07	0.86
MIP4	2.47	1.02	9.68
NIP4	2.04	1.02	2.86
MIP5	1.76	0.96	3.28
NIP5	0.89	0.89	6.30
MIP6	0.92	0.83	8.76
NIP6	4.64	1.04	1.82
MIP7	3.94	1.03	1.82
NIP7	1.65	0.88	5.94
MIP8	1.81	0.95	2.60
NIP8	7.45	1.01	1.63

GAB constants values were considered as responses in the experimental design in order to investigate in greater details the influence of the factors (polymer type, crosslinker...) on the water sorption behavior.

The results showed the factors and their interactions influenced M_0 and C constants without any significant influence on K . The results were coherent with those obtained for the kinetic behavior with Peleg model. Generally the polymers synthesized with EGDMA had higher water sorption capacities than those synthesized with TRIM due to the higher hydrophobicity of the latter, except NIP6 and NIP5 for which this hypothesis was not confirmed. Nonetheless, the high C value of NIP6 indicates a high magnitude of energy difference between the first layer and the successive upper layers which could be due to a strong interaction between the water of the first layer and the sorption sites. The polymers synthesized using MAM-co-styrene had in general lower M_0 values. The polymers synthesized using the precipitation polymerization had higher M_0 .

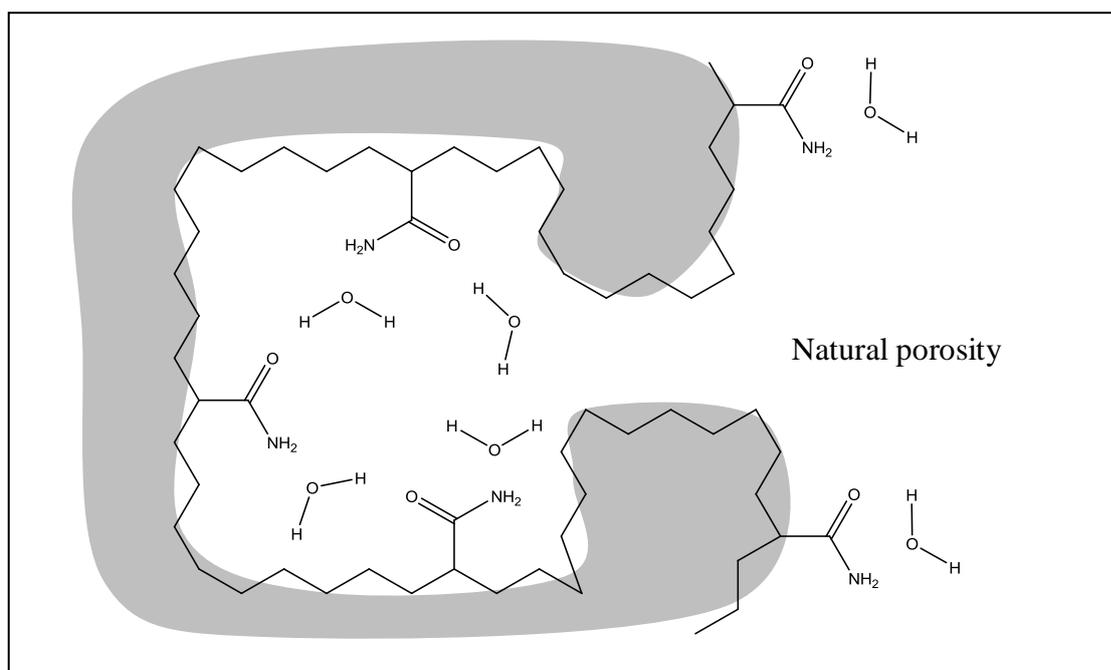


Figure 36 Representation of water molecule adsorbed on a MIP: in the specific and non-specific sites.

M_0 and C are parameters to take into account during the application of MIP in water media samples. In Figure 36, we presented an example of a MIP cavity in which the water molecules are adsorbed with a high affinity, and two non specific sites having a low affinity. When the

C value is high, this would mean a strong interaction between the water of the first layer and the sorption sites and in the presence of low concentration of iprodione is not able to remove the sorbed water which results in lower imprinting factor. The very high value of the parameter M_0 when C of the MIP is much lower than C of the NIP could not influence the adsorption of iprodione (for exemple MIP6).

2.5 Conclusion

For the first time, this study has demonstrated the applicability of the Peleg's model to adequately describe the rate of water adsorption on the molecularly imprinted polymers (MIP) and non imprinted polymers (NIPs) and the Guggenheim–Anderson–de Boer model to describe the behavior of the water adsorption on these materials. The water adsorption isotherms could be useful when the MIP is applied in water media.

3 Références

- Baggiani, C., Anfossi, L., & Giovannoli, C. (2007). Solid phase extraction of food contaminants using molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, 591(1), 29-39.
- Bailey, H. D., Armstrong, B. K., de Klerk, N. H., Fritschi, L., Attia, J., Scott, R. J., Smibert, E., Milne, E., & for the Aus, A. L. L. C. (2011). Exposure to professional pest control treatments and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Cancer*, 129(7), 1678-1688.
- Bossi, A., Bonini, F., Turner, A. P. F., & Piletsky, S. A. (2007). Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: The state of the art. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(6), 1131-1137.
- CUGIER, J.-P., & BRUCHET, S. (2005). Plan de surveillance résidus en Viticulture (Campagnes viticoles 1990-2003). <http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/enqueteraisin.pdf>. Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et de la Ruralité.
- EU, C. R. (2012). Derogating from Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the expiry dates of the approval of the active substances. . Official Journal of the European Union. COMMISSION REGULATION (EU) No 823/2012.
- Geai, J.-P. (2013). Message in bottle. *Que choisir*.
- He, C., Long, Y., Pan, J., Li, K., & Liu, F. (2007). Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 133-150.
- Hiratsuka, Y., Funaya, N., Matsunaga, H., & Haginaka, J. (2013). Preparation of magnetic molecularly imprinted polymers for bisphenol A and its analogues and their application to the assay of bisphenol A in river water. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 75(0), 180-185.
- Leite, F. R. F., Santos, W. d. J. R., & Kubota, L. T. (2014). Selective determination of caffeic acid in wines with electrochemical sensor based on molecularly imprinted siloxanes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 193(0), 238-246.
- Lim, L.-T., Britt, I. J., & Tung, M. A. (1999). Sorption and transport of water vapor in nylon 6,6 film. *Journal of Applied Polymer Science*, 71(2), 197-206.
- Longo, L., & Vasapollo, G. (2008). Molecularly imprinted polymers as nucleotide receptors. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 5(3), 163-170.
- Lopez-Nogueroles, M., Lordel-Madeleine, S., Chisvert, A., Salvador, A., & Pichon, V. (2013). Development of a selective solid phase extraction method for nitro musk compounds in environmental waters using a molecularly imprinted sorbent. *Talanta*, 110(0), 128-134.
- Nougadère, A., Sirot, V., Kadar, A., Fastier, A., Truchot, E., Vergnet, C., Hommet, F., Baylé, J., Gros, P., & Leblanc, J.-C. (2012). Total diet study on pesticide residues in France: Levels in food as consumed and chronic dietary risk to consumers. *Environment International*, 45(0), 135-150.

- Pan-Europe (2008). Etude vin, Pan-Europe. « Message dans une bouteille ». Etude sur la présence de résidus de pesticides dans le vin. http://www.mdrgf.org/pdf/Rapport_vin_pesticide_fr.pdf. Pesticide Action Network, Europe; MDRGF.
- Peleg, M. (1988). An Empirical Model for the Description of Moisture Sorption Curves. *Journal of Food Science*, 53(4), 1216-1217.
- Pichon, V. r., & Chapuis-Hugon, F. (2008). Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants—A review. *Analytica Chimica Acta*, 622, 48-61.
- Puoci, F., Cirillo, G., Curcio, M., Iemma, F., Spizzirri, U. G., & Picci, N. (2007). Molecularly imprinted solid phase extraction for the selective HPLC determination of tocopherol in bay leaves. *Analytica Chimica Acta*, 593(2), 164-170.
- Rajabi Khorrami, A., & Narounezhad, E. (2011). Synthesis of molecularly imprinted monolithic fibers for solid-phase microextraction of acetaldehyde from head-space of beverages stored in PET bottles. *Talanta*, 86(0), 58-63.
- Sampson, D. J., Chang, Y. K., Rupasinghe, H. P. V., & Zaman, Q. U. Z. (2014). A dual-view computer-vision system for volume and image texture analysis in multiple apple slices drying. *Journal of Food Engineering*, 127(0), 49-57.
- Shafee, E. E., & Naguib, H. F. (2003). Water sorption in cross-linked poly(vinyl alcohol) networks. *Polymer*, 44(5), 1647-1653.
- Timmermann, E. O., Chirife, J., & Iglesias, H. A. (2001). Water sorption isotherms of foods and foodstuffs: BET or GAB parameters? *Journal of Food Engineering*, 48(1), 19-31.
- Vasapollo, G., Sole, R. D., Mergola, L., Lazzoi, M. R., Scardino, A., Scorrano, S., & Mele, G. (2011). Molecularly imprinted polymers: present and future prospective. *International journal of molecular sciences*, 12(9), 5908-5945.
- Wang, Y., Wang, E., Wu, Z., Li, H., Zhu, Z., Zhu, X., & Dong, Y. (2014). Synthesis of chitosan molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction of methandrostenolone. *Carbohydrate Polymers*, 101(0), 517-523.
- Whitacre, D. M., Kesavachandran, C., Fareed, M., Pathak, M., Bihari, V., Mathur, N., & Srivastava, A. (2009). Adverse Health Effects of Pesticides in Agrarian Populations of Developing Countries. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 200*, vol. 200 (pp. 33-52): Springer US.
- Zhang, J., Wang, L., & Han, Y. (2013). Preparation of 17 β -estradiol surface molecularly imprinted polymers and their application to the analysis of biological samples. *Journal of Separation Science*, 36(21-22), 3486-3492.

Chapitre 4

Application des MIPs pour la pré-concentration de l'iprodione dans le vin.

