

# Une double approche analytique pour l'extraction sélective de traces de polluants organiques

## Immunoadsorbants et polymères à empreintes moléculaires

Valérie Pichon, Florence Chapuis, Marie-Claire Hennion

**Résumé** L'analyse de traces de micropolluants organiques présents dans les matrices environnementales nécessite des méthodes de séparation et de détection performantes. Il en est de même pour l'étape préalable de traitement de l'échantillon. De faibles limites de détection sont souvent difficiles à atteindre en raison de la co-élution des analytes recherchés avec des composés interférents. En effet, les méthodes d'extraction conventionnelles sont basées sur l'utilisation de supports hydrophobes adaptés à l'extraction de composés d'échantillons aqueux ou de solvants organiques utilisés pour le traitement des échantillons solides (sols, sédiments, végétaux...) qui conduisent à la co-extraction de composés de polarité similaire à celle des analytes ciblés. Des supports d'immunoaffinité basés sur l'utilisation d'anticorps spécifiques des analytes recherchés peuvent alors être utilisés pour l'extraction directe d'une famille de polluants d'échantillons aqueux ou pour la purification d'extraits issus du traitement d'échantillons solides. La grande sélectivité de l'interaction antigène-anticorps permet alors d'atteindre des limites de détection en accord avec la réglementation en vigueur pour les différents domaines d'application. Cependant, le coût et le temps nécessaires à la production d'anticorps ont récemment conduit à l'émergence d'une technique alternative basée sur la synthèse de polymères hautement réticulés possédant des cavités spécifiques d'une molécule modèle. Ces polymères à empreintes moléculaires possèdent des propriétés comparables à celles des immunoadsorbants en terme de sélectivité avec, en plus, l'avantage d'un coût de développement réduit et d'une plus grande stabilité thermique et chimique.

**Mots-clés** Immunoadsorbants, polymères à empreintes moléculaires, sélectivité, traitement de l'échantillon.

**Summary** **A dual analytical approach for the selective extraction of organic pollutants in environmental matrices: immunosorbents and molecularly imprinted polymers**

The trace-level determination of micropollutants in environmental matrices requires high performance from analytical separation and detection as well as from the sample preparation technique. Low detection limits are difficult to obtain owing to many interfering compounds co-eluted with the target analytes because they are co-extracted by non-selective reversed-phase sorbents used for the solid-phase extraction of aqueous samples or by organic solvents used for the treatment of solid matrices. Immunoaffinity sorbents based on the use of antibodies that are specific of the target analytes can be applied to the direct extraction of a group of structurally related pollutants from liquid samples or to the purification of extracts (resulting of solvent based extraction methods applied to solid matrices). The high selectivity of the antigen-antibody interaction allows reaching the detection limits according to the regulatory guidelines in the various studied matrices. However, the production of antibodies is time consuming and cost effective. An alternative SPE method is emerging that consists in synthesizing highly cross-linked polymers that possess cavities that are specific of a particular molecule. These molecularly imprinted polymers possess properties that can be directly compared to those of immunosorbents with the advantage of being very stable and less cost effective.

**Keywords** Immunosorbents, molecularly imprinted polymers, selectivity, sample pre-treatment.

Un grand effort a porté ces dernières années sur le développement de supports d'extraction et de purification comme en témoigne la liste des adsorbants actuellement commercialisés. Cependant, si l'on dispose actuellement de supports performants pour extraire et concentrer la grande majorité des polluants recherchés dans l'environnement, ces supports mettent principalement en œuvre des interactions

de nature hydrophobe. De ce fait, ils ne permettent pas d'atteindre des facteurs d'enrichissement suffisants pour les composés très polaires. De plus, ils peuvent conduire à la co-extraction d'un grand nombre de composés de polarité similaire à celle des polluants recherchés, rendant ainsi leur analyse chromatographique difficile d'un point de vue quantitatif.

Ce problème d'interférences existe pour l'analyse environnementale lorsque l'on applique ces méthodes à des échantillons d'eaux fortement contaminées (eaux de surface, eaux de rejets industriels). Il est également rencontré pour les échantillons d'origine biologique et alimentaire qui nécessitent systématiquement le développement d'étapes de lavage (impliquant alors une forte rétention des analytes recherchés sur l'adsorbant pour qu'ils ne soient pas élués au cours de cette étape) ou l'introduction de procédures supplémentaires de purification. Ces interférences sont particulièrement présentes lorsqu'il s'agit d'analyser des extraits issus du traitement de matrices solides par un solvant (après extraction en Soxhlet, sous champs micro-ondes, sous pression...).

Il semble donc intéressant, voire nécessaire, de développer des supports mettant en œuvre des interactions plus sélectives comme celles induites dans des mécanismes de reconnaissance moléculaire. Pour cela, deux voies sont possibles. L'une est biologique et consiste à utiliser des supports greffés par des anticorps spécifiques des polluants recherchés appelés immuno-adsorbants. L'autre est chimique et consiste à synthétiser un polymère autour de molécules empreintes. L'élimination de ces molécules après polymérisation libère alors des cavités qui auront une complémentarité stérique et fonctionnelle avec la molécule prise comme modèle. Ce polymère dit à empreintes moléculaires (MIP : « molecular imprinted polymer ») et ces immuno-adsorbants peuvent alors être utilisés pour l'extraction sélective d'analytes de matrices complexes.

