

Des polymères à empreintes moléculaires pour l'analyse de traces dans des échantillons complexes

Résumé La détermination de composés à des niveaux de concentration très faibles reste un véritable défi analytique dans divers domaines d'application. Les progrès réalisés dans le domaine de l'instrumentation ont permis d'améliorer considérablement la sensibilité et le temps d'analyse. Cependant, l'analyse d'ultra-traces présentes dans des matrices complexes nécessite souvent une étape de purification et de préconcentration avant l'analyse. Par conséquent, des supports d'extraction mettant en jeu un mécanisme de reconnaissance moléculaire peuvent être développés et utilisés pour l'extraction sélective de composés cibles et de certains analogues structuraux, rendant ainsi leur analyse quantitative plus fiable et plus sensible. À cette fin, les polymères à empreintes moléculaires (MIP) et ioniques (IIP) ont déjà montré un fort potentiel pour l'extraction sélective d'analytes cibles (composés organiques ou ions métalliques) à partir de matrices complexes. Leur intégration dans des dispositifs miniaturisés a également déjà fait ses preuves.

Mots-clés Polymères à empreintes moléculaires, polymères à empreintes ioniques, reconnaissance structurale ; extraction sélective, analyse de traces, échantillons complexes.

Abstract **Molecularly imprinted polymers for trace analysis of complex samples**

The determination of compounds at very low concentration levels remains a real analytical challenge in various fields of application. Advances in instrumentation have led to significant improvements in sensitivity and analysis time. However, the analysis of ultra-traces present in complex matrices often requires a purification and pre-concentration step prior to analysis. Consequently, extraction sorbents involving a molecular recognition mechanism can be developed and used for the selective extraction of target compounds and certain structural analogues, making their quantitative analysis more reliable and sensitive. To this end, molecularly imprinted polymers (MIPs) and ionically imprinted polymers (IIPs) have already shown strong potential for the selective extraction of target analytes (organic compounds or metal ions) from complex matrices. Their integration into miniaturized devices has also already proved its worth.

Keywords Molecularly imprinted polymers, ion-imprinted polymers, structural recognition; selective extraction, trace analysis, complex samples.

Les polymères à empreintes moléculaires (MIP, *Molecularly Imprinted Polymer*) sont des matériaux synthétiques dotés de sites de reconnaissance spécifiques, à savoir des cavités, dont la forme, la taille et les groupes fonctionnels en surface sont complémentaires de ceux de la molécule prise comme modèle pour leur synthèse. Ils permettent de mettre en œuvre un mécanisme de rétention basé sur la reconnaissance moléculaire et présentent l'avantage de pouvoir être synthétisés en quelques jours. Leur stabilité, leur facilité de préparation et leur faible coût pour la plupart des analytes cibles, les rendent attrayants pour de nombreuses applications. Ainsi, les MIP ont déjà été utilisés avec succès comme outil alternatif aux anticorps ou aux aptamères dans plusieurs domaines des sciences analytiques tels que la séparation énantiomérique en chromatographie en phase liquide ou en électrochromatographie capillaire et comme outil de reconnaissance dans des capteurs. Ces dernières années, leur utilisation comme support d'extraction sur phase solide (SPE) pour l'extraction sélective de molécules ciblées dans des échantillons variés (échantillons environnementaux, denrées alimentaires, fluides biologiques...) a été largement décrite, la SPE constituant le domaine d'application le plus avancé pour les MIP.

Synthèse de polymères à empreintes moléculaires

Les différentes voies de synthèse des MIP comprennent la polymérisation radicalaire et les processus sol-gel [1]. L'approche de polymérisation radicalaire la plus utilisée est la

polymérisation en masse, qui implique de recourir après synthèse à des étapes de broyage mécanique et de tamisage du monolithe obtenu pour obtenir des particules de la taille adaptée à l'application visée, après une étape de sédimentation permettant d'éliminer les particules plus fines. Comme illustrée en figure 1, cette synthèse implique d'abord la complexation en solution d'une molécule prise comme modèle, appelée empreinte, via des interactions souvent non-covalentes avec des monomères fonctionnels, puis l'initiation

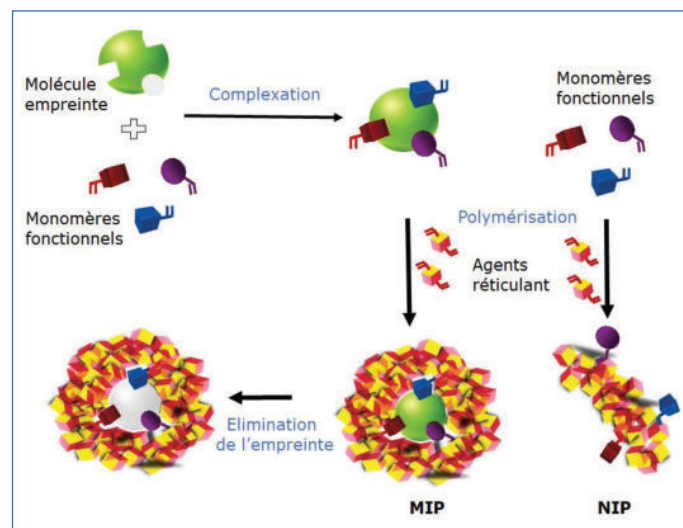


Figure 1 - Schéma de principe de la synthèse d'un MIP.

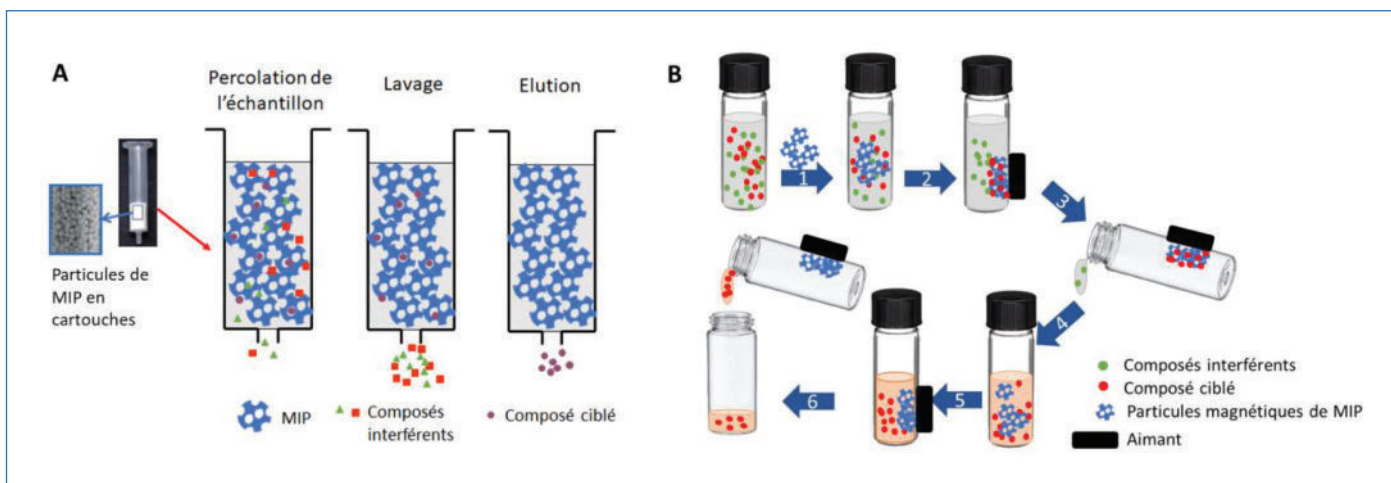


Figure 2 - Extraction sélective sur MIP A) en mode SPE en cartouche (incluant les étapes de percolation, lavage et élution) ou B) en mode dispersif consistant à : introduire les particules de MIP dans l'échantillon (1), et à séparer les particules ayant piégé les molécules cibles de l'échantillon par un aimant (2) du reste de l'échantillon qui est éliminé (3), puis à remettre les particules en suspension dans un solvant pour la désorption des analytes (4) avant leur récupération (6) après piégeage des particules par l'aimant (5).