**Exemple: MISPE (Molecularly imprinted solid phase
extraction)**

1 Introduction

Pour pré-concentrer l'iprodione dans des échantillons de vin blanc, le meilleur MIP du plan d'expériences synthétisé par précipitation et son homologue synthétisé par polymérisation en masse ont été utilisés comme phases stationnaires dans des cartouches SPE. Ils sont nommés MISPEp et MISPEb respectivement. L'optimisation de l'étape d'élution a été effectuée et l'acétonitrile s'est montré comme étant le meilleur solvant d'élution. MISPEp a donné un facteur de pré-concentration supérieur à celui du MISPEb. La sélectivité de la méthode MISPE pour l'iprodione a été évaluée sur un échantillon de vin blanc en présence de deux autres fongicides : pyriméthanil et procymidone. MISPEp présentait une sélectivité pour l'iprodione par rapport aux deux autres fongicides. Cependant, MISPEb était capable de préconcentrer l'iprodione ainsi que les deux autres fongicides, ce qui permettrait son utilisation pour la préconcentration d'une famille de fongicides.

2 Article 4: Molecularly imprinted polymers solid phase extraction of fungicides from wine samples

Manal Bitar, Philippe Cayot, Elias Bou-Maroun.

2.1 Abstract

In order to preconcentrate iprodione fungicide in white wine samples, molecularly imprinted polymers (MIPs) specific for iprodione were synthesized using two polymerization approaches: precipitation (MIPp) and bulk polymerization (MIPb). A comparison of the performance of the MIPs and the corresponding non imprinted polymers (NIPs) was conducted in batch studies. In this case, the MIPp revealed better recognition properties toward iprodione in wine samples than the MIPb. The MIPp and MIPb were then used as sorbent on solid phase extraction cartridges (MISPEp and MISPEb consecutively) in order to pre-concentrate iprodione from white wine samples. The optimization of the MISPE elution

step was done using MIPp and acetonitrile was shown to be the best eluting solvent. MISPEp showed better iprodione recovery and pre-concentration factor than MISPEb. The selectivity of the MISPE method for iprodione was evaluated in white wine sample in the presence of two other fungicides pyrimethanil and procymidone. MISPEp was very selective for iprodione compared with the two other fungicides. However, MISPEb was able to preconcentrate iprodione as well as its analogues.

2.2 Introduction

Toxic substances such as pesticides are used for a purpose of increasing the food supply. The residues of such molecules are transmitted to processed foods and are an important source of food-borne diseases.

There are many analytical techniques with satisfactory sensitivity for the detection and quantification of these contaminants often present as traces. However, the complexity of the matrices prevents the direct analysis application on these compounds, and hence a step of pre-concentration is often needed (Singh Saini et al., 2012).

In the recent years, the food contaminant analysis field has devoted considerable interest to the “molecularly imprinted solid phase extraction” (MISPE) technique. In fact, this technique has been successfully applied to solve several challenging issues especially in the very complex samples where analyte selectivity is required (Du et al., 2013; Duan, Yi, Fang, Fan & Wang, 2013; Hashim, Schwarz, Boysen, Yang, Danylec & Hearn, 2013). Nowadays, it is by far the most advanced technical application of MIPs (Martín-Esteban, 2013). Molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) has been used as a selective sorbent method in numerous applications where a certain degree of selectivity is required such as sensors (Zhang, Luo, Cai & Chen, 2013) and chromatography (Rodriguez, Moreno-Bondi & Marazuela, 2011). MISPE is an attempt to circumvent the drawbacks attributed to the traditional solid phase extraction technique (SPE). On one hand, it has the same advantages as the SPE (economical and rapid), on the other hand it offers additional advantages over SPE such as accuracy and selectivity (Singh Saini et al., 2012).

The pesticides are linked to a broad spectrum of medical problems such as cancer, neurotoxic effects, reproductive health concerns and endocrine disruption (Bailey et al., 2011; Nougadère et al., 2012; Whitacre et al., 2009). Although problems stemming from the use of pesticides have been known, recently the use of pesticides in viticulture has become an important practice all over the world. While their environmental effects are relatively safe at acceptable doses, some concerns about the toxicity of pesticide residues remain (Sen, Cabaroglu & Yilmaz, 2012). The possibility exists that residues of these products can pass from grape to must and later to wine with the resulting risk to consumer's health. As a consequence of the widespread use of pesticides, the presence of their residues in both food and the environment has become an important issue in analytical science. Even the generally low concentrations expected for pesticide residues in wines justify the use of sensitive analytical methods. For fungicide in wine, no uniform limits have been established yet, except for procymidone for which the European Union has established maximum residue limit (MRL) of 0.5 mg/kg (Pelit, Ertaş, Seyrani & Nil Ertaş, 2013). Iprodione is a pesticide that inhibits the germination of fungal spores on the surface of fruits and is used also as a four-season fungicide for lawn. It is widely used in vineyards against botrytis for example, but it is a harmful substance for humans (R22, R40), toxic for aquatic organisms (R50/53), and is not readily biodegradable. The latter fungicide has been detected in more than 90 % of French wine according to a survey by the French Ministry of Agriculture (Curgier J-P, 2005). Because of its poor biodegradability and the risk of accumulation, the use of iprodione for crops will expire on 31 October 2016 (Commission Regulation (EU) No 823/2012 of 14 September 2012).

The aim of this study was to optimize and verify the extraction performance of iprodione-MISPE in a wine solution. This work investigates the behavior of two MIPs as SPE sorbents. The MIPs were produced using two different polymerization approaches: precipitation and bulk. The selectivity of these MISPE for iprodione in a wine solution and in the presence of other fungicides was also investigated.

2.3 Experimental section

2.3.1 *Reagents and solutions*

Iprodione [CAS number 36734-19-7], methacrylamide (MAM) [CAS number 79-39-0], ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) [CAS number 97-90-5], 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPAP) [CAS number 24650-42-8], pyrimethanil [CAS number 53112-28-0], procymidone [CAS number 32809-16-8], toluene, acetonitrile, ethanol and acetic acid were purchased from Sigma Aldrich, France. Solvents were HPLC grade and were used without any purification. High purity de-ionized water, obtained with an Elga Ionic system PURELAB Option, was used to prepare ethanol/aqueous solutions and mobile phase mixture.

2.3.2 *Polymers preparation*

MIPs were prepared by using MAM as functional monomer and EGDMA as crosslinker. The molar ratio of EGDMA/MAM/iprodione depending on the polymerization method was 4/1/0.1 for bulk polymerization and 2/0.4/0.1 for precipitation polymerization. The polymer synthesis was carried out with DMPAP as initiator in 1 mL or 10 mL of toluene to obtain a bulk or precipitating MIP particles.

MAM and iprodione were weighed in a test tube and dissolved in toluene. After the addition of EGDMA and DMPAP, the mixture was degassed in an ultrasonic bath for 10 minutes. The tube was then sealed and exposed to ultraviolet radiation overnight. The resulting bulk MIP was ground into powder.

For comparison purposes, corresponding non-imprinted polymers (NIP) were prepared similarly to the process described above, except that the polymerization mixture did not contain the template.

In order to remove the template, the polymer particles were soaked in the mixed solvent of acetic acid and ethanol (30/70 v/v) and subjected to ultrasonic treatment for 10 minutes. This mixture is meant to break the hydrogen bonds between iprodione and the polymer. Washing in ethanol continued until the template could no longer be detected with HPLC in washing solutions. The solvent was then removed by centrifugation, and the fine particles were dried at 65 °C overnight in an oven. These fine particles were used in the subsequent experiments.

2.3.3 *High performance liquid chromatography (HPLC)*

Reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was performed using a C18 column on a Shimadzu LC equipped with a 25 µL loop injector, an SPD 20AT UV-visible absorbance detector and an LC-20AT liquid pump. Acetonitrile/water (60/40 v/v) was used as mobile phase and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. Detection was performed at 220 nm, which is the maximum adsorption wavelength of iprodione.

2.3.4 *Batch experiments*

Equilibrium isotherm data were obtained in a batch wise approach. 10 mg of cleaned imprinted polymer or non-imprinted polymer were suspended in 20 mL of hydro-alcoholic solutions containing from 1×10⁻⁵ to 1.1×10⁻³ M of iprodione. These isotherms were performed in ethanol/water solutions (50/50, v/v). The mixture was shaken continuously for 2 hours at 25 °C. After removal of the polymer particles and filtration of the resulted solution under 0.45µm membrane, the concentration of free iprodione at equilibrium, F (mol.L⁻¹), was analysed by HPLC-UV. The concentration of iprodione bound to the polymer, B (mol.L⁻¹), was calculated by subtracting the concentration of free iprodione from the initial iprodione concentration.

2.3.5 *Molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE)*

MISPE method was applied on wine model solutions and on white wine samples (Bourgogne Chardonnay 2011 de Charles Renoir) spiked with iprodione (1×10⁻⁵M). Empty polypropylene

SPE tubes (1mL, supelco, Bellfonte, USA) with PE frits (20µm porosity) were connected to a vacuum manifold, and 20 mg of the MIP (or NIP) were slurried with acetonitrile and packed into the cartridges. A second frit was inserted on top of the solvent bed. The SPE cartridges were activated with 5 mL of methanol and conditioned with 5 mL of water/ethanol solution (90/10, v/v). Wine model or white wine (total of 6 mL) samples were applied to the cartridges and washed with 5 mL of water/ethanol solution (90/10, v/v). The cartridges were dried for 5 min under vacuum (14psi) after the final stage of the wash step.

In order to get the optimal eluting solution, different eluting compositions were tested using ethanol/water and or acetonitrile/water mixtures with different eluent strength keeping the same conditions for the other steps. SPE steps were controlled by analyzing iprodione in the effluents by HPLC-UV. The behavior of the NIP under these SPE conditions (NISPE) was evaluated and compared with the corresponding MIP.

For the selectivity tests, a solution of the white wine (Bourgogne Chardonnay 2011 de Charles Renoir) spiked with 5×10^{-5} M of three pesticides that have some structural similarity: iprodione, pyrimethanil or procymidone was loaded into the conditioned MISPE and the NISPE. After the loading step, the cartridges were washed with 5 mL of water/ethanol solution (90/10, v/v) and dried for 5 min under vacuum (14 psi). Finally, 2 mL of acetonitrile were used for the elution step.