L'utilisation des MIP comme support d'extraction est beaucoup plus récente que celle des immuno-adsorbants. Beaucoup de travaux sur ces derniers ont permis de bien appréhender les mécanismes de rétention et les différents paramètres pouvant affecter les résultats. De ce fait, de nombreuses méthodes d'immunoextraction ont pu être validées avec succès. Les MIP ont pour avantage d'être obtenus par voie chimique et donc avec un coût de développement et de production moindre comparé à la synthèse biologique nécessaire à l'obtention des immuno-adsorbants. Cependant, comme pour toute technique émergente, il convient d'approfondir les mécanismes engendrés sur ces supports polymères pour les appliquer sans risque à des domaines très divers.

## Les immuno-adsorbants

### Principe

L'emploi d'anticorps comme réactif analytique n'est pas récent dans le domaine médical et biologique, à la différence du domaine environnemental pour la recherche de micropolluants. L'une des raisons réside dans la difficulté de produire des anticorps très spécifiques de molécules de petite

taille. Les mammifères ne développant pas de réponse immunitaire envers ces molécules, il est nécessaire de coupler la molécule antigène choisie à une protéine porteuse, ce qui impose souvent de la modifier au préalable par l'introduction d'un groupement fonctionnel.

Dans le cas des molécules de petite taille possédant de ce fait peu de groupements caractéristiques, la probabilité pour que les anticorps ainsi produits reconnaissent d'autres composés de structure voisine est assez grande. C'est ce qu'on nomme la réactivité croisée des anticorps. Cette propriété est un avantage puisque dans le cas de la recherche de polluants, on est souvent amené à rechercher de nombreux composés d'une même famille en incluant éventuellement des métabolites. L'utilisation de ces supports a fait l'objet de nombreuses revues [1-4] et un grand nombre d'exemples reportés dans la littérature durant ces dernières années sont cités dans le *tableau 1*.

Tableau 1 - Immuno-adsorbants appliqués à divers micropolluants recherchés dans des matrices variées.

2-4-D : acide 2,4-dichlorophénoxyacétiques ; BTEX : benzène, toluène, éthylbenzène, xylène ; HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques.  
CPG : chromatographie en phase gazeuse ; CPL : chromatographie en phase liquide ; EC : électrophorèse capillaire ; ELISA : test immunoenzymatique ; Fluo : détection par fluorescence ; IF : détecteur à ionisation de flamme ; SM : spectrométrie de masse ; TI : détecteur thermo-ionique.

Analytes	Matrices	Analyses	Références
Acide okadaïque	Moules, algues	CPL/SM, /UV, /Fluo	5-6
Amines aromatiques	Eaux, effluents	CPL/UV	7-9
Bisphénol A, phénol	Sérum	CPL/Fluo	10
BTEX	Eaux	CPL/SM	11
Carbendazime	Sols, eaux	CPL/SM	12
Déoxynivaléol	Blé	CPL/UV	13
2,4-D	Tampon phosphate	CPL/UV	14
Diazinon	Eaux	CPL, ELISA	15
Imazalil	Agrumes	CPL	16
Microcystines	Eaux	CPL/UV, /SM, EC	17-21
	Algues	CPL/UV, EC	20-22
	Poissons	CPL/UV	22
Nitroaromatiques	Tampon	ELISA	23
HAP et métabolites	Air, particules, urines	CPL/Fluo, CPG/SM	24
	Coraux	CPG/SM, ELISA	25
HAP	Sédiments, sols, boues	CPL/UV	9, 26-30
	Eaux	CPL/UV, /Fluo, CPG/SM	9, 27, 29-31
	Moules	CPL/UV, Fluo	29
Ochratoxine A	Céréales	CPL/Fluo	32
Phénylurées	Eaux	CPL/UV, SM	9, 27, 33-36
	Sols	CPL/UV	27, 36-37
	Urines	CPL/UV	37
	Végétaux	CPL/UV	38
Phénylurées et triazines	Eaux	CPL/UV	9, 27
Sulfonylurées	Sols	ELISA	39
Thi-fluzamide	Cacahuètes	CPL/UV	40
Triazines (et métabolites)	Eaux, sols	CPL/UV CPG/ TI	9, 26-27, 36, 41 42
	Eaux	CPG/IF	43
Triazines	Végétaux	CPL/UV	44
Zéaralénone	Céréales	CPL/Fluo	32

### Synthèse et principe d'utilisation d'un immunoadsorbant

La première étape de synthèse d'un immunoadsorbant consiste en la production des anticorps. Pour cela, il faut sélectionner un composé représentatif de la famille ciblée, l'antigène, qui sera pris comme modèle pour produire les anticorps. Cet analyte doit souvent être chimiquement modifié afin d'introduire une fonction qui permettra son greffage à une protéine porteuse. Plusieurs molécules modifiées, appelées *haptènes*, seront couplées à une protéine. Cette entité immunogène, appelée *immunoconjugué*, est ensuite utilisée pour immuniser le mammifère.

Quelques mL de sérum sont ensuite prélevés de l'animal après quelques semaines d'immunisation. Une purification est mise en œuvre pour isoler les anticorps (*immunoglobulines* de type G, IgG) et les greffer chimiquement sur un support solide hydrophile afin qu'il ne génère pas d'interactions pouvant conduire à terme à une rétention non spécifique sur l'immunoadsorbant. Ces supports sont en général de la silice activée ou des gels d'agarose. Ces étapes sont résumées dans la *figure 1*.