de la polymérisation de ces monomères autour de l'empreinte après l'ajout d'un agent réticulant et d'un initiateur. Après la polymérisation, la molécule empreinte est éliminée du polymère grâce à des étapes de lavage avec un/des solvant(s) adapté(s) afin de rompre les interactions non covalentes établies au sein des cavités formées. Il en résulte un polymère possédant des cavités complémentaires à la molécule empreinte en termes de taille, de forme et de position des groupements fonctionnels. Par conséquent, le choix des réactifs impliqués dans la synthèse des MIP doit être raisonné afin de créer des cavités hautement spécifiques de la molécule ciblée. Pour éviter les étapes de broyage et de tamisage, il est également possible de procéder par polymérisation en suspension ou par dispersion/précipitation. Cependant, les particules obtenues sont souvent trop petites pour être immobilisées entre deux frittes dans une cartouche d'extraction (comme illustré en *figure 2A*) ou une colonne. Il est également possible de développer des fines couches de MIP en surface de particules de taille homogène et adaptée à l'application visée.

La structure et les fonctionnalités de la molécule empreinte, définissent quant à elles les propriétés ultérieures des sites de liaison. La molécule cible peut être utilisée, mais un analogue structural peut également être sélectionné car une élimination incomplète de la molécule empreinte a déjà été observée. Dans ce cas, le relargage des molécules empreintes résiduelles lors de l'utilisation en extraction du MIP peut entraîner des résultats erronés lors de la quantification de la molécule ciblée dans des échantillons. En effet, même si la quantité relarguée est infime par rapport à la quantité introduite lors de la synthèse et que ce phénomène n'affecte pas les propriétés de rétention du MIP, ces faibles teneurs ne sont pas si négligeables dans un contexte d'analyse de traces. L'utilisation d'un analogue structural de la molécule cible est donc souvent privilégiée, l'analyse chromatographique des extraits permettant de distinguer la molécule ciblée de son analogue structural [2]. La nature et la force des interactions non covalentes entre l'empreinte et les molécules de monomère pendant la synthèse sont liées aux structures des molécules mais aussi aux caractéristiques physiques et chimiques du solvant porogène. Il doit être sélectionné de manière à ne pas interférer aux niveaux des interactions attendues entre la molécule

empreinte et les monomères tout en permettant la solvation de l'ensemble des réactifs. Des approches de modélisation moléculaire peuvent permettre de cribler des monomères afin de sélectionner ceux conduisant à une énergie d'interaction forte. La majorité des études ayant eu recours à cette approche décrit la sélection, par ce biais, d'un nombre restreint de monomères qui sont par la suite mis en œuvre dans des synthèses. Il s'avère en effet important de vérifier la présence de cavités spécifiques affines pour l'empreinte car la forme de celles-ci dépend du ratio monomères/agent-réticulant, de la nature de ce dernier et de la nature et de la quantité de solvant, soit d'un ensemble de paramètres non modélisables [3]. Aussi, il est souvent nécessaire de cribler différentes conditions de synthèse et d'évaluer chaque MIP produit pour sa capacité à retenir fortement et sélectivement la molécule ciblée.

Principe de l'extraction sélective sur MIP

Comme illustré en *figure 2A*, pour les utiliser comme support d'extraction, les polymères à empreintes moléculaires se présentent sous la forme de particules (25-100 μm) qui peuvent être introduites entre deux frittes dans un réservoir de polypropylène, appelé cartouche. Ils sont utilisés comme un support conventionnel dans un procédé d'extraction sur phase solide selon un processus s'apparentant à de la chromatographie (*figure 2A*) [4]. Après conditionnement des particules de MIP par un solvant, l'échantillon est ensuite percolé sur le support, étape au cours de laquelle les cavités du MIP doivent assurer la rétention de la molécule cible. Après une étape de lavage permettant d'éliminer des molécules faiblement retenues à la surface du polymère, les molécules cibles sont éluées du support par un solvant capable de rompre les interactions spécifiques établies entre celles-ci et les cavités conduisant à l'obtention d'un extrait purifié et donc à une analyse facilitée de celui-ci. Il est également possible de réaliser cette étape d'extraction sur MIP en mode dispersif (*figure 2B*) [1]. Dans ce cas, une quantité donnée de particules est dispersée dans l'échantillon et, après un temps d'équilibre à optimiser, les particules ayant piégé les molécules ciblées sont récupérées pour être remises dans un solvant capable de rompre les interactions molécules-cavités, les molécules désorbées étant ensuite analysées. Si les étapes de séparation

entre les phases liquides et les particules de MIP peuvent se faire par une étape de centrifugation ou filtration, cette séparation est facilitée *via* l'utilisation d'aimant si le MIP a été développé sous forme de film à la surface de particules magnétiques [5].

Contrôle de la sélectivité des MIP et développement de la procédure d'extraction

La sélectivité du MIP vis-à-vis de la molécule ciblée résulte de cavités spécifiques dont la présence peut être évaluée par différentes méthodes. Elles consistent généralement à étudier les interactions entre la molécule cible (ou son analogue pris comme empreinte) et le MIP dans un solvant proche de celui utilisé lors de la synthèse afin de favoriser les interactions qui ont eu lieu lors de cette étape. Ces études sont généralement menées en parallèle sur un polymère non imprimé (NIP), qui est obtenu en appliquant la même procédure de synthèse en l'absence de l'empreinte. Le NIP possède donc les mêmes fonctionnalités chimiques que le MIP mais désordonnées à la surface sans posséder de cavités spécifiques. Par conséquent, la nature des interactions développées entre l'analyte cible et les deux supports est la même, mais, si des cavités bien définies ont été créées pendant la polymérisation, la force de ces interactions est plus élevée sur le MIP que sur le NIP car l'analyte cible peut être retenu par différents points (soit une somme d'interactions) en raison de la complémentarité spatiale entre l'analyte cible et les groupements fonctionnels (résidus de monomères) dans les cavités.