2.4 Results and discussion

2.4.1 Adsorption isotherm

We synthesized two kinds of molecularly imprinted polymers using the same reagents but varying the polymerization methods: bulk and precipitation. One of the best methods for evaluating the binding sites in MIPs is batch adsorption test. Batch adsorption involves analysis of an MIP in a solution of substrate (Mohajeri, Karimi & Khansari, 2010). Both of the iprodione-MIPs were evaluated by investigating the isotherms adsorption results. For this purpose, batch studies were conducted in a wine model diluted with ethanol (ethanol/water,

50/50, v/v) and the obtained isotherms were outlined. The latter represent a measure of the relationship between the equilibrium concentration of free (F) and bound (B) iprodione over a certain concentration range and can be generated from the breakthrough curves(Lv, Lin, Feng, Zhou & Tan, 2007). The equilibrium adsorption isotherms of iprodione from the diluted wine model solution onto MIP_b, NIP_b, MIP_p and NIP_p are presented in Figure 37. MIP_p shows larger adsorption capacity than MIP_b and the MIPs have higher affinity for iprodione than the corresponding NIPs. This difference was evaluated by calculating for each MIP the imprinting factor $IF = K_pMIP/K_pNIP$ (Sellergren et al., 2009) where K_p is the partition constant $K_p = B/F$. The IF of MIP_p was significantly higher (2.40 ± 0.02) than that of MIP_b (1.9 ± 0.02).

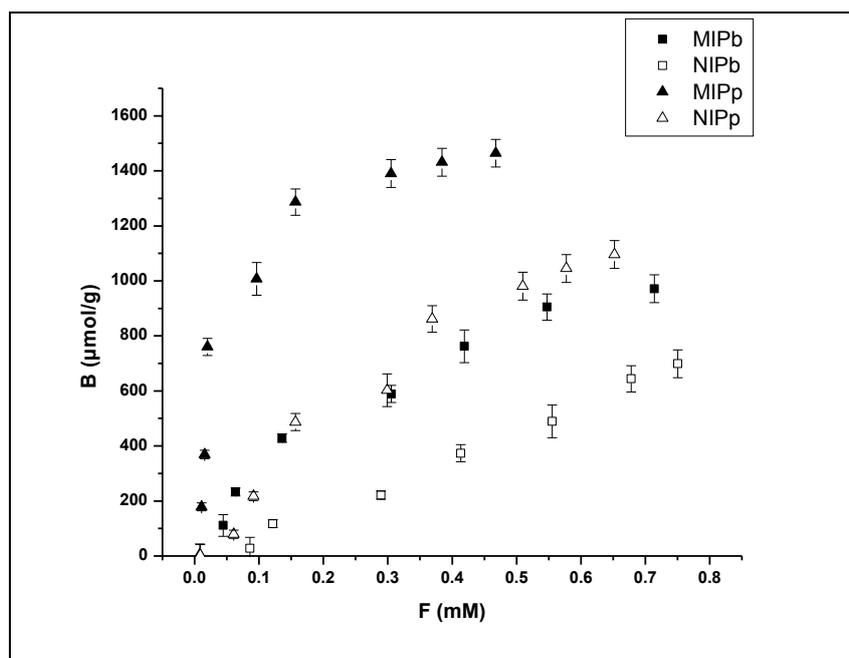


Figure 37 Adsorption isotherms of iprodione on MIP_b, NIP_b, MIP_p and NIP_p in ethanol/water (50/50, v/ v).

This reveals that MIP_p has better recognition properties than MIP_b. These differences could be a result of the interactions strength between the iprodione and the functional groups in the

polymers. To confirm these results in real samples, the polymers were tested as stationary phases on MISPE and applied on a white wine solution. However, the optimization of the MISPE steps (Conditioning, loading, washing and elution) was performed using MIPp and applied to MIPb.

2.4.2 *Optimization of MISPE on white wine sample*

White wine samples spiked with iprodione were loaded in the SPE cartridges containing the MIPp and NIPp. Figure 38 shows the results of the MISPE_p and NISPE_p procedure. By examining the Figure 38a, we observe 4 times higher adsorption on MISPE_p compared to the NISPE_p. The amount of the non-specific adsorbed iprodione (the NIP adsorbed quantity) was lower than the specific one. In this way, specific interactions were developed in the wine matrix. Furthermore, this was confirmed by examining the washing step result in the Figure 38a, where a lower quantity of iprodione is removed from the MISPE cartridge compared to the NISPE. This result shows that MISPE_p offers a good recognition of iprodione in wine sample solution. 90 % of iprodione was retained by specific interactions.

The whole amount of iprodione retained by the NISPE_p was due to non-specific interactions, this could be confirmed as well by the washing step where the iprodione was completely eliminated from the NISPE cartridge.

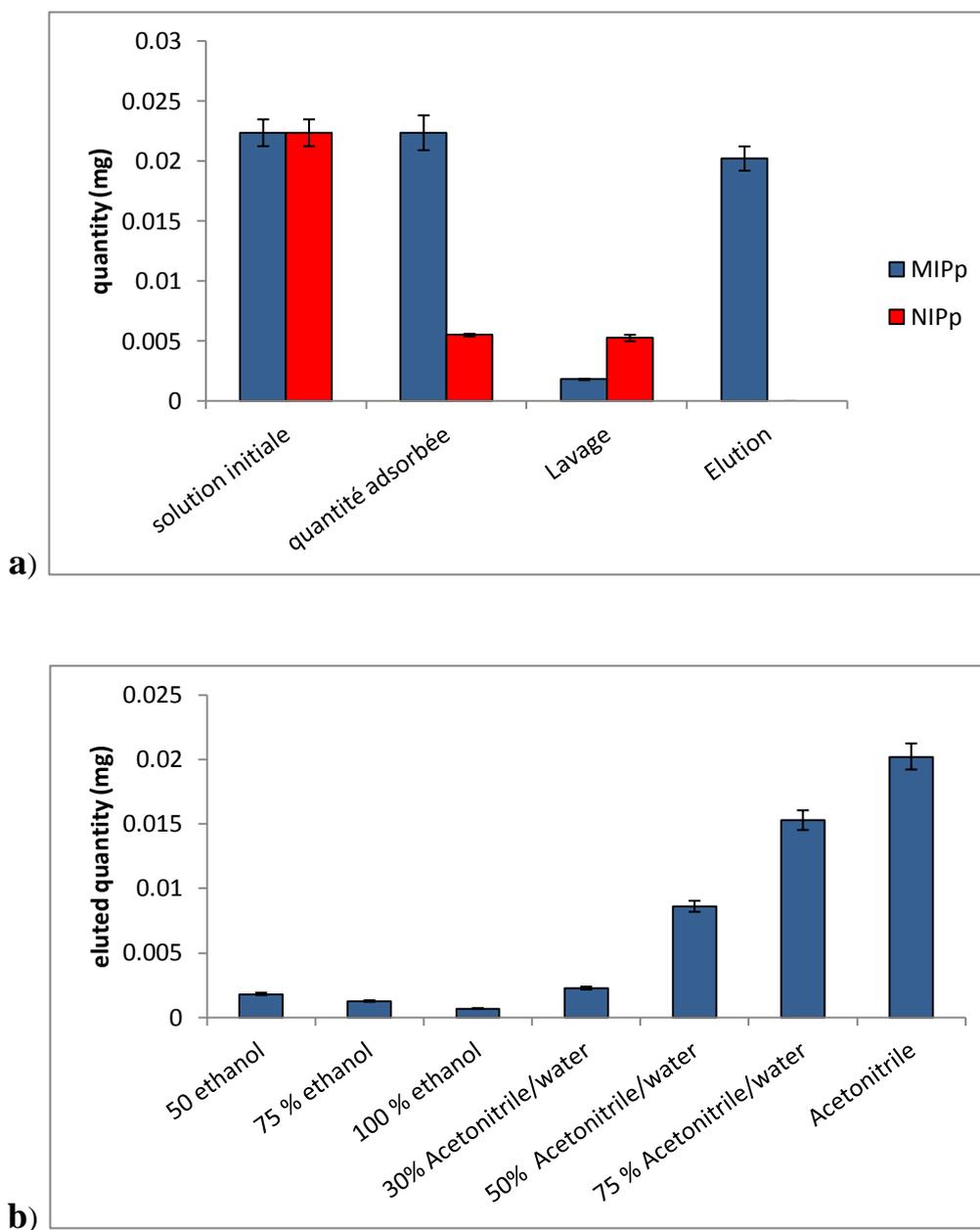


Figure 38 a) Adsorbed and recovered amount of iprodione after the washing step and the elution step (with acetonitrile) from MISPE_p and NISPE_p columns and **b)** the recoveries of eluted iprodione obtained on the MISPE_p after eluting iprodione with different elution solvents; ACN= acetonitrile

The eluting step plays a crucial role in the MISPE technique which is used to preconcentration purpose. The optimal elution solvent should completely elute the target analytes in a one step. An optimization of the eluting step was performed. As shown in Figure 38b the ethanol eluted 0.6 μg of iprodione which represents only 2% of the residual iprodione. By decreasing the percentage of ethanol, the recovery increases but not sufficiently to remove all the residual iprodione. For that reason, we tried another organic modifier than ethanol which could increase the eluent strength: the acetonitrile. Different solutions were tested with different compositions of acetonitrile/water (30/70, 50/50, 75/25; v/v) and acetonitrile. The recoveries reached by adding acetonitrile were higher, and the pure acetonitrile solution was able to recover the whole amount of residual iprodione.

To understand this result we compare the hydrophobicity of the solvents by comparing their partition coefficient between octanol and water: $\text{LogP}(\text{EtOH}) = -0.19$; $\text{LogP}(\text{ACN}) = -0.45$ and $\text{LogP}(\text{H}_2\text{O}) = -1.38$. We also compare the polarity of the solvents which is evaluated by the dipolar moment of ethanol $\mu(\text{EtOH}) = 1.69 \text{ D}$, of acetonitrile $\mu(\text{ACN}) = 3.92 \text{ D}$ and of water $\mu(\text{H}_2\text{O}) = 1.85 \text{ D}$. Finally, the dielectric constants (Permittivity) of the different eluting solvents are : $\epsilon(\text{EtOH}) = 24.55$; $\epsilon(\text{ACN}) = 37.5$; $\epsilon(\text{H}_2\text{O}) = 80$; $\epsilon(\text{acetonitrile/water } 30/70) = 67.25$, $\epsilon(\text{acetonitrile/water } 50/50) = 58.75$, $\epsilon(\text{acetonitrile/water } 75/25) = 48.1$. We can conclude that the recoveries are higher when we use a more polar eluting solvent with a quite low hydrophobicity and a quite important dielectric constant.