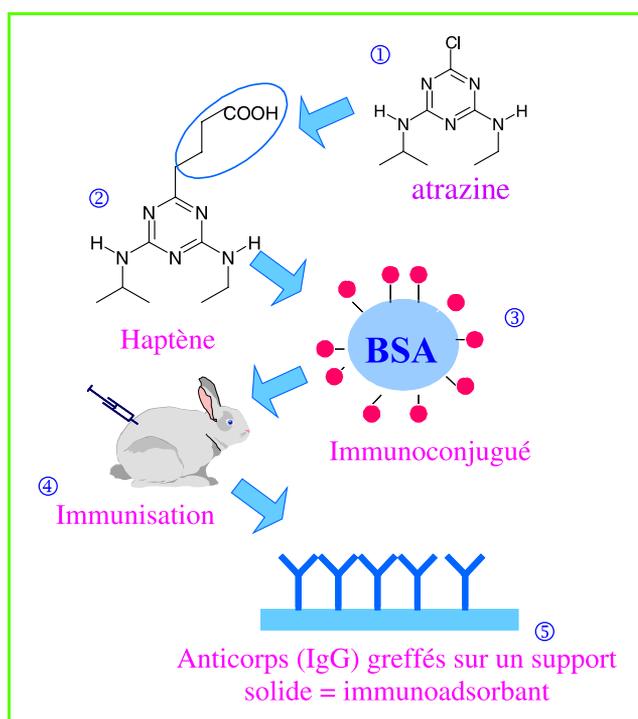


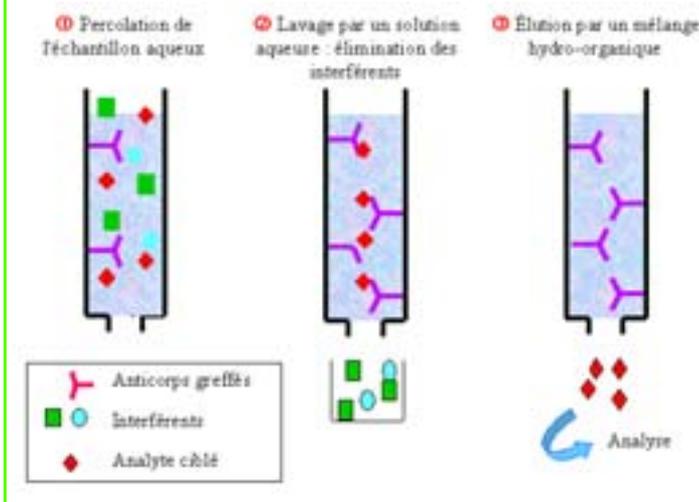
Figure 1 - Principe de synthèse d'un immunoadsorbant.

1) Choix de la molécule-cible. 2) Synthèse de l'haptène. 3) Greffage à une protéine porteuse = synthèse de l'immunoconjugué. 4) Immunisation puis prélèvement du sérum et purification des IgG. 5) Greffage des anticorps (IgG) sur une phase solide.

Dans une première approche, les immunoadsorbants (IS) sont synthétisés avec des anticorps polyclonaux, à savoir la fraction d'immunoglobulines de type G (IgG) que l'on isole du sérum. Cette fraction contient des anticorps d'affinités variées et seuls 10 à 15 % d'entre eux sont spécifiques de l'immunoconjugué et donc de la molécule ciblée. Ces anticorps sont moins chers et plus rapides à produire que les anticorps monoclonaux qui sont issus de la sélection du clone générant les anticorps de spécificité souhaitée. Ces derniers sont cependant préconisés pour la commercialisation des IS car, une fois la lignée sélectionnée, ils sont

### Encadré 1

#### Principe de l'immunoextraction



obtenus de façon reproductible, en grande quantité et sans recourir à l'utilisation d'animaux.

Les immunoadsorbants ainsi produits peuvent être introduits dans des réservoirs de type cartouches ou précolonne entre deux frittes et être utilisés comme tout support classique d'extraction. Après une étape de conditionnement par un tampon et de l'eau pure, l'échantillon aqueux est appliqué et un lavage à l'eau pure est alors éventuellement introduit. L'application d'un solvant d'éluion permet de récupérer les solutés sélectivement retenus par les anticorps (voir encadré 1).

#### Réactivité croisée et extraction sélective par groupe de polluants

Les propriétés des immunoadsorbants résultent surtout de celles des anticorps greffés. Si les anticorps créent des interactions spécifiques avec un antigène donné contre lequel ils ont été synthétisés, ils sont aussi source de réactions croisées, c'est-à-dire de réactions avec les analogues structuraux de l'antigène. En principe, une forte affinité des anticorps est obtenue pour la molécule utilisée pour la synthèse des anticorps (molécule antigène). L'affinité pour les autres molécules de la même famille chimique va dépendre de leurs caractéristiques structurales. Cette affinité va influencer sur la rétention des composés au cours de l'étape d'extraction et donc sur les rendements d'extraction pour un volume d'échantillon donné. Ceci est illustré par les rendements d'extraction reportés dans le *tableau II* et obtenus pour des triazines après préconcentration d'eau pure dopée par ces composés sur trois immunoadsorbants greffés par des anticorps différents.