La présence de cavités dans le MIP, soit le succès de la synthèse, peut donc être évaluée *via* des tests de mise à l'équilibre d'une solution contenant l'empreinte et d'une quantité donnée de particules de MIP ou de NIP de manière similaire à l'extraction en mode dispersif décrit en *figure 2B* [6]. Ces tests sont souvent réalisés dans un milieu proche du solvant de synthèse pour favoriser des interactions similaires à celles mises en œuvre lors de la formation des cavités. Une fois le système à l'équilibre, la quantité de molécule empreinte adsorbée est déduite de la détermination de la teneur qui reste en solution. La quantité adsorbée sur le MIP est ensuite comparée à la quantité adsorbée sur le NIP, le nombre de cavités étant corrélé à la différence entre les quantités adsorbées sur ces deux supports.

La présence de cavités peut également être évaluée par chromatographie d'élution en injectant la molécule empreinte sur deux colonnes remplies de particules de MIP et de NIP respectivement, et en mesurant sa rétention sur chacune des colonnes. Le rapport entre les facteurs de rétention obtenus sur MIP et sur NIP permet de calculer le facteur d'impression (IF) pour une phase mobile donnée [7] qui doit être bien supérieur à 1. La nature de cette phase mobile régit la nature et la force des interactions impliquées dans le processus de rétention de l'empreinte, son choix est donc très important et est souvent également proche du solvant de synthèse. Des mesures de rétention chromatographique dans différentes conditions peuvent également être utiles pour déterminer les principaux facteurs (pH, nature du solvant...) affectant la rétention et la sélectivité (différence de rétention entre le MIP et le NIP, qui doit être la plus grande possible). Ces conditions peuvent ensuite être transposées à la procédure d'extraction à développer pour atteindre une sélectivité optimale.

Si le but est d'utiliser le MIP comme support sélectif d'extraction en cartouche (*figure 2A*), il est également possible de vérifier la présence de cavités en étudiant les profils de rétention de la molécule ciblée au cours d'un procédé d'extraction appliqué en parallèle sur chacun des deux supports, MIP et NIP. La procédure doit être basée sur l'utilisation d'un solvant proche du solvant de synthèse pour l'étape de percolation (en le dopant avec la molécule d'intérêt) et/ou l'étape de lavage. Il doit posséder une force d'élution suffisamment faible pour permettre la rétention sélective de l'analyte dans les cavités du MIP, et suffisamment élevée pour perturber les interactions qui peuvent avoir lieu entre la molécule et les monomères résiduels situés en dehors des cavités. Cela signifie que la procédure doit être optimisée afin de définir la nature des solvants de percolation et de lavage capable d'éliminer les interactions de faible énergie à la surface sans rompre les interactions spécifiques qui ont lieu dans les cavités et qui sont censées avoir une énergie plus forte en raison de la reconnaissance spatiale. Appliquer la procédure d'extraction en parallèle sur le NIP constitue un moyen simple d'évaluer la force de l'interaction générée par les monomères résiduels situés à la surface des polymères.

À titre d'exemple, la *figure 3* compare les profils de rétention de la chlordécone (CLD) sur un MIP synthétisé à partir d'un analogue de celle-ci et sur le NIP correspondant après percolation d'un échantillon d'acétonitrile (ACN) dopé par de la CLD [8]. Ce profil a été obtenu en analysant la teneur en CLD dans les différentes fractions. Le solvant de percolation, l'acétonitrile dopé par de la CLD, est également le solvant ayant été utilisé pour la synthèse du MIP. Il favorise donc la rétention en recréant des interactions similaires à celles développées au cours de la synthèse. Dans cet exemple, l'utilisation d'une faible teneur de méthanol dans la fraction de lavage a permis d'éliminer la CLD du NIP alors qu'elle est retenue jusqu'à l'étape d'élution sur le MIP. Cela démontre une plus forte rétention de la CLD sur le MIP que sur le NIP et prouve donc la présence de cavités et leur contribution dans le mécanisme de rétention sélectif sur le MIP.

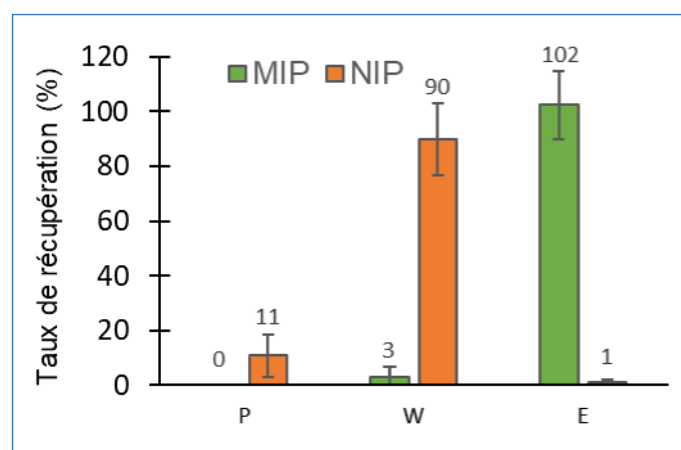


Figure 3 - Profils SPE de la chlordécone (CLD) avec la procédure d'extraction optimisée sur le MIP et le NIP (n=3). Percolation (P) : 1 mL de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CLD dans CH_3CN ; lavage (W) : 1 mL $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}$, 95/5, v/v; Elution (E) : 3 mL CH_3OH . Adapté de [8].

Nos travaux portent depuis quelques années sur l'étude du potentiel des MIP pour extraire des molécules de tailles et de polarités variées. Ces travaux sont résumés dans le *tableau 1*. Si, dans la grande majorité des cas, différentes conditions de

Tableau I - Exemple de développement de MIP pour l'extraction sélective de molécules ou d'ions d'échantillons complexes.

Molécule cible	Échantillon ciblés	Monomères	Agent réticulant	Solvant	Ref.
Polymérisation par voie Sol-gel					
Explosifs nitrés	Huile de moteur, sang post-mortem, fragments calcinés	PTMS	TEOS	H ₂ O	[9,11]
Muscs nitrés	Eaux	PTMS	TEOS	H ₂ O	[12]
Monocrotophos	Huile d'amande	APTES	TEOS	H ₂ O	[13]
BMAA	Cyanobactéries	APTES	TEOS	EtOH/H ₂ O	[10]
Polymérisation radicalaire					
Triazines	Eaux	MAA	EGDMA	CH ₂ Cl ₂	[14]
Alfuzozine	Plasma	MAA	EGDMA	CH ₂ Cl ₂	[15]
PMPA	Sol	MAA	TRIM	CH ₃ CN	[16]
Zidovudine	Sérum	MAA	EGDMA	CH ₂ Cl ₂	[17]
LSD	Cheveux, urine	MAA	EGDMA	CH ₃ CN	[18]
Ephédrine	Plasma	MAA	EGDMA	CHCl ₃	[19]
Cocaïne	Cheveux, urine	MAA	EGDMA	CH ₃ CN	[20,21]
Estradiol	Urine	MAA	EGDMA	CH ₃ CN	[22]
Monocrotophos	Huile d'amande	MAA	EGDMA	CH ₂ Cl ₂	[23]
Carbamazépine	Urine	MAA	DVB	CH ₂ Cl ₂ /toluène	[24]
p-[18F]MPPF	Plasma	MAA	EGDMA	CH ₂ Cl ₂	[25]
Oxazépam	Eaux, urine	MAA	EGDMA	CH ₂ Cl ₂ /Toluène	[26]
Chlordécone	Sérum	4-VP	EGDMA	CH ₃ CN	[8]
Ln ³⁺	Eaux	MAA/4-VP	EGDMA	CH ₃ CN	[27,28]
Cu ²⁺	Eaux	MAA	EGDMA	CH ₃ CN	[29]
Ra ²⁺	Eaux	VPA/Styrène	DVB	CH ₃ CN/DMSO	[30]