The same procedure was applied to MISPE_b and NISPE_b using the acetonitrile as the elution solvent. The results are presented in Figure 39. It shows that the MIPs prepared with two different polymerization methods do not exhibit the same behaviour. The extraction efficiency of the NISPE_b was better than the NISPE_p : this is a result of a higher number of non-specific interaction sites in the polymer prepared by bulk polymerization. The difference between the amount of iprodione adsorbed on MISPE and NISPE is higher when the precipitation method is used. The latter result is in accordance with the batch results. MISPE_b showed high recovery in the washing step which is consistent with the high amount of non-specific bound iprodione. Furthermore, the amount of iprodione removed from MISPE_b cartridge in the

eluting step, which corresponds to iprodione retained by specific interactions, was lower compared to the iprodione removed in the washing step. Only 40 % of the total amount of the adsorbed iprodione was due to specific interactions between the sorbent and the analyte in the real wine sample. This suggests that the polymer synthesized by precipitation polymerization has been more successfully imprinted or that the crushing step of the MIP synthesized in bulk destroys sites of specific recognition (no specific cavities on the surface of MIPb particles). The concentration factor of the MISPE_b was 3 while the MISPE_p concentration factor was 5.8 (almost 2 times higher).

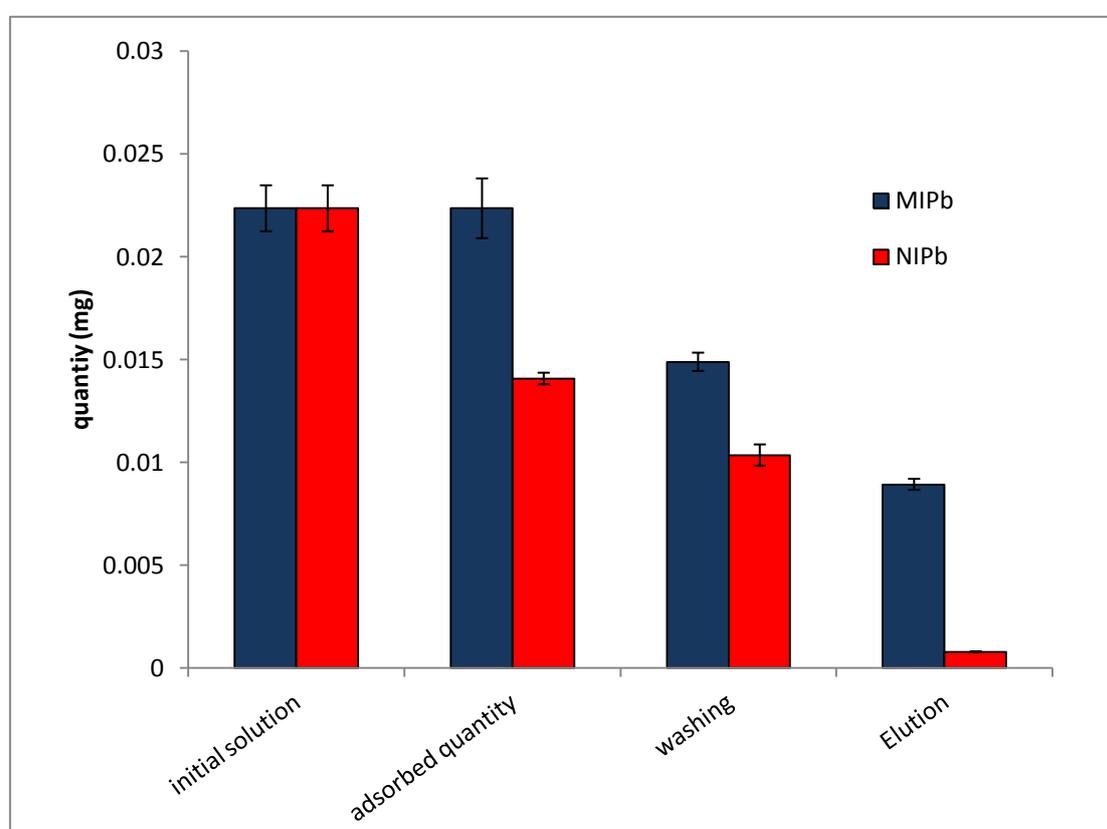


Figure 39 Adsorbed and recovered amount of iprodione after the washing step and the elution step (with acetonitrile) from MISPE_b and NISPE_b cartridges.

2.4.2.1 Selectivity

The MIPs were evaluated for their binding selectivity toward two other fungicides structural analogues of iprodione: pyrimethanil and procymidone (Figure 40). In order to study the selectivity of MIP_p and MIP_b sorbents toward iprodione and its structural homologues, MISPE using MIP_p and MIP_b were performed in a white wine sample spiked with the three fungicides. For this purpose, the optimized SPE procedure was used.

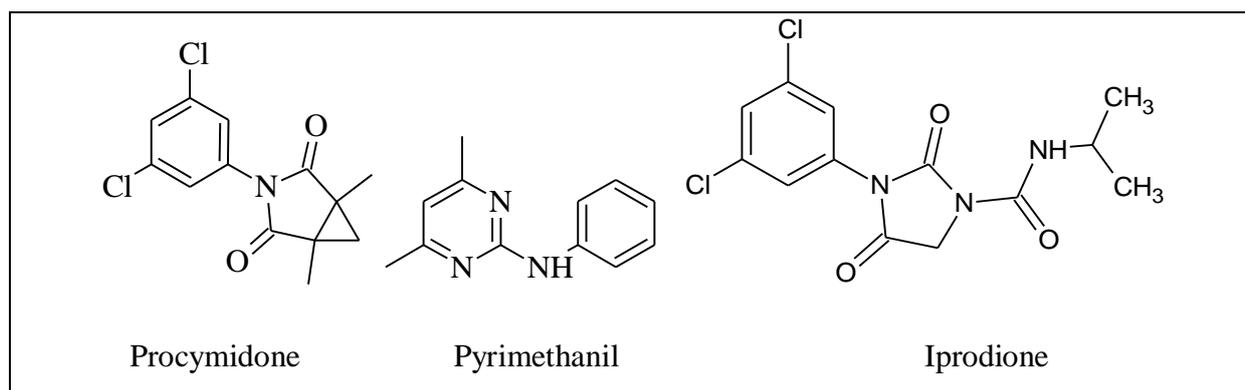


Figure 40 The chemical structures of the fungicides: Iprodione, pyrimethanil and procymidone.

The chromatograms of the white wine sample spiked with the three fungicides before and after MISPE with MIP_p and MIP_b are presented in Figure 41 and

Figure 42 respectively. The chromatograms corresponding to the final elution step show that the MISPE_p (

Figure 42) is more selective than the MISPE_b (Figure 41). This could be explained by the more important non-specific interactions of the MISPE_b compared to MISPE_p. MISPE_b was able to preconcentrate iprodione as well as its analogues. Moreover, MISPE_p was very selective; the iprodione had a stronger retention than pyrimethanil and procymidone. On the other hand, the three fungicides had the same strength of retention on the MISPE_b and were eluted simultaneously in the eluting step (Figure 41).

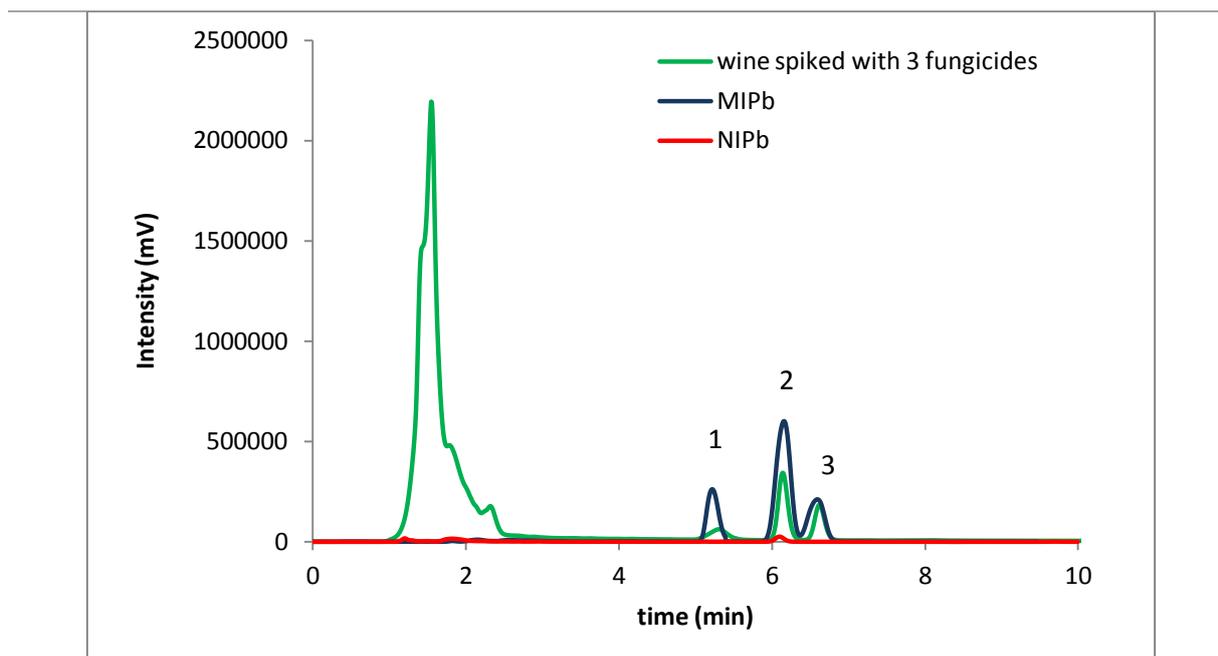


Figure 41 Overlay of chromatograms of: a white wine solution spiked with three fungicides: (1) pyrimethanil, (2) iprodione and (3) procymidone and the eluted solutions from the MISPE_b (MIP_b) and NISPE_b (NIP_b).