Si l'on compare les rendements obtenus avec chaque type d'anticorps, il apparaît que l'anticorps le plus apte à piéger simultanément la famille des triazines est celui produit à l'image de l'amétryne. Par modélisation moléculaire de ces triazines et des immunoconjugés, et par l'exploitation des résultats par analyse en composante principale, il a récemment été mis en évidence l'importance du volume des groupements caractérisant les différentes molécules et des interactions électroniques (mesurées par la répartition des charges dans les molécules) dans le mécanisme de reconnaissance par les anticorps, et donc leur affinité

Tableau II - Rendements d'extraction (%) après percolation de 25 mL d'eau pure dopée par un mélange de triazines sur des immunoabsorbants contenant une quantité équivalente d'anticorps monoclonaux anti-atrazine, -amétryne et -dichloroatrazine greffés sur silice. (Adapté de [41]).

	Haptène		
	Atrazine	Amétryne	Dichloroatrazine
Atrazine	91	90	23
Cyanazine	96	91	93
Propazine	75	105	25
Simazine	93	114	3
Sebutylazine	100	100	35
Terbutylazine	67	85	90
Prometon	25	99	2
Prométryne	0	107	0
Terbutryne	0	92	0

vis-à-vis des différents composés de cette famille [41]. A terme, ces travaux ont pour objectif de permettre la prévision de la structure idéale de la molécule modèle pour la production d'anticorps, permettant ainsi de diminuer leur coût de développement.

### Capacité et analyse quantitative

Un rendement d'extraction inférieur à 100 % peut être dû à une faible affinité des anticorps vis-à-vis du composé étudié, mais aussi à un dépassement de capacité. Il est donc important de connaître ce paramètre couramment défini comme le nombre total de sites de reconnaissance disponibles sur l'IS et capables de fixer les analytes. Cette capacité est donc directement liée au nombre et à la nature des anticorps greffés ainsi qu'à leur accessibilité. Lorsque l'on utilise des anticorps polyclonaux, la fraction d'anticorps greffés correspond à la fois à des anticorps spécifiques de la molécule ciblée, mais également à des anticorps spécifiques d'autres molécules (telle que la protéine porteuse ou des anticorps liés au patrimoine immunitaire de l'animal) qui n'interviennent donc pas dans le procédé d'extraction. Il est alors nécessaire de connaître cette capacité de manière à ne pas saturer l'immunoabsorbant, ce paramètre ne pouvant pas être accessible par le calcul. Le dépassement de cette capacité a pour conséquence la non-linéarité des courbes d'étalonnage au-delà d'une certaine concentration. La capacité peut être mesurée par percolation d'un volume constant d'eau dopée par des quantités croissantes d'analyte-antigène. Un exemple de courbe ainsi obtenue, présenté en *figure 2*, fait apparaître que la quantité maximale d'atrazine pouvant être fixée sans diminution des rendements d'extraction est de l'ordre de 450 ng pour cet immunoabsorbant constitué d'anticorps anti-atrazine. Si cette capacité est insuffisante, ce qui peut être le cas si l'on cherche à extraire simultanément d'autres analogues structuraux, il est nécessaire d'augmenter la quantité d'anticorps dans le support. Cela revient en général à augmenter aussi la quantité de support de greffage car une densité de greffage trop élevée conduit à des problèmes d'accessibilité des analytes pour les anticorps [37].

Outre un apport en reproductibilité déjà évoqué, les anticorps monoclonaux présentent aussi l'avantage d'être tous spécifiques de la molécule cible, conduisant ainsi à

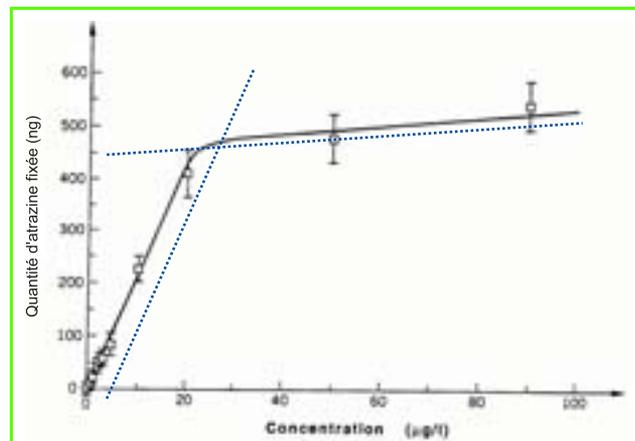


Figure 2 - Mesure de la capacité par percolation d'échantillons d'eau contenant des concentrations variables en atrazine sur un IS anti-atrazine [9].

un IS de capacité plus élevée pour une quantité donnée d'anticorps. Ce paramètre est très important si l'on souhaite miniaturiser le système d'extraction.

Des études menées avec des IS de même capacité mais synthétisés à partir d'anticorps monoclonaux et polyclonaux anti-isoproturon (obtenus en adaptant la quantité d'anticorps suivant leur nature) indiquent la même échelle d'affinité pour le groupe des 13 phénylurées testées. Ces résultats sont reportés dans le *tableau III* : des rendements similaires sont obtenus pour un composé donné quel que soit le type d'anticorps utilisé. La même observation a été faite avec des anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre l'atrazine et la terbutylazine. Il est donc possible d'obtenir des anticorps monoclonaux présentant une grande réactivité croisée, à savoir une grande aptitude à piéger plusieurs composés d'une même famille structurale.

Tableau III - Rendements (%) moyens et écart-type mesurés après percolation de 25 mL d'eau pure dopée à 1 µg/L par des phénylurées sur des immunoabsorbants contenant des anticorps anti-isoproturon monoclonaux (n = 2) et polyclonaux (n = 3) de même capacité (quantité d'anticorps adaptée à leur nature). (Adapté de [37]).