APTES : 3-(aminopropyl)triéthoxysilane; BMAA : β -N-méthylamino-L-alanine; DVB : divinylbenzène ; EGDMA : diméthylacrylate d'éthylène glycol ; LSD : acide lysergique diéthylamide ; MAA : acide méthacrylique ; PMPA : acide pinacolyl méthylphosphonique ; PTMS : phényltriméthoxysilane ; TEOS : tétraéthoxysilane ; TRIM : triméthylolpropane triméthacrylate ; 4-VP : 4-vinylpyridine ; VPA : acide vinylphosphonique.

synthèse ont été criblées, les conditions retenues consistent majoritairement à utiliser l'acide méthacrylique (MAA) associé au diméthylacrylate d'éthylène glycol (EGDMA) dans des solvants modérément polaires et non protiques, favorisant ainsi les interactions polaires telles que les liaisons H. Néanmoins, récemment, pour l'étude de la CLD, nous avons montré que le MAA n'était pas adapté à la synthèse d'un MIP sélectif puisqu'il conduit à une rétention forte et similaire de la CLD sur le MIP et le NIP. L'utilisation de la 4-vinylpyridine comme monomère fonctionnel pour la synthèse a dans ce cas permis d'obtenir un MIP sélectif comme illustré *figure 3*.

Des synthèses par voie sol-gel ont également été mises en œuvre notamment pour la synthèse de supports visant des molécules dont les groupements nitro inhibaient la polymérisation par voie radicalaire [9]. Ces synthèses basées sur l'hydrolyse puis la condensation d'organosilanes et donc effectuées en milieu aqueux se sont également avérées parfaitement adaptées à la synthèse de supports imprimés pour des molécules polaires peu solubles dans les solvants de type ACN ou dichlorométhane telles que la β -N-méthylamino-L-alanine (BMAA) [10].

Potentiel des MIP pour l'analyse de traces dans des échantillon réels

Comme dans le cas de l'étude sur la CLD, il a été largement démontré pour diverses molécules qu'un MIP offre une sélectivité maximale lorsque les molécules d'intérêt sont dissoutes dans le solvant utilisé pour la synthèse du MIP puisqu'il est alors capable de recréer des interactions similaires à celles établies lors de celle-ci. Ainsi, lors de l'utilisation d'un MIP comme support d'extraction de molécules présentes à l'état de traces dans des échantillons réels, il est important de tenter de recréer ces interactions lors de la percolation de l'échantillon pour avoir à la fois une bonne rétention et une bonne sélectivité. Cependant, dans la plupart des cas, les échantillons liquides réels (fluides biologiques, boissons, eaux environnementales...) ou les extraits d'échantillons solides (céréales, café, sols...) sont aqueux ou contiennent une grande quantité d'eau, ce qui rend difficile l'établissement direct d'interactions similaires à celles mises en œuvre lors de la synthèse en solvant. Dans ce cas, la rétention de l'analyte cible est souvent assurée par des interactions non spécifiques au cours de l'étape de percolation de l'échantillon et c'est par le choix raisonné du solvant de lavage que la rétention sélective,

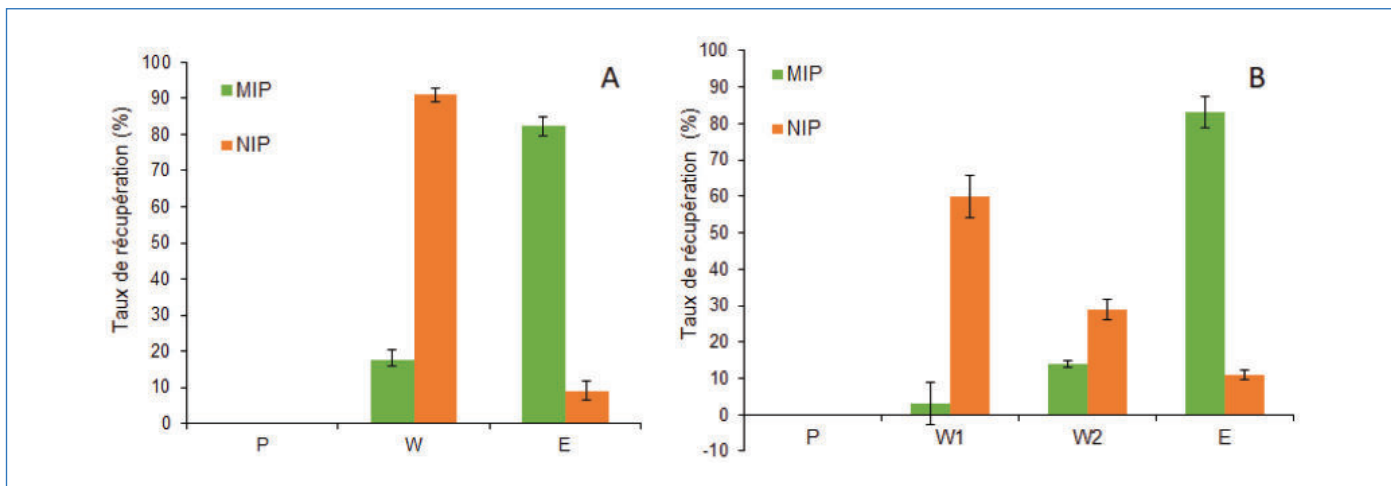


Figure 4 - Profils d'élution du LSD obtenus sur le MIP et le NIP après percolation (A) de 1 mL de ACN dopé avec 200 ng de LSD (P), lavage par 1 mL de CH₃CN/CH₃OH (92:8 v/v) (W) et élution par 3 mL CH₃OH (E) ou (B) de 1 mL d'urine (pH 5,5) dopée avec 200 ng de LSD (P), lavage par 1 mL CH₃CN (W1) puis 1 mL CH₃CN/CH₃OH (95:5 v/v) (W2) et élution : 2 mL CH₃OH (E) ; n = 3. Adapté de [18].

mettant à contribution les cavités, est assurée. Un exemple concernant l'extraction sélective du LSD d'un échantillon d'acétonitrile (A) puis d'urine (B) dopé est présenté en figure 4.