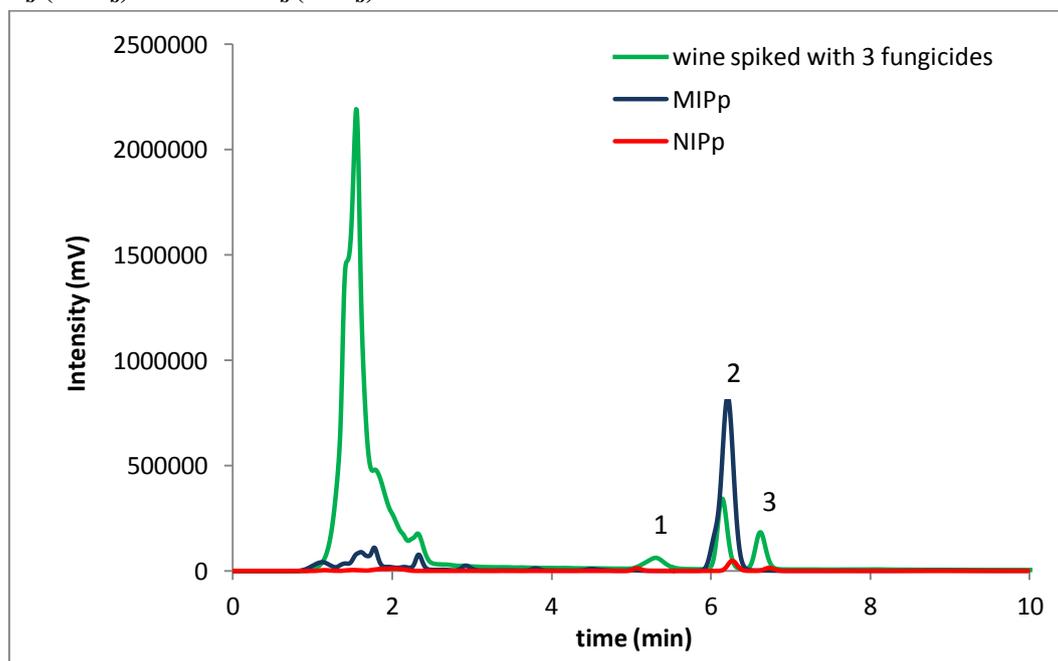


Figure 42 Overlay of chromatograms of: a white wine solution spiked with three fungicides: (1) pyrimethanil, (2) iprodione and (3) procymidone and the eluted solutions from the MISPE_p (MIP_p) and NISPE_p (NIP_p).

2.5 Conclusion

This study demonstrated the potential of an iprodione imprinted polymer for the preconcentration of iprodione in wine samples. This very selective MIP for iprodione fungicide was prepared via precipitation polymerization and subsequently applied to MISPE. It has higher selectivity, specificity, imprinting factor and enrichment capability compared with MIP prepared by bulk polymerization. The MIP prepared by precipitation polymerization provides an alternative SPE sorbent for the selective extraction of iprodione from wine samples and potentially from beverages and water. The MIP prepared by bulk polymerization could be a subject of future research to preconcentrate a family of pesticides based on the result obtained from the selectivity test where the preconcentration of the three pesticides was possible. MIP presents potentiality for routine detection of forbidden substances in wine such as fungicide.

3 Données supplémentaires : Calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry DSC)

La DSC a été utilisée dans le but de calculer les énergies d'interaction entre le MIP ou le NIP d'un côté et l'iprodione de l'autre côté. Les 4 polymères étudiés sont le MIP2, le NIP2, le MIP6 et le NIP6.

Les résultats, comme le montrent les figures ci-après (Figure 43, Figure 44, Figure 45 et Figure 46), présentent des pics exothermiques dans les spectres des MIPs (Figure 43 et Figure 45) qu'on ne trouve pas dans ceux des NIPs (Figure 44 et Figure 46). Les pics exothermiques indiquent une perte de chaleur lors de l'interaction entre le polymère et l'iprodione, ce qui est le cas des liaisons ou interactions favorables.

Sur le spectre du MIP2 (Figure 43), on peut constater que la descente du pic ne revient pas à la ligne de base, mais seule l'intégration de ce pic est possible, cela signifie que l'enthalpie calculée après intégration est une sous-estimation de la valeur réelle. Après intégration du pic, l'enthalpie a été évaluée à 0,003 J. La masse du polymère MIP2 est de 10 mg, donc en excès, ce qui va dans le sens de l'hypothèse que l'enthalpie totale correspond à l'interaction du MIP2 avec la totalité de la quantité d'iprodione (0,5 μmol) en solution. L'énergie d'interaction entre l'iprodione et le MIP2 est alors de 6 KJ/mol. Ce pic correspond à l'iprodione adsorbé sur les sites spécifiques.

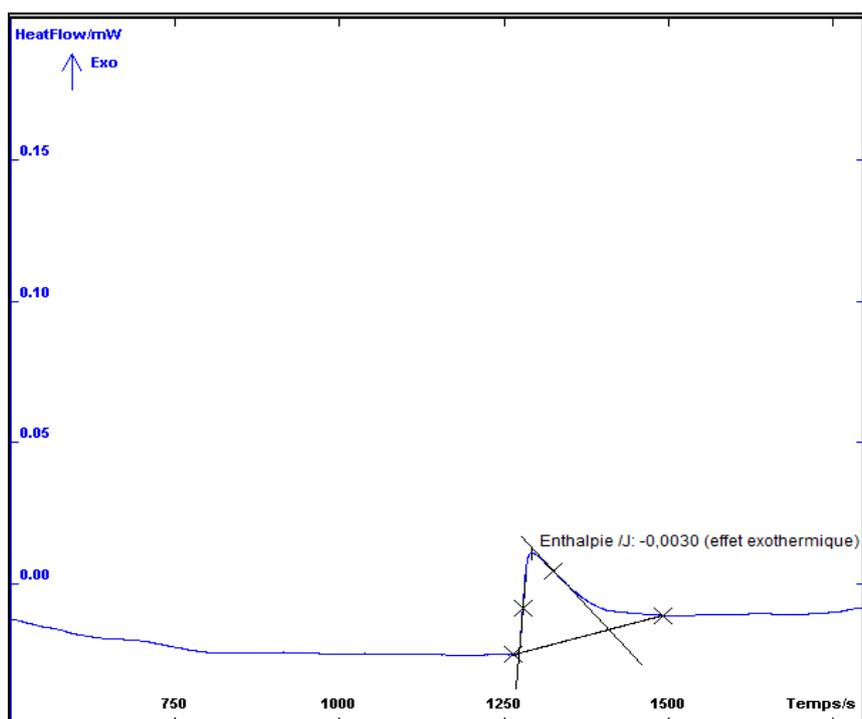


Figure 43 Spectre DSC du mélange MIP2-solution d'iprodione.

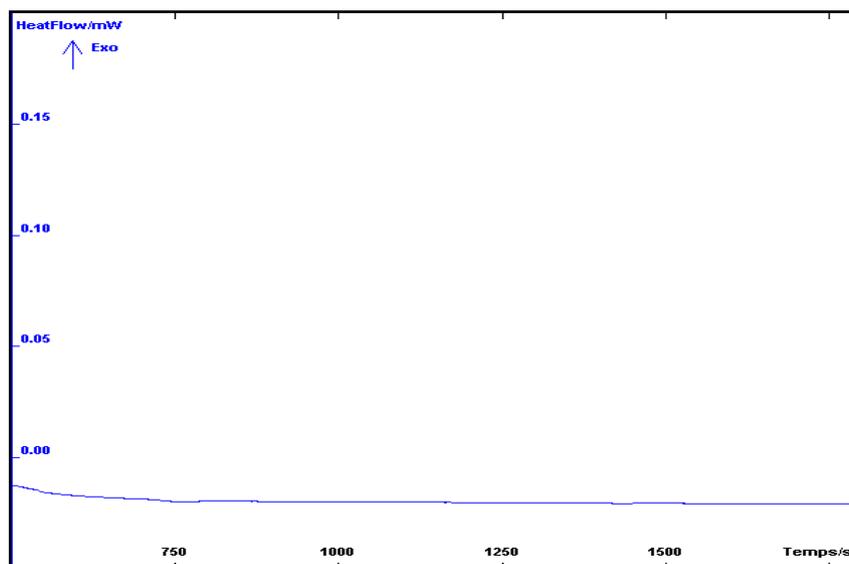


Figure 44 Spectre DSC du mélange NIP2-solution d'iprodione

Dans le cas du MIP6 la solution initiale était 10 fois plus diluée que celle utilisée dans le cas du MIP2. Le MIP6 est moins dense que le MIP2 et on était limité par le volume de la cellule. Puisqu'on voulait que le MIP6 soit en excès par rapport à l'iprodione (pour la facilité des calculs d'enthalpie), nous avons utilisé une solution diluée. A savoir que dans ces conditions, le MIP2 n'a pas donné de pic d'interaction. La quantité d'iprodione en solution est de 0,05 μmol donc l'énergie d'interaction entre l'iprodione et le MIP6 est de 26 KJ/mol.

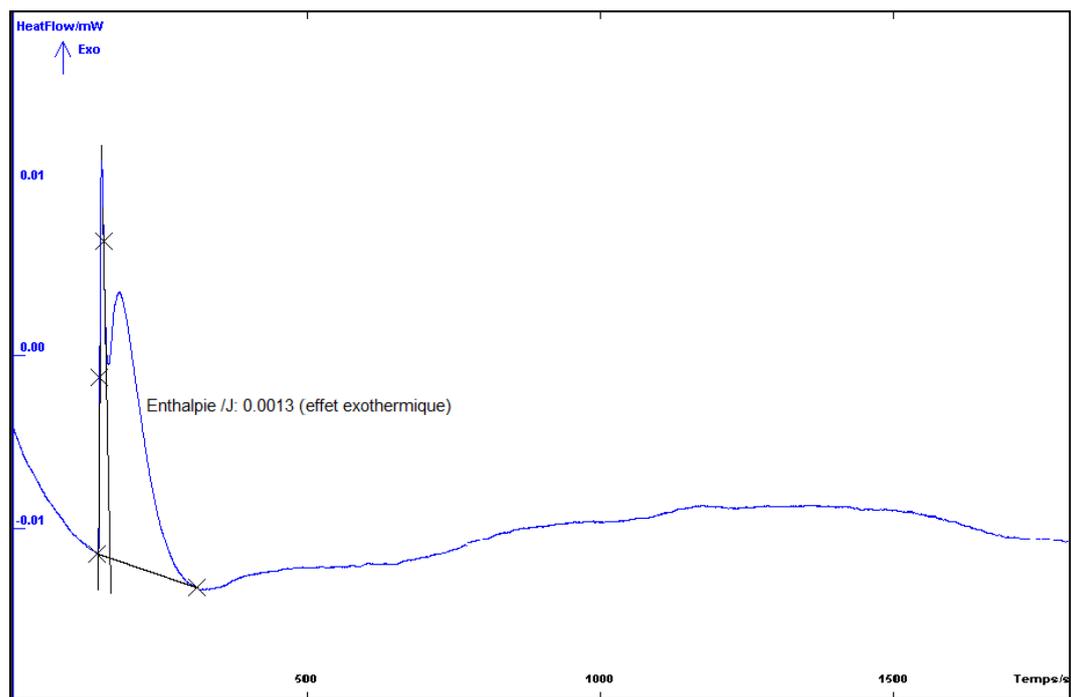


Figure 45 Spectre DSC du mélange MIP6-solution d'iprodione.