	Monoclonaux	Polyclonaux
Fénuron	0	< 10
Metoxuron	19 (5)	61 (4)
Monuron	28 (5)	101 (5)
Chlortoluron	100 (2)	102 (8)
Isoproturon	99 (1)	99 (3)
Difénoxuron	6 (6)	67 (6)
Linuron	83 (2)	96 (5)
Chlorbromuron	100 (9)	101 (5)
Diflufenzuron	59 (7)	99 (6)

### Immunoextraction et couplage à l'analyse chromatographique

Le protocole d'extraction sur immunoabsorbants est similaire à celui utilisé pour les supports classiques d'extraction (silice greffée C18, copolymères apolaires...). Après conditionnement de l'immunoabsorbant par quelques mL

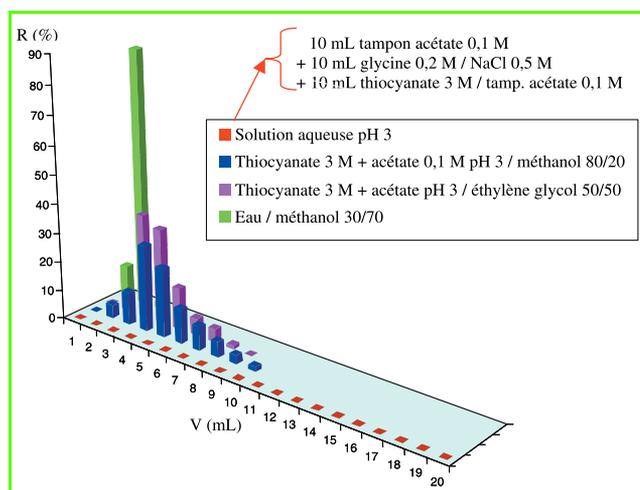


Figure 3 - Éluion fractionnée de l'isoproturon d'anticorps anti-isoproturon par percolation de solutions aqueuses ou de mélanges hydro-organiques sur l'immunoabsorbant.

d'eau pure, l'échantillon est percolé. Les solutés sélectivement retenus par les anticorps sont ensuite désorbés par un faible volume d'éluant.

Si les grosses molécules (protéines, hormones, etc.) sont désorbées par simple changement de pH, modification de la force ionique de l'éluant ou ajout d'agents dénaturants, ces conditions sont peu efficaces pour la désorption de petites molécules comme le montre la figure 3 illustrant l'effet de certains agents sur l'éluion de l'isoproturon. Seuls des solvants organiques comme le méthanol ou l'acétonitrile permettent une désorption efficace de l'analyte en un faible volume, ce qui n'est pas obtenu par application de solutions aqueuses ou d'autres agents largement utilisés pour les molécules de grande taille.

Il apparaît que des mélanges hydro-organiques contenant jusqu'à 80 % de méthanol ou d'acétonitrile peuvent être utilisés sans endommager l'immunoabsorbant, à la différence d'anticorps non greffés dont la dénaturation est irréversible dans de telles conditions. En effet, l'IS est régénéré par stockage à 4° C dans une solution aqueuse tamponnée contenant un agent antibactérien. Ce comportement particulier des anticorps greffés a aussi été mis en évidence lors de l'étude de l'action de certains sels connus pour leur effet chaotrope (propriété que possèdent certains ions à agir sur les interactions de nature hydrophobe modifiant alors la conformation des protéines), voire dénaturant pour les anticorps. En effet, certains ions réputés très forts pour entraîner la rupture des interactions antigène-anticorps se sont montrés peu efficaces pour la désorption de micropolluants des immunoabsorbants. Cependant, une baisse des rendements peut être observée quand certains ions sont introduits dans l'échantillon d'eau avant percolation, traduisant une diminution de l'affinité des anticorps probablement liée à un changement de structure réversible des anticorps.

Généralement conditionnés dans des cartouches d'extraction en polypropylène, piégés entre deux frittes, les immunoabsorbants peuvent également être introduits dans des précolonnnes intégrées dans des montages permettant de coupler en ligne l'extraction et l'analyse par chromatographie en phase liquide (CPL). La désorption est alors réalisée par le gradient de phase mobile utilisée pour la séparation analytique. Cette phase mobile doit contenir une quantité suffisante de solvants organiques pour permettre la

désorption des solutés, tout en permettant la séparation des composés ciblés.

### Apport en sélectivité des immunoabsorbants

L'exemple reporté figure 4 illustre clairement le gain en sélectivité résultant de l'utilisation de l'IS pour l'extraction de la benzidine et de deux analogues structuraux. Le polymère de styrène divinylbenzène (figure 4A) est suffisamment rétentif pour obtenir un taux de récupération élevé, mais il conduit à la co-extraction de nombreux autres composés masquant notamment, sur le chromatogramme, la présence de la benzidine. La quantification des trois analytes après passage direct de l'échantillon sur l'IS (figure 4B) est en revanche grandement facilitée par l'élimination presque totale des autres constituants de la matrice.