L'application du MIP à l'extraction sélective du LSD du milieu aqueux a conduit dans ce cas à adapter les conditions de percolation (en recherchant le pH permettant d'assurer une rétention optimale) et de lavage de manière à assurer le maintien de la sélectivité comme illustré en figure 4A. C'est effectivement par l'introduction de deux étapes de lavage avec des compositions différentes de l'étape de lavage effectuée en milieu pur (figure 4A) qu'il a été possible d'éliminer le LSD du NIP tout en assurant sa rétention sur le MIP jusqu'à l'étape d'élution.

Cet exemple montre que, outre le fait qu'il soit nécessaire de cribler les conditions de synthèse, il est également nécessaire d'optimiser finement la procédure d'extraction pour atteindre la sélectivité optimale pour chaque nature d'échantillons afin de tirer profit du MIP en vue de l'obtention d'extraits purifiés. Cela implique de maîtriser et d'exploiter les interactions pouvant s'établir entre les cavités du MIP et la molécule cible tout en tenant compte de la nature de l'échantillon dont la composition peut affecter le processus de rétention.

Cet exemple montre également la répétabilité des rendements d'extraction en milieu complexe et donc la fiabilité de ces supports appliqués à des échantillons complexes. Même si leur coût de développement peut être plus élevé que celui des supports conventionnels, leur principal avantage est que l'extraction et la purification sont effectuées à l'aide d'une seule cartouche. Ainsi, ce coût doit être comparé à celui résultant de l'utilisation de deux cartouches de SPE, l'une pour l'extraction puis l'autre pour mettre en œuvre une étape de purification supplémentaire, ou de la combinaison d'une extraction liquide-liquide et d'un « nettoyage » SPE, qui nécessitent tous deux la mise au point fastidieuse de deux procédures d'extraction différentes.

Comme mentionné précédemment, l'amélioration de la sélectivité a été principalement démontrée en comparant les chromatogrammes obtenus en utilisant le MIP nouvellement développé avec les chromatogrammes résultant des procédures d'extraction conventionnelles. Ces comparaisons illustrent souvent le fort apport du MIP comparé aux supports

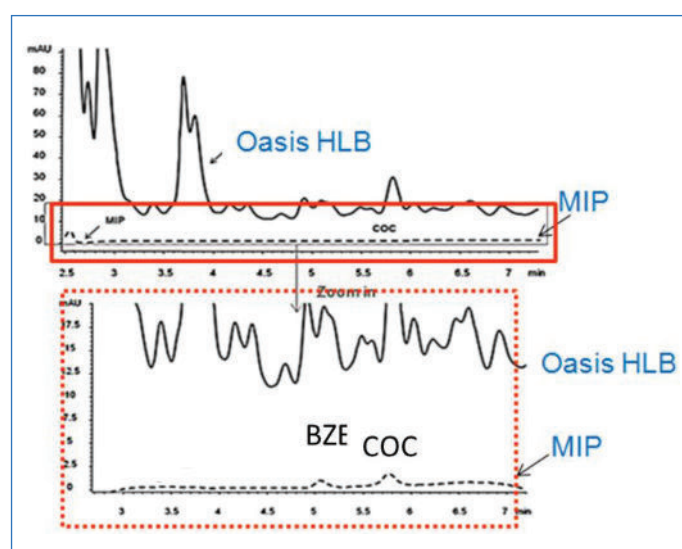


Figure 5 - Chromatogrammes LC/UV correspondant à l'injection de la fraction d'élution issue de l'utilisation d'un support Oasis HLB et d'un MIP utilisés pour l'extraction de la cocaïne (COC) et de son métabolite, la benzoylecgonine (BZE), d'un échantillon d'urine dopé (50 ng/ml). Adapté de [21].

conventionnels comme en témoigne celle présentée en figure 5. Le zoom du chromatogramme montre l'important apport en sélectivité du MIP par rapport à un support classique, Oasis HLB ici, qui permet l'élimination de tous les interférents élués au voisinage des deux composés d'intérêt, la cocaïne et son métabolite urinaire, la benzoylecgonine. Aujourd'hui, l'utilisation de détecteurs sensibles tels que les spectromètres de masse conduit à injecter de plus faibles volumes d'échantillon limitant par voie de conséquence l'injection de grandes quantités d'interférents sur la colonne chromatographique. Cependant, si leur apport en spécificité est également indéniable pour l'identification des composés d'intérêt, leur potentiel de quantification des composés cibles dans des échantillons réels reste affecté par des effets de matrices pouvant modifier l'ionisation du composé d'intérêt (lors de sa potentielle co-élution avec d'autres composés lors de l'étape de séparation). L'utilisation de MIP en amont de la séparation chromatographique permet, grâce à la purification préalable, de supprimer ces effets de matrices. Les composés d'intérêt peuvent ainsi être quantifiés par un étalonnage externe en milieu pur sans recourir à un étalonnage interne

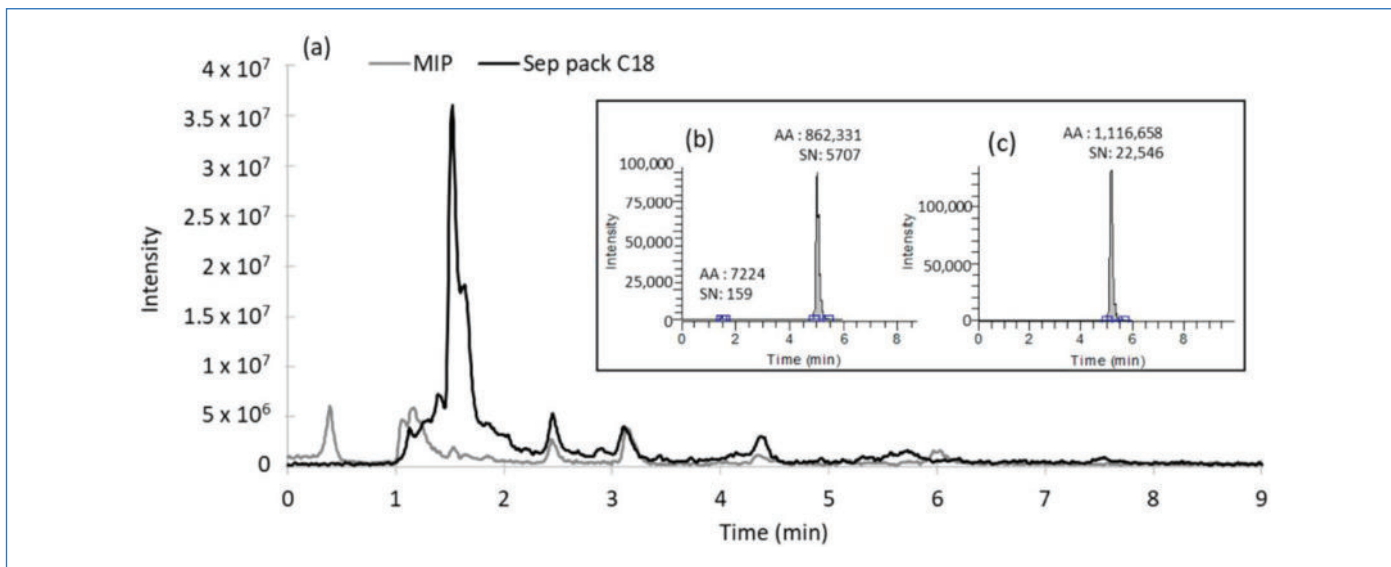


Figure 6 - Chromatogrammes LC-MS obtenus en mode balayage (m/z 100-1000) pour l'analyse de la fraction d'élution obtenue après percolation de 0,5 mL de l'extrait de sérum bovin dopé à 10 $\mu\text{g/L}$ avec la CLD sur MIP (ligne grise) et sur support C18 hydrophobe conventionnel (ligne noire). L'insert correspond aux chromatogrammes obtenus en sélectionnant les ions (mode MRM) pour la CLD (m/z : 506.7 \rightarrow 426.7) de la fraction d'élution issue du support C18 (b) et du MIP (c) [8].