En outre, dans le cas du MIP6 non seulement l'interaction est plus forte, mais aussi elle a lieu immédiatement après injection du polymère dans la solution, alors qu'elle a eu lieu après 20 min dans le cas du MIP2. Cela pourrait être probablement dû à la meilleure accessibilité des sites du MIP6 qui est synthétisé par précipitation. En effet les surfaces des billes du MIP6 sont imprimées, contrairement au MIP2 qui a été broyé. Dans ce dernier cas, une diffusion serait nécessaire pour que l'iprodione ait accès aux sites de reconnaissance. Le format des MIPs synthétisés par polymérisation en masse ralentit l'accès de l'iprodione aux sites et donc l'interaction entre le MIP et la molécule cible.

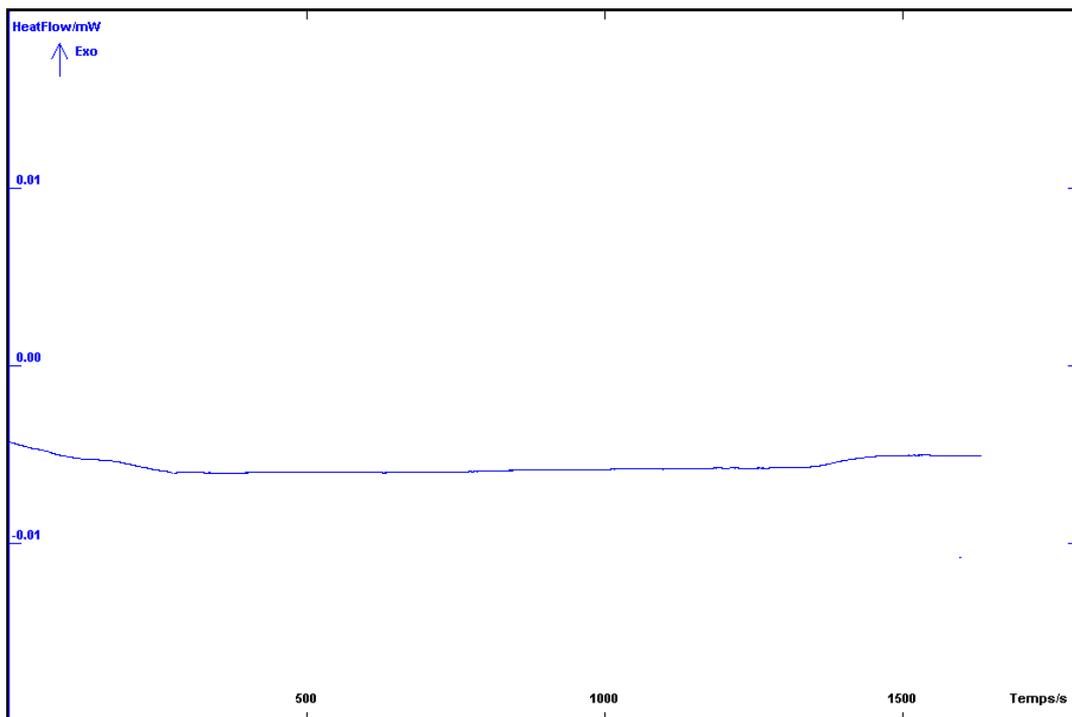


Figure 46 Spectres DSC du mélange NIP6-solution d'iprodione

4 Références

- Bailey, H. D., Armstrong, B. K., de Klerk, N. H., Fritschi, L., Attia, J., Scott, R. J., Smibert, E., Milne, E., & for the Aus, A. L. L. C. (2011). Exposure to professional pest control treatments and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Cancer*, *129*(7), 1678-1688.
- Curgier J-P, B. S. (2005). Plan de surveillance résidus en viticulture. Campagnes viticoles 1990-2003. Direction générale de l'alimentation. sous direction de la qualité et de la protection des végétaux.
- Du, W., Fu, Q., Zhao, G., Huang, P., Jiao, Y., Wu, H., Luo, Z., & Chang, C. (2013). Dummy-template molecularly imprinted solid phase extraction for selective analysis of ractopamine in pork. *Food Chemistry*, *139*(1-4), 24-30.
- Duan, Z., Yi, J., Fang, G., Fan, L., & Wang, S. (2013). A sensitive and selective imprinted solid phase extraction coupled to HPLC for simultaneous detection of trace quinoxaline-2-carboxylic acid and methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid in animal muscles. *Food Chemistry*, *139*(1-4), 274-280.
- Hashim, S. N. N. S., Schwarz, L. J., Boysen, R. I., Yang, Y., Danylec, B., & Hearn, M. T. W. (2013). Rapid solid-phase extraction and analysis of resveratrol and other polyphenols in red wine. *Journal of Chromatography A*, *1313*(0), 284-290.
- Lv, Y., Lin, Z., Feng, W., Zhou, X., & Tan, T. (2007). Selective recognition and large enrichment of dimethoate from tea leaves by molecularly imprinted polymers. *Biochemical Engineering Journal*, *36*(3), 221-229.
- Martín-Esteban, A. (2013). Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *45*(0), 169-181.
- Mohajeri, S. A., Karimi, G., & Khansari, M. R. (2010). Clozapine imprinted polymers: Synthesis, characterization and application for drug assay in human serum. *Analytica Chimica Acta*, *683*(1), 143-148.
- Nougadère, A., Sirot, V., Kadar, A., Fastier, A., Truchot, E., Vergnet, C., Hommet, F., Baylé, J., Gros, P., & Leblanc, J.-C. (2012). Total diet study on pesticide residues in France: Levels in food as consumed and chronic dietary risk to consumers. *Environment International*, *45*(0), 135-150.
- Pelit, F. O., Ertaş, H., Seyrani, I., & Nil Ertaş, F. (2013). Assessment of DFG-S19 method for the determination of common endocrine disruptor pesticides in wine samples with an estimation of the uncertainty of the analytical results. *Food Chemistry*, *138*(1), 54-61.
- Rodriguez, E., Moreno-Bondi, M. C., & Marazuela, M. D. (2011). Multiresidue determination of fluoroquinolone antimicrobials in baby foods by liquid chromatography. *Food Chemistry*, *127*(3), 1354-1360.
- Sellergren, B., Schillinger, E., & Lansa, F. (2009). *Combinatorial Methods for Chemical and Biological Sensors*. New York: Springer.

- Sen, K., Cabaroglu, T., & Yilmaz, H. (2012). The influence of fining agents on the removal of some pesticides from white wine of *Vitis vinifera* L. cv. Emir. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 3990-3995.
- Singh Saini, S., & Kaur, A. (2012). Molecularly Imprinted Polymers for the Detection of Food Toxins: A Minireview. *Advances in Nanoparticles*, 2, 60-65.
- Whitacre, D. M., Kesavachandran, C., Fareed, M., Pathak, M., Bihari, V., Mathur, N., & Srivastava, A. (2009). Adverse Health Effects of Pesticides in Agrarian Populations of Developing Countries. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 200*, vol. 200 (pp. 33-52): Springer US.
- Zhang, Z., Luo, L., Cai, R., & Chen, H. (2013). A sensitive and selective molecularly imprinted sensor combined with magnetic molecularly imprinted solid phase extraction for determination of dibutyl phthalate. *Biosensors and Bioelectronics*, 49(0), 367-373.

PARTIE 4

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les exigences de coût et de rapidité se rajoutent à l'exigence de sélectivité toujours plus forte en chimie analytique, notamment dans l'analyse des aliments. Loin des études de toxicités aiguës, ce sont désormais les toxicités à long terme, par effet cumulatif, qui sont les interrogations des autorités sanitaires. Des produits, tels que les pesticides, herbicides à l'état de traces, font désormais l'objet de surveillance. Les MIPs permettent de répondre à ces défis de détermination des composés présents à l'état de traces dans des matrices complexes. Les MIP s'utilisent en particulier pendant l'étape de pré-concentration, lors de l'échantillonnage. Cette thèse apporte une contribution à la recherche de détection de traces de pesticides en ayant pour objet l'étude de la synthèse de polymères à empreintes moléculaires (MIP) spécifiques de l'iprodione, un fongicide présent dans le vin. Son but scientifique était l'exploration des performances de ces MIPs. La compréhension de l'origine des différences de capacité de capture et de sélectivité entre les polymères, rend plus facile l'exploitation demain pour des mesures de routine. Il reste sans doute à travailler la conception d'un prototype (colonne remplie, cartouche SPE, capteur recouvert d'un film de MIP...) mais la mise au point d'un protocole de synthèse d'un MIP spécifique pour ce fongicide et son mode d'utilisation ont été clairement réalisés.