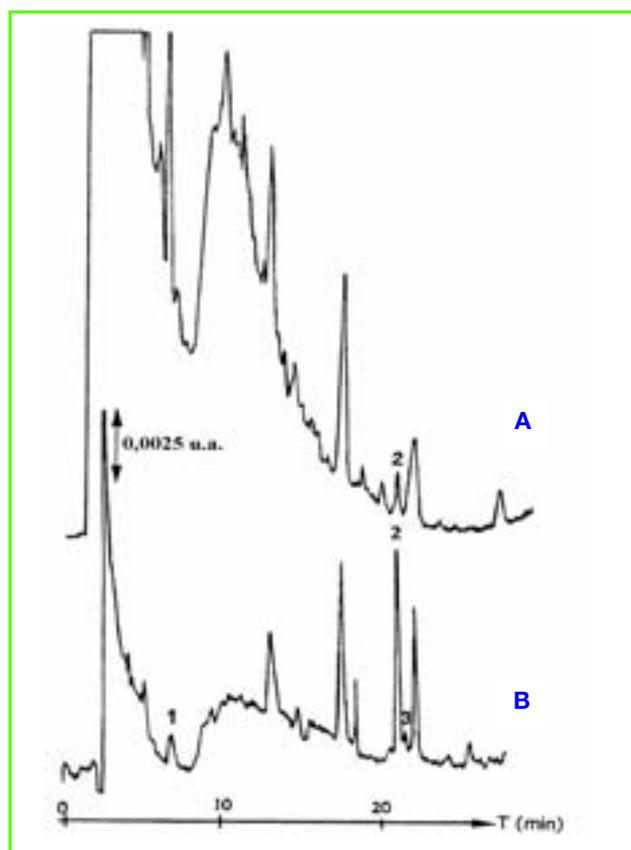


Figure 4 - Extraction sur un support non sélectif de styrène divinylbenzène (A) et sur un immunoabsorbant contenant des anticorps anti-benzidine (B) de composés contenus dans un effluent industriel (en sortie d'industrie textile).

2,5 mL d'échantillon dilués par 47,5 mL de tampon salin (PBS), échantillon dopé à 1 µg/L. Composés : 1- benzidine ; 2- 2,4-dichloroaniline ; 3- 3,3'-dichlorobenzidine. (Adapté de [8]).

L'apport en sélectivité des immunoabsorbants résulte de la grande spécificité de l'interaction antigène-anticorps. Cependant, en raison de leur caractère ionique ou fortement hydrophobe, certains composés peuvent interagir fortement avec le support de greffage, voire même avec les protéines (immunoglobulines). L'évaluation des risques de rétention liées à des interactions non spécifiques peut se faire par comparaison des résultats obtenus entre un IS contenant des anticorps spécifiques et un autre IS constitué du même support solide mais greffé par des anticorps non spécifiques des molécules ciblées. De nombreuses études ont montré

que les silices activées et les gels d'agarose engendraient peu d'interactions non spécifiques.

Lorsqu'une forte affinité est obtenue entre les anticorps et les analytes ciblés, il est alors possible d'éliminer les interférents, faiblement fixés par interactions non spécifiques, par une étape de lavage avant de procéder à la désorption. Cette approche est illustrée *figure 5* pour la recherche de pentachlorophénol dans un effluent industriel. Un IS anti-chlorophénols a été obtenu par greffage d'anticorps anti-pentachlorophénol. L'interaction avec le pentachlorophénol s'est révélée très intense, si bien que l'étape de désorption n'a pu être réalisée avec le mélange classique d'eau et de solvant organique, mais avec en plus l'ajout d'acide acétique. Dans ce cas, après percolation de l'échantillon, un lavage intermédiaire a pu être réalisé avec une solution contenant 95 % d'acétonitrile avant désorption du pentachlorophénol. Il est ainsi possible, comme le montre la *figure 5B*, de quantifier facilement le pentachlorophénol dans cet effluent, ce qui n'est pas le cas lorsque l'on extrait ce composé par un support hydrophobe conventionnel (de polystyrène divinylbenzène) (*figure 5A*). Un autre exemple d'apport en sélectivité est illustré *figure 6* qui correspond à l'analyse d'une toxine algale, la microcystine-LR, et de ses nombreux analogues structuraux après leur extraction de cultures d'algues. Dans ce cas, l'analyse est réalisée en CPL couplée à un détecteur à barrette de diodes permettant d'accéder au spectre d'absorbance caractéristique de ces toxines et couplée à un spectromètre de masse (SM) muni d'un analyseur à triple quadripôles pour l'identification des variants de microcystines dont on ne possède pas les étalons. L'immunoextraction (*figure 6A*) apparaît ici comme une méthode de choix pour limiter une fois de plus la co-extraction d'interférents appa-