en matrice et de gagner en sensibilité (abaissement du bruit de fond lié au gain en sélectivité). Nos travaux ont démontré cela à de nombreuses reprises [8, 10, 24, 26] et un exemple est donné en *figure 6*. Outre l'obtention d'un chromatogramme contenant moins de constituants de la matrice, il apparaît que le rapport signal/bruit obtenu *via* une approche de détection spécifique en sélectionnant les ions (mode MRM, *multiple reaction monitoring*) après utilisation du MIP est beaucoup plus élevé pour l'analyse de la CLD dans le sérum bovin que lors de l'utilisation d'un support de silice greffée C18 hydrophobe conventionnel. Cela permet donc un gain en sensibilité d'un facteur 4 ainsi qu'un encrassement moins important de la colonne de chromatographie et de la source d'ionisation du spectromètre.

Extraction sélective par famille

Si, dans les exemples précédents, l'objectif était de développer un support très spécifique pour une molécule donnée ainsi qu'un métabolite, il est également possible d'orienter la synthèse vers un choix de molécule empreinte conduisant à un MIP capable de piéger plusieurs analogues structuraux comme cela a pu être fait au LSABM pour des familles de pesticides tels que des triazines ou des organophosphorés [13-14-23]. Pour assurer cette capacité à reconnaître plusieurs composés simultanément, des groupes ont également proposé d'introduire plusieurs molécules empreintes au moment de la synthèse pour extraire ensuite ces molécules simultanément avec un seul MIP. Cette approche a notamment été reportée pour l'extraction d'un grand nombre de triazines [31] ou de nitrosamines [32].

Vers de nouvelles cibles

L'utilisation de MIP pour l'extraction sélective de molécules cibles a largement fait ses preuves comme en témoigne aujourd'hui la commercialisation de MIP en cartouches pour l'extraction sélective de nombreux contaminants. On peut notamment mentionner la commercialisation de nombreux supports pour l'analyse de toxines dans les aliments. À titre

d'exemple, la société Merck et R-Biopharm proposent des MIP pour la patuline et la société Affinisep fournit des MIP pour plusieurs mycotoxines pour les extraire soit individuellement soit simultanément. Ainsi, si le développement de MIP pour l'extraction sélective de petites molécules a d'ores et déjà été largement étudié, des efforts portent aujourd'hui sur des approches permettant l'impression de protéines, ce qui implique des synthèses en milieux majoritairement aqueux en recourant à des nouveaux monomères comme la mélanine et le résorcinol ou à l'impression par voie sol-gel [1].

Nous explorons quant à nous, depuis quelques années, la possibilité de développer des supports capables d'extraire sélectivement des ions inorganiques. Compte tenu de la faible stabilité des supports à base de silice aux conditions de pH très acides susceptibles d'être appliquées sur les supports, nous avons privilégié une synthèse par polymérisation radicalaire de réactifs organiques. De nombreuses conditions de synthèse ont dûes être criblées afin d'identifier des monomères adaptés avec l'aide notamment de mesures par conductimétrie et par spectrométrie de masse [33]. Le choix du solvant de synthèse s'est avéré également complexe au regard de la faible solubilité des ions dans les solvants organiques. Néanmoins, des résultats très intéressants en termes de sélectivité ont d'ores et déjà pu être obtenus pour l'extraction sélective des ions lanthanides [27-28], cuivre [29] et radium [30] présents à l'état de traces dans des eaux réelles *via* ces supports à empreintes ioniques (IIP, *ion imprinted polymer*).

Vers des systèmes miniaturisés

La miniaturisation des dispositifs analytiques entraîne une augmentation de la sensibilité de l'ensemble de la méthode analytique. À ce titre, en chromatographie en phase liquide, l'amélioration de la sensibilité pour un composé est en théorie inversement proportionnelle au carré du diamètre de la colonne soit un gain pouvant théoriquement atteindre un facteur 3700 en passant de colonnes conventionnelles de 4,6 mm à des colonnes capillaires de 75 μm de diamètre