L'objectif de ce travail était d'élaborer un MIP spécifique de l'iprodione, avec une sélectivité satisfaisante par rapport à d'autres molécules homologues comme certains autres fongicides ou des molécules pré-existantes dans le vin. Le haut niveau de sélectivité des MIPs permet leur application dans des matrices complexes ce qui est souvent le cas des milieux réels. Cet objectif est un challenge en lui-même ; la spécificité d'un tel MIP synthétisé par voie non covalente est basée sur des interactions hydrogène malgré la nature dipolaire des milieux d'application (éthanol et eau). Malgré ces exigences contradictoires, nous avons réussi à mettre en évidence la faisabilité d'une telle synthèse. La synthèse d'un polymère de capture spécifique de l'iprodione via des interactions dipôle-dipôle dans un milieu polaire est démontrée : des méthodes analytiques permettant l'établissement d'isothermes d'adsorption et des techniques de caractérisation aux échelles macroscopiques et microscopiques (DSC, rhéologie, RMN) nous ont donné la preuve de la réussite d'un tel MIP. Ces méthodes

prouvent la formation des « empreintes » et donc l'existence de sites ou cavités spécifiques de reconnaissance de l'iprodione basés sur des interactions dipôle-dipôle et qui ont une affinité vis-à-vis de l'iprodione dans un milieu dipolaire. En premier lieu, des isothermes faites dans un milieu hydroalcoolique qui suivent des modèles connus (Freundlich, Scatchard, Dubinin Radushkevich) ont montré la spécificité du MIP et l'existence des sites de faible et de forte affinités avec une énergie qui correspond à une formation d'interaction hydrogène (> 20 KJ). Cela est cohérent avec le résultat obtenu par microcalorimétrie différentielle à balayage (micro DSC). On observe en DSC un pic exothermique dans le MIP en présence d'iprodione. Notons qu'à notre connaissance, cette technique de micro-DSC n'a jamais été utilisée dans le domaine des MIPs...

En outre, si tous les résultats nous ont montré que le MIP est capable de faire des interactions hydrogène, il est évident de se poser la question suivante : y-a-t-il une compétition entre l'iprodione et les molécules d'eau (dipôle H_2O) qui se trouvent dans le milieu hydroalcoolique et dans le vin? Pour y répondre, nous avons utilisé la technique de sorption d'eau. Comme pour la DSC, le suivi de sorption d'eau dans un MIP pour traduire une capacité d'interaction dipôle-dipôle n'a pas encore été appliquée dans la littérature, même ceux qui sont dédiés à des applications dans des milieux aqueux (environnementaux, biologiques, etc...). Finalement, nous sommes passés à l'échelle microscopique pour chercher les interactions entre les atomes (C et H), Le but reste le même que les précédentes techniques : démontrer l'existence des interactions hydrogène entre le polymère et l'empreinte. La technique qui nous semblait de choix est la RMN du solide en deux dimensions.

Suite à ce travail de thèse, on peut affirmer que différentes relations de corrélation peuvent être établies entre les performances d'un polymère imprimé et les paramètres de synthèse. Tout d'abord, un plan d'expériences a été utilisé pour relier la qualité de l'impression moléculaire aux natures des réactifs et à la méthode de polymérisation. Le suivi par photorhéologie nous a permis également de dire qu'il existe une relation entre les propriétés viscoélastiques pendant la synthèse et le facteur d'impression ; nous avons démontré qu'un réseau polymérique qui a une cinétique plus lente (ce qui donne un polymère plus rigide que lors de polymérisation rapide) donne une meilleure impression, sans doute parce que le réarrangement spatial autour de la molécule empreinte permet l'établissement plus complet

d'interactions. Les études volumétriques d'adsorption à l'azote nous ont permis de voir l'influence de la porosité et de la surface spécifique sur les propriétés de reconnaissance d'un MIP. Nous avons aussi pu montrer à l'issue de ces travaux, que la modélisation moléculaire est particulièrement pertinente pour simuler les interactions monomère fonctionnel-molécule empreinte. La modélisation moléculaire est donc adaptée à l'identification des monomères fonctionnels formant les meilleurs complexes avec la molécule empreinte pour un solvant donné. Par la suite, avant la synthèse d'un MIP pour une molécule donnée, on peut avoir recours à la modélisation moléculaire pour le choix du monomère et du solvant porogène, ce qui permet d'économiser un grand nombre d'essai de mise au point.

Enfin nous avons montré, grâce à la MISPE (*molecularly imprinted solid phase extraction*) qu'il est possible de pré-concentrer sélectivement l'iprodione dans le vin ou pré-concentrer plusieurs fongicides homologues, en utilisant un MIP méthacrylamide-co-EGDMA synthétisé respectivement par polymérisation en masse ou par précipitation.

Ces différentes conclusions sont présentées schématiquement dans la Figure 47.

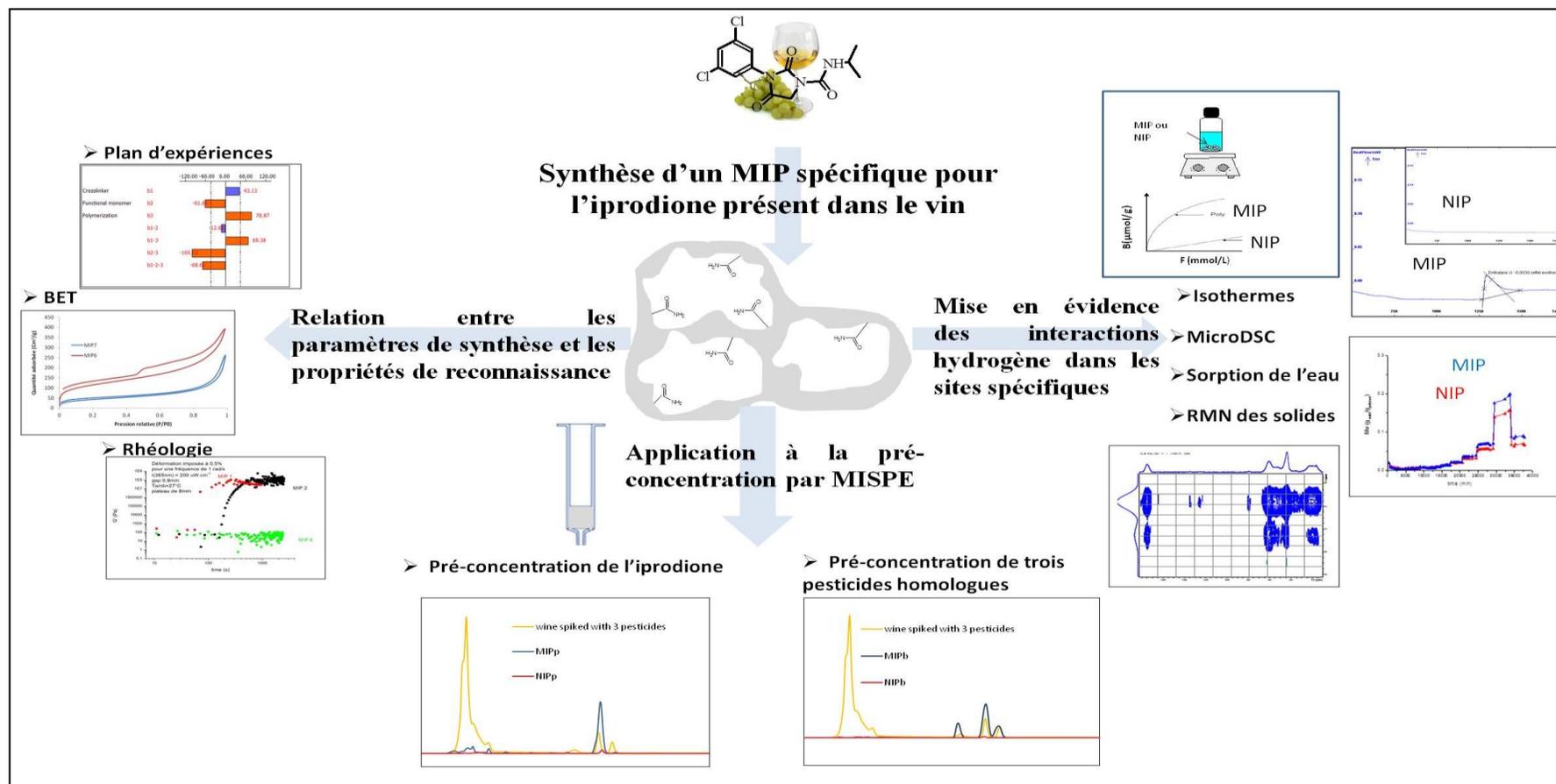


Figure 47 Schéma représentant les différentes conclusions de la thèse.

Nous avons observé que la performance d'un MIP était supérieure lorsque la synthèse était réalisée par précipitation que par polymérisation en masse. Si on admet qu'un monolithe en voie de synthèse correspond à la formation d'un gel (puis d'un solide) et qu'un précipité correspond à une situation défavorable à la formation d'un gel, alors la rhéologie permettra une prévision des concentrations de réactifs à ne pas dépasser pour ne pas former un monolithe. Il nous resterait des expériences de rhéologie à effectuer pour calculer la concentration limite de gélification (obtention d'un monolithe) afin de se placer juste en dessous de cette concentration limite de gélification pour obtenir un précipité. Des expériences de résonance magnétique nucléaire 2D sur des molécules marquées, par exemple un marquage d'un azote de l'iprodione, pourraient nous donner plus d'informations sur les interactions recherchées entre la molécule cible ou empreinte et les sites spécifiques et/ou la charpente.

Ce travail peut être aussi complété par des applications du MIP dans d'autres milieux d'intérêt par exemple dans l'eau polluée puisqu'il a été démontré qu'un MIP non covalent pouvait être envisagé dans des solvants polaires.