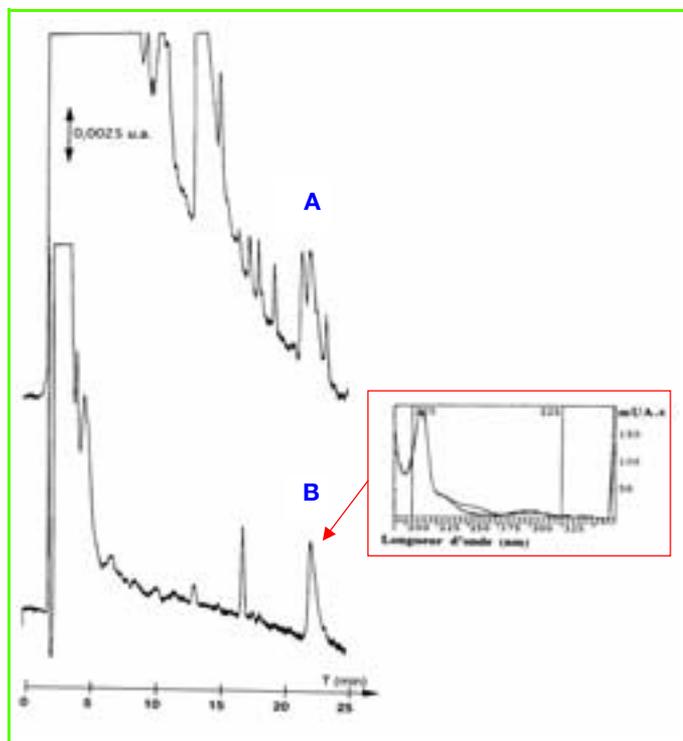


Figure 5 - Analyse du pentachlorophénol dans un effluent industriel dilué dans une solution de tampon phosphate après extraction par un copolymère non sélectif de styrène-divinylbenzène (A) et par un immunoadsorbant anti-chlorophénols (B). Image en insert : spectre d'absorbance UV du pentachlorophénol comparé au spectre correspondant au pic fleché.

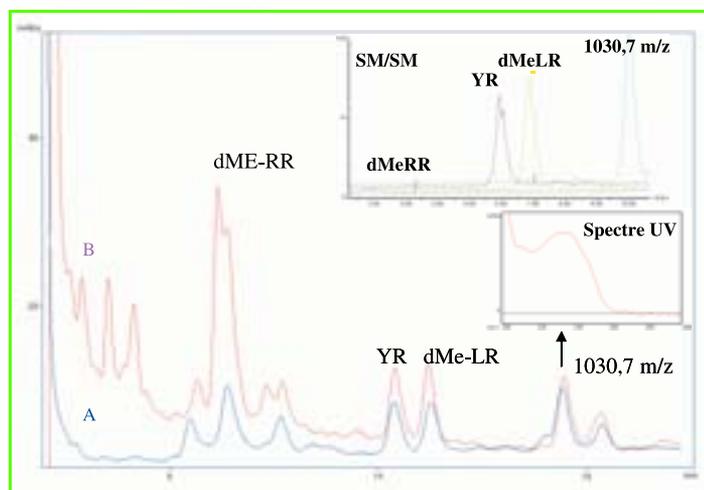


Figure 6 - Analyse d'un extrait d'algues contenant la microcystine YR et les variants déméthylés des microcystines RR et LR et, avec (A) ou sans (B), étape de purification sur un immunoadsorbant constitué d'anticorps anti-microcystines LR.

Images en insert : spectre UV d'une toxine de masse  $m/z$  1030,7 similaire à celui de la microcystine LR et résultat de l'analyse en SM/SM de cet échantillon après purification sur l'IS. (Adapté de [22]).

raissant dans l'analyse de l'extrait non purifié (*figure 6B*), mais aussi pour extraire sélectivement des analogues structuraux de la microcystine-LR présents dans les cultures.

Lorsque l'immunoextraction intervient comme méthode de purification d'extraits obtenus par applications de méthodes conventionnelles (extractions en solvants par Soxhlet, sous champ micro-ondes...), les solutés à analyser sont contenus dans un solvant organique. Or, pour obtenir une forte affinité des anticorps et ainsi une forte rétention des analytes sur l'immunoadsorbant, il est préférable de percoler un échantillon aqueux. Aussi, la purification sur IS nécessite une étape d'évaporation du solvant et de dilution de l'extrait dans l'eau avant immunoextraction. Il est possible de travailler avec une faible teneur résiduelle en solvant, mais celle-ci doit être contrôlée par vérification des rendements d'extraction.

### Couplage en ligne de l'immunoextraction aux techniques chromatographiques

L'automatisation facile du couplage en ligne de l'extraction sur phase solide avec la CPL rend cette technique très performante et les analyses quantitatives plus fiables. L'extraction se fait actuellement avec des précolonnes remplies de supports tels que les silices greffées C18 ou des copolymères qui mettent en jeu des interactions non spécifiques. Mise à part si les analytes sont hydrophobes, il est difficile d'appliquer un lavage intermédiaire car cela peut conduire à la perte des composés les plus polaires, compte tenu des faibles dimensions des précolonnes et donc des faibles quantités de phase. De ce fait, il y a grand intérêt à utiliser les IS comme support d'extraction en ligne car la purification est alors réalisée en même temps que l'extraction. Le couplage de l'extraction et de la CPL en ligne apparaît également intéressant pour l'analyse de composés volatils comme les phénols ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques car il permet d'éviter l'étape d'évaporation souvent nécessaire après l'élution pour concentrer l'extrait à injecter.

Le couplage en ligne de l'immunoextraction peut se faire directement avec l'analyse chromatographique. L'IS est conditionné dans une précolonne et installé sur une vanne permettant, en position de chargement, de percoler l'échantillon. L'élution est ensuite assurée par la phase mobile permettant la séparation chromatographique après basculement de la vanne en position d'élution. Ce couplage est possible uniquement si les anticorps ont été préalablement greffés de façon covalente sur un support résistant aux fortes pressions développées par le système analytique et si les conditions de désorption sont compatibles avec l'analyse chromatographique. Des anticorps greffés sur silice ont été utilisés pour l'analyse en ligne de triazines, de phénylurées, d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et de colorants dans des eaux [7-9, 26, 29, 31, 34-36]. Dans ces différents cas, une phase mobile contenant de l'eau et de l'acétonitrile a permis un transfert rapide des solutés vers la colonne analytique sans perte en efficacité.