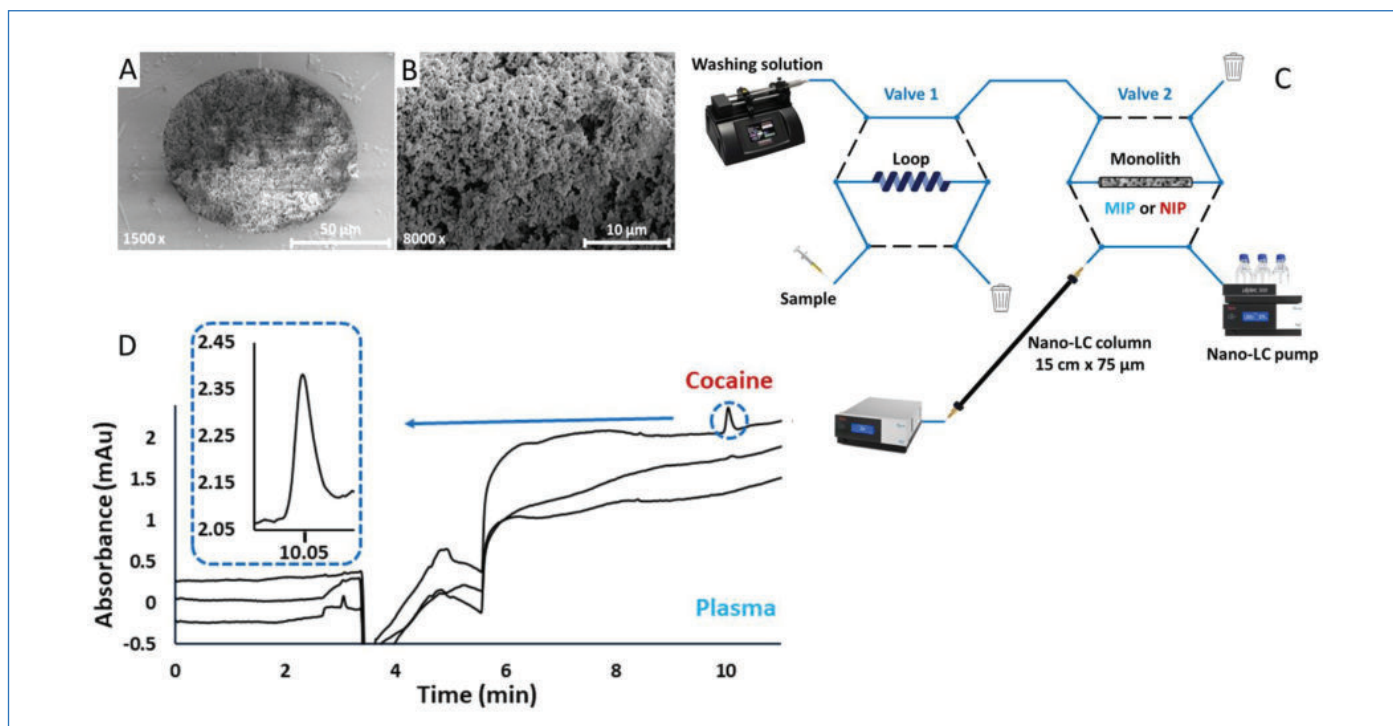


Figure 7 - Images obtenues en microscopie électronique à balayage de la section transversale d'un capillaire de 100 μm de diamètre interne contenant un monolithe de MIP (A, B). Configuration du couplage en ligne du MIP ou du NIP (50 mm × 100 μm) avec la nanoLC-UV (C). Chromatogrammes obtenus après l'extraction sur le MIP (en haut) et le NIP (au milieu) de 50 nL de plasma dopé avec de la cocaïne (équivalent à 100 ng/mL dans le plasma) comparés au plasma non dopé (en bas) extrait sur le MIP (D). Adapté de [35].

interne, même si ce gain n'est que théorique car des contraintes technologiques demeurent. La miniaturisation offre aussi la possibilité de travailler sur des volumes très réduits d'échantillons, ce qui est primordial pour l'analyse d'échantillons disponibles en faibles quantités, et de diminuer du même ordre de grandeur la consommation de solvant. Cependant, pour être optimaux, les dispositifs de séparation miniaturisés doivent être associés à des dispositifs d'extraction également miniaturisés. En outre, la miniaturisation du dispositif de séparation est souvent associée à la réduction de la longueur de séparation, ce qui entraîne une perte de résolution chromatographique qui peut être compensée par l'utilisation, lors de l'étape de prétraitement de l'échantillon, de supports tels que les MIP afin de réduire la complexité des extraits analysés. C'est pourquoi la miniaturisation des MIP présente un grand intérêt. De plus, elle entraîne une diminution de la quantité de molécule empreinte nécessaire à leur synthèse, réduisant ainsi aussi le coût de la méthode finale d'analyse.

Pour les grands formats, l'introduction de particules de MIP dans une cartouche ne nécessite que des frittés pour maintenir celles-ci. Pour les capillaires de 75-100 μm de diamètre interne ou les canaux de micropuces, des frittés peuvent être synthétisés mais leur préparation est fastidieuse. C'est la raison pour laquelle il est intéressant de procéder à la synthèse *in situ* de monolithes de MIP formés directement au sein du capillaire et ancrés à la surface du capillaire ou du canal par activation préalable de celle-ci. Il convient alors de déterminer les conditions de polymérisation permettant d'obtenir un monolithe à la fois suffisamment perméable, pour permettre la percolation des solutions sans générer une forte contre-pression, et possédant des cavités spécifiques, deux propriétés qui résultent de compromis notamment sur le choix du solvant de synthèse.

Des monolithes de MIP ont été synthétisés pour la première fois *in situ* par Schweitz *et al.* pour constituer une phase stationnaire de séparation en électrochromatographie capillaire (CEC) [34]. Ensuite, des monolithes de MIP ont également été synthétisés à des fins d'extraction. On peut par exemple citer l'exemple d'un monolithe de MIP qui a été synthétisé dans un capillaire (voir *figure 7A-B*) puis connecté à un système de nanochromatographie en phase liquide (nanoLC) (*figure 7C*) pour extraire de la cocaïne d'un échantillon de plasma humain (*figure 7D*) [35]. Comme l'illustrent les chromatogrammes de la *figure 7D*, la ligne de base très propre obtenue avec le MIP et l'absence de rétention de la cocaïne par le NIP mettent en évidence la haute sélectivité apportée par le MIP. Ceci a permis de déterminer facilement la cocaïne avec une limite de quantification de 14,5 ng/mL avec une détection UV et en injectant seulement 100 nL de plasma dilué. L'ensemble de l'analyse a conduit à une consommation de solvant de l'ordre du microlitre.

Vers des outils moins coûteux et pour une chimie analytique plus verte

Au regard de ces résultats et en considérant aujourd'hui la commercialisation de nombreux supports par différentes sociétés, la preuve du potentiel des MIP comme supports d'extraction sélective de molécules ciblées à partir d'échantillons complexes n'est plus à faire. Ils permettent le piégeage sélectif de molécules aux propriétés physico-chimiques très variées. Les résultats récents obtenus pour les protéines, cibles particulièrement étudiées à l'heure actuelle, suggèrent qu'ils constitueront dans un avenir proche une alternative aux anticorps encore largement utilisés dans ce domaine. De même, les résultats obtenus pour l'extraction sélective d'ions sont également très encourageants pour le remplacement à termes des résines existantes coûteuses et qui manquent

de spécificité. Il apparaît également possible de travailler à la mise en œuvre de voies de synthèses plus vertes par l'utilisation notamment de la synthèse par voie Sol-Gel mais aussi en travaillant à leur miniaturisation ce qui conduit à une limitation de la consommation de solvant pour l'ensemble de la procédure analytique quand les MIP sont intégrés en ligne avec l'étape d'analyse.

[1] V. Pichon, N. Delaunay, A. Combès, Sample Preparation Using Molecularly Imprinted Polymers, *Anal. Chem.*, **2020**, *92*, p. 16.

[2] P. Kadirvel, A. Combès, L. Bordron, V. Pichon, Development and application of water-compatible molecularly imprinted polymers for the selective extraction of carbamazepine from environmental waters, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2019**, *411*, 1525.

[3] T. Sajini, B. Mathew, A brief overview of molecularly imprinted polymers: Highlighting computational design, nano and photo-responsive imprinting, *Talanta Open*, **2021**, *4*, 100072.

[4] V. Pichon, Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers, *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1152*, p. 41.

[5] A.L. Capriotti, C. Cavaliere, G. La Barbera, C.M. Montone, S. Piovesana, A. Laganà, Recent applications of magnetic solid-phase extraction for sample preparation, *Chromatographia*, **2019**, *82*, p. 1251.

[6] V. Pichon, K. Haupt, Affinity separations on molecularly imprinted polymers with special emphasis on solid-phase extraction, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2006**, *29*, p. 989.

[7] T. Bouvarel, N. Delaunay, V. Pichon, Molecularly imprinted polymers in miniaturized extraction and separation devices, *J. Sep. Sci. n/a.*, **2021**, *44*, p. 1727.