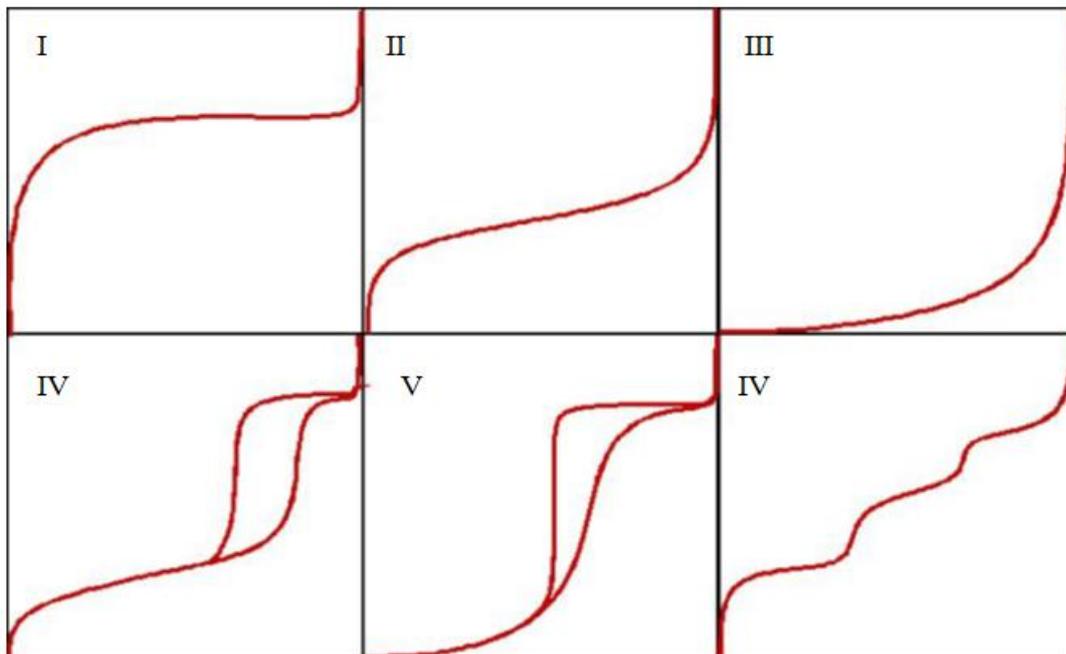
On pourrait aller encore plus loin dans l'évaluation de la force des interactions hydrogène entre les sites de forte affinité et la molécule cible, en testant l'applicabilité du MIP dans un milieu contenant un agent chaotrope comme l'urée à différentes concentrations. Des études en présence d'urée (dipôle concurrent d'autres dipôles, souvent utilisé dans l'étude de la structure des protéines pour dissocier les interactions dipôle-dipôle) permettraient de visualiser l'effet de la fragilisation de ces interactions sur la recapture de l'iprodione (ou probablement d'une autre molécule empreinte).

Afin que le MIP puisse être utilisé pour un but d'élimination en plus de la pré-concentration, des tests de toxicité sur les MIP ainsi que des analyses sensorielles sur les qualités organoleptiques du vin restent à réaliser.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

Les différentes isothermes de physisorption :



I : Echantillon microporeux (pores < 2 nm)

II : Adsorbant macroporeux. La déposition de multicouches suit l'adsorption de la monocouche.

III : Adsorbant macroporeux avec faible interaction avec l'adsorbât ($C < 20$).

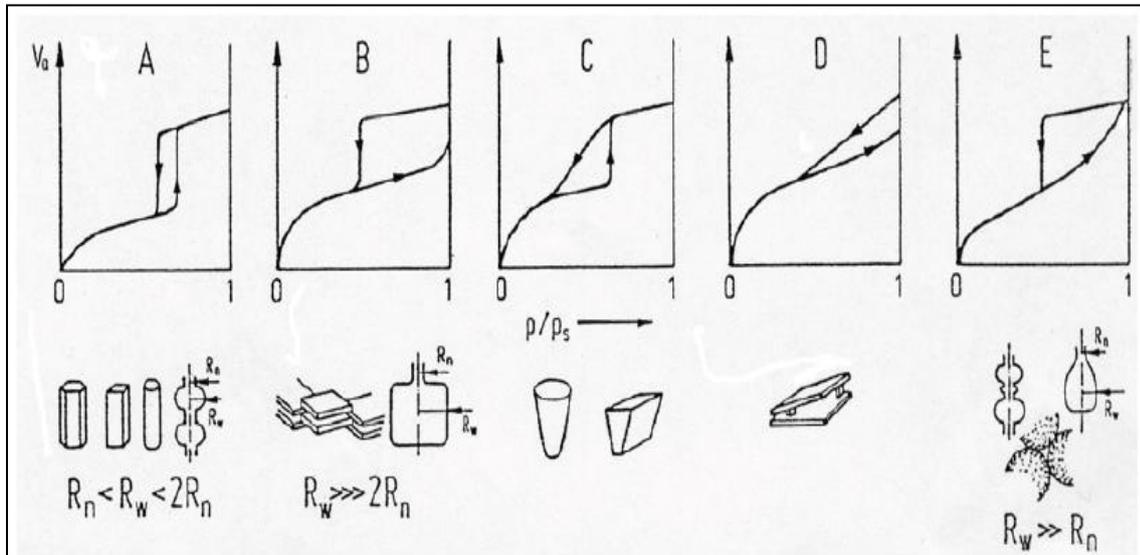
IV : Echantillon mésoporeux : monocouche, multicouche et condensation capillaire.

V : Echantillon mésoporeux avec faible interaction avec adsorbât-adsorbant.

VI : Adsorption multicouche par paliers sur surface très uniformes.

ANNEXE 2 :

Les différents types d'hystérésis dans les isothermes d'adsorption/désorption selon De Boer



A : Pores cylindriques. Les deux branches de l'isotherme seront plus rapprochées quand le diamètre des pores est plus uniforme ($R_n \cong R_w$).

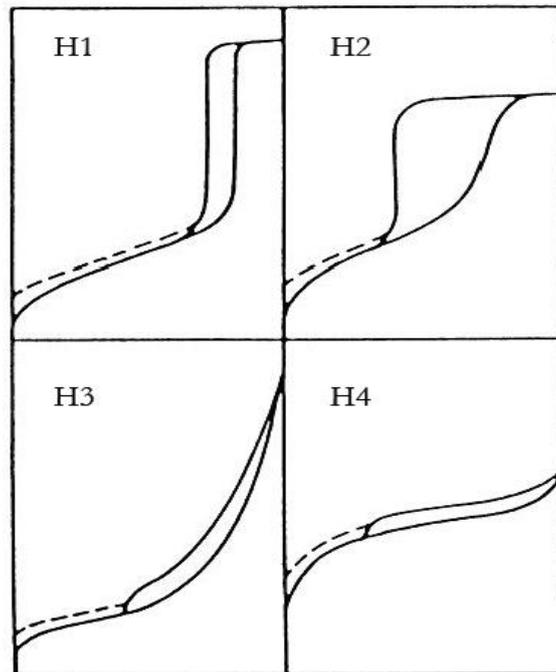
B : Pores type « boîte à lettre », entre plaques parallèles.

C : Pores coniques

D : Pores entre plaques non parallèles.

E : Pores type « col de bouteille » ou cavité entre sphères empilées.

Les différents types d'hystérésis dans les isothermes d'absorption/désorption selon l'IUPAC :



ANNEXE 3 :

La méthode de calcul du module de relaxation en fonction du module de conservation et du modules de perte (Référence : Le cours « Gels de protéine &/ou de polyoside », Professeur Philippe Cayot, Décembre 2012, AgrosupDijon)

Le module de relaxation de contrainte :
$$G(t) = \frac{\text{Rept}}{\text{DI}(t)} = \frac{\sigma(t)}{\varepsilon(t)}$$

avec $\text{Rept}(t)$ réponse du produit (c'est-à-dire contrainte, σ) à une déformation imposée ($\varepsilon \in \mathbb{C}$).

Soit la déformation dynamique en régime harmonique : $\varepsilon(t) = |\varepsilon(t)| \cdot (\cos \omega t + i \cdot \sin \omega t)$. On obtient une contrainte : $\sigma(t) = |\sigma(t)| \cdot [\cos(\omega t + \delta) + i \cdot \sin(\omega t + \delta)]$, δ étant l'angle de déphasage (angle de perte).

$$G(t) = \frac{\sigma(t)}{\varepsilon(t)} = \frac{\cos(\omega t + \delta) + i \cdot \sin(\omega t + \delta)}{\cos(\omega t) + i \cdot \sin(\omega t)} \cdot \frac{|\sigma(t)|}{|\varepsilon(t)|}$$

On applique les formules de transformations trigonométriques :

$$\cos(a+b) = \cos(a) \cdot \cos(b) - \sin(a) \cdot \sin(b) \text{ et } \sin(a+b) = \sin(a) \cdot \cos(b) + \sin(b) \cos(a).$$

On obtient :

$$G(t) = \frac{\cos(\omega t) \cdot \cos(\delta) - \sin(\omega t) \cdot \sin(\delta) + i \cdot [\sin(\omega t) \cdot \cos(\delta) + \sin(\delta) \cdot \cos(\omega t)]}{\cos(\omega t) + i \cdot \sin(\omega t)} \cdot \frac{|\sigma(t)|}{|\varepsilon(t)|}$$

Soit

$$G(t) = |G(\omega)| \cdot \left(\frac{\cos(\delta) \cdot [\cos(\omega t) + i \cdot \sin(\omega t)]}{\cos(\omega t) + i \cdot \sin(\omega t)} + \frac{-\sin(\omega t) \cdot \sin(\delta) + i \cdot [\sin(\delta) \cdot \cos(\omega t)]}{\cos(\omega t) + i \cdot \sin(\omega t)} \right)$$

Soit

$$G(t) = |G(\omega)| \cdot \left(\cos(\delta) + \sin(\delta) \cdot \frac{-\sin(\omega t) + i \cdot \cos(\omega t)}{\cos(\omega t) + i \cdot \sin(\omega t)} \right)$$

Soit

$$G(t) = |G(\omega)| \cdot \left(\cos(\delta) + \sin(\delta) \cdot \frac{-\sin(\omega t) + i \cdot \cos(\omega t)}{\cos(\omega t) + i \cdot \sin(\omega t)} \right)$$

$$G(t) = |G(\omega)| \cdot \left(\cos(\delta) + \sin(\delta) \cdot \frac{-\sin(\omega t) + i \cdot \cos(\omega t)}{\cos(\omega t) + i \cdot \sin(\omega t)} \right)$$

La division d'un nombre complexe par un autre s'effectue de la manière suivante :

$$\frac{z}{z'} = \frac{x + i \cdot y}{x' + i \cdot y'} = \frac{xx' + yy' + i \cdot (-xy' + yx')}{x'^2 + y'^2}$$

En effectuant cette opération, on obtient :

$$G(t) = |G(\omega)| \cdot \left(\cos(\delta) + \sin(\delta) \cdot \frac{-\sin(\omega t) \cdot \cos(\omega t) + \cos(\omega t) \cdot \sin(\omega t) + i \cdot [\sin(\omega t) \cdot \sin(\omega t) + \cos(\omega t) \cdot \cos(\omega t)]}{[\cos(\omega t)]^2 + [\sin(\omega t)]^2} \right)$$

Donc

$$\boxed{G(t) = |G(\omega)| \cdot (\cos(\delta) + \sin(\delta) \cdot i) = G' + i \cdot G''}$$