[8] P. Bosman, A. Combès, M. Lambert, G. Lavison-Bompard, V. Pichon, Development and Application of Molecularly Imprinted Polymers for the Selective Extraction of Chlordecone from Bovine Serum, *Separations*, **2021**, *8*, p. 237.

[9] S. Lordel, F. Chapuis-Hugon, V. Eudes, V. Pichon, Development of imprinted materials for the selective extraction of nitroaromatic explosives, *J. Chromatogr. A*, **2010**, *1217*, p. 6674.

[10] P. Svoboda, A. Combes, J. Petit, L. Nováková, V. Pichon, B. group, Synthesis of a molecularly imprinted sorbent for selective solid-phase extraction of β -N-methylamino-l-alanine, *Talanta*, **2015**, *144*, p. 1021.

[11] S. Lordel, F. Chapuis-Hugon, V. Eudes, V. Pichon, Selective extraction of nitroaromatic explosives by using molecularly imprinted silica sorbents, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, *399*, p. 449.

[12] M. Lopez-Nogueroles, S. Lordel-Madeleine, A. Chisvert, A. Salvador, V. Pichon, Development of a selective solid phase extraction method for nitro musk compounds in environmental waters using a molecularly imprinted sorbent, *Talanta*, **2013**, *110*, p. 128.

[13] S. Boulanouar, A. Combès, M. Mezzache, V. Pichon, Synthesis and application of molecularly imprinted silica for the selective extraction of some polar organophosphorus pesticides from almond oil, *Anal. Chim. Acta*, **2018**, *1018*, p. 35.

[14] F. Chapuis, V. Pichon, F. Lanza, S. Sellergrén, M.-C. Hennion, Optimization of the class-selective extraction of triazines from aqueous samples using a molecularly imprinted polymer by a comprehensive approach of the retention mechanism, *J. Chromatogr. A*, **2003**, *999*, p. 23.

[15] F. Chapuis, J.-U. Mullot, V. Pichon, G. Tuffal, M.-C. Hennion, Molecularly imprinted polymers for the clean-up of a basic drug from environmental and biological samples, *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1135*, p. 127.

[16] S. Le Moullec, A. Bégos, V. Pichon, B. Bellier, Selective extraction of organophosphorus nerve agent degradation products by molecularly imprinted solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1108*, p. 7.

[17] S. Vo Duy, I. Lefebvre-Tournier, V. Pichon, F. Hugon-Chapuis, J.-Y. Puy, C. Périgaud, Molecularly imprinted polymer for the analysis of zidovudine and stavudine in human serum by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **2009**, *877*, 1101.

[18] F. Chapuis-Hugon, M. Cruz-Vera, R. Savane, W.H. Ali, M. Valcarcel, M. Deveaux, V. Pichon, Selective sample pretreatment by molecularly imprinted polymer for the determination of LSD in biological fluids, *J. Sep. Sci.*, **2009**, *32*, p. 3301.

[19] M. Lasáková, D. Thiébaud, P. Jandera, V. Pichon, Molecularly imprinted polymers for the solid-phase extraction of ephedrine and analogs from human plasma, *J. Sep. Sci.*, **2009**, *32*, p. 1036.

[20] V. Thibert, P. Legeay, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon, Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of cocaine and its metabolite benzoylecgonine from hair extract before LC-MS analysis, *Talanta*, **2012**, *88*, p. 412.

[21] V. Thibert, P. Legeay, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon, Molecularly imprinted polymer for the selective extraction of cocaine and its metabolites, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester, from biological fluids before LC-MS analysis, *J. Chromatogr. B*, **2014**, *949-950*, p. 16.

[22] M. Doué *et al.*, Molecularly imprinted polymer applied to the selective isolation of urinary steroid hormones: An efficient tool in the control of natural steroid hormones abuse in cattle, *J. Chromatogr. A*, **2012**, *1270*, p. 51.

[23] S. Boulanouar, A. Combès, S. Mezzache, V. Pichon, Synthesis and application of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of organophosphorus pesticides from vegetable oils, *J. Chromatogr. A*, **2017**, *1513*, p. 59.

[24] A. Combes, P. Kadirvel, L. Bordron, V. Pichon, Synthesis and Characterization of Molecularly Imprinted Polymers for the Selective Extraction of Carbamazepine and Analogs from Human Urine Samples, *Chromatographia*, **2019**, *82*, p. 287.

[25] F. Lecomte *et al.*, Performance evaluation of a MIP for the MISPE-LC determination of p -[^{18}F]MPPF and a potential metabolite in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2020**, *180*, 113015.

[26] F. Varenne *et al.*, Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of oxazepam from complex environmental and biological samples, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2021**.

[27] M. Moussa, V. Pichon, C. Mariet, T. Vercouter, N. Delaunay, Potential of ion imprinted polymers synthesized by trapping approach for selective solid phase extraction of lanthanides, *Talanta*, **2016**, *161*, p. 459.

[28] M. Moussa *et al.*, Selective solid phase extraction of lanthanides from tap and river waters with ion imprinted polymers, *Anal. Chim. Acta*, **2017**, *963*, p. 44.

[29] P. Cao, V. Pichon, C. Dreanno, K. Boukerma, N. Delaunay, Development of ion-imprinted polymers for the selective extraction of Cu(II) ions in environmental waters, *Talanta*, **2023**, *256*, 124295.

[30] M. Boudias, A. Gourgiotis, C. Cazala, V. Pichon, N. Delaunay, Monitoring the benefits of varying the template/monomer proportion in the synthesis of an ion-imprinted polymer for Ra(II) extraction, *Adv. Sample Prep.*, **2023**, *5*, 100049.

[31] S. Wang *et al.*, Dual-template imprinted polymers for class-selective solid-phase extraction of seventeen triazine herbicides and metabolites in agro-products, *J. Hazard. Mater.*, **2019**, *367*, p. 686.

[32] Z. Li, J. Wang, X. Chen, S. Hu, T. Gong, Q. Xian, A novel molecularly imprinted polymer-solid phase extraction method coupled with high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of nitrosamines in water and beverage samples, *Food Chem.*, **2019**, *292*, p. 267.

[33] M. Boudias *et al.*, Screening of synthesis conditions for the development of a radium ion-imprinted polymer using the dummy template imprinting approach, *Chem. Eng. J.*, **2022**, *450*, 138395.

[34] L. Schweitz, L.I. Andersson, S. Nilsson, Capillary electrochromatography with molecular imprint-based selectivity for enantiomer separation of local anaesthetics, *J. Chromatogr. A*, **1997**, *792*, p. 401.

[35] T. Bouvarel, N. Delaunay, V. Pichon, Selective extraction of cocaine from biological samples with a miniaturized monolithic molecularly imprinted polymer and on-line analysis in nano-liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta.*, **2020**, *1096*, p. 89.

Valérie PICHON^{1,2*}, Audrey COMBES¹, Nathalie DELAUNAY¹

¹ Laboratoire de Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation (LSABM), UMR CBI 8231 CNRS - ESPCI Paris, PSL Université, ESPCI, Paris.

² Sorbonne Université, Paris.

*valerie.pichon@espci.fr