Pour les analyses de phénols et de microcystines illustrées figures 5 et 6, l'ajout d'acide acétique dans le solvant de désorption rend impossible le couplage direct avec la séparation chromatographique car il conduit à des problèmes de détection ou de rétention chromatographique. Pour les microcystines, leur analyse en ligne a été rendue possible par l'introduction d'une seconde précolonne contenant un polymère organique qui permet un piégeage intermédiaire des toxines extraites sélectivement puis éluées de l'immunoabsorbant avant leur transfert en CPL/SM [22]. Ce couplage mettant en œuvre un support intermédiaire est aussi utilisé quand les anticorps ont été greffés sur un support ne permettant pas d'appliquer de fortes pressions (gel d'agarose), ou pour un couplage en ligne avec la chromatographie en phase gazeuse.

## Les polymères à empreintes moléculaires

### Principe

Bien que les polymères à empreintes moléculaires (MIP) suscitent un intérêt assez récent pour leur application à l'extraction, le concept est assez ancien et a été largement exploité dans le domaine de la chiralité. Au départ développés sur silice, ils doivent leur essor à l'utilisation de polymères organiques.

Ils sont obtenus par polymérisation de monomères autour d'une molécule modèle (ou empreinte) en présence d'un agent réticulant et d'un initiateur de polymérisation. Après élimination de la molécule empreinte, on obtient un polymère poreux possédant des sites de reconnaissance spécifique de la molécule modèle, à savoir des cavités capables de reconnaître la molécule modèle avec une sélectivité comparable à celle des systèmes biologiques (enzymes, anticorps...). Outre le fait d'être peu onéreux si la molécule modèle est disponible à faible coût, de tels polymères présentent une excellente stabilité chimique, mécanique et thermique. Les ouvrages ou revues générales portant sur le sujet [45-47] et le nombre de publications en augmentation exponentielle durant ces cinq dernières années témoignent du grand potentiel des MIP pour l'extraction de polluants de matrices variées. Quelques exemples d'applications environnementales sont reportés dans le tableau IV.

### Synthèse

La première étape de la synthèse consiste à mettre en contact la molécule modèle, le(s) monomère(s) fonctionnel(s)

Tableau IV - Polymères à empreinte moléculaire appliqués à différents types de polluants et de matrices.

AM : acide méthacrylique ; VP : 4-vinylpyridine ; ATFMA : acide trifluorométhylacrylique.

\* phase à accès restreint (mécanisme d'exclusion + interactions hydrophobes).

Analytes ciblés	Molécules modèles	Matrices	Monomères	Solvant porogène	Réf.
Alkylphosphonates	Différents méthyl phosphonates	Sérum (solutés transférés dans l'acétonitrile)	AM	Acétonitrile	48
Ac. chlorophénoxyacétiques	2,4,5-T	Eau	VP	Eau/Méthanol	49
Bisphénol A	p-ter-butylphénol	Eau	VP	Toluène	50
Nicotine et produits d'oxydation	Nicotine	Chewing gum	AM	Dichlorométhane	51
4-nitrophénol	4-nitrophénol	Eau	VP	Acétonitrile	52-53
Phénylurées	Isoproturon ou fénuron	Eau/végétaux	AM	Acétonitrile ou Toluène	54-55
Sulfonylurées	Met-sulfuron-méthyle	Eau, sol	ATFMA	Dichlorométhane	56
Triazines	Atrazine	Foie	AM	Acétonitrile	57
	Propazine	Eau, extrait de sédiment dilué dans l'eau	AM	Dichlorométhane ou toluène	58
	Simazine	Eau, urine, pomme (après extraction sur C18)	AM	Dichlorométhane	59
	Terbutylazine	Eau	AM	Dichlorométhane	60-61
	Terbutylazine	Eau (après extraction sur support mixte*)	AM	Toluène	62
	Terbutylazine	Eau (après extraction sur C18)	AM	Nombreux solvants	63
	Dibutylmélamine	Eau	AM	Chloroforme/eau	64

et un agent réticulant dans un solvant porogène qui va permettre de créer une structure méso- ou macroporeuse. Le monomère est choisi de manière à développer, avec la molécule empreinte, des liaisons covalentes, non covalentes ou encore des liaisons de coordination. La formation de liaisons covalentes doit conduire à un complexe plus stable et de géométrie bien déterminée. Après polymérisation, la liaison covalente est rompue par clivage chimique libérant la molécule empreinte et laissant des sites homogènes bien définis. Cependant, la plus grande simplicité de mise en œuvre de liaisons non covalentes fait que cette méthode est plus largement représentée dans la littérature pour l'application des MIP comme supports d'extractions tels que ceux décrits dans le *tableau IV*. Cette méthode permet un bon compromis entre une interaction analyte-monomères suffisamment forte pour l'obtention d'une grande sélectivité et une désorption rapide, ce qui est primordial pour un éventuel couplage en ligne des polymères à la CPL. Un schéma récapitulatif des différentes étapes de synthèse est donné *figure 7*. Les polymères peuvent éventuellement être synthétisés *in situ* dans une colonne ou un capillaire et utilisés comme tels. Dans la plupart des cas, ils sont synthétisés en bloc, puis broyés et tamisés de manière à obtenir des particules de taille homogène (comprise entre 25 et 50  $\mu\text{m}$ ) que l'on conditionne ensuite sous forme de cartouche ou de colonne. C'est par cette technique que sont obtenus la majorité des MIP dédiés à l'extraction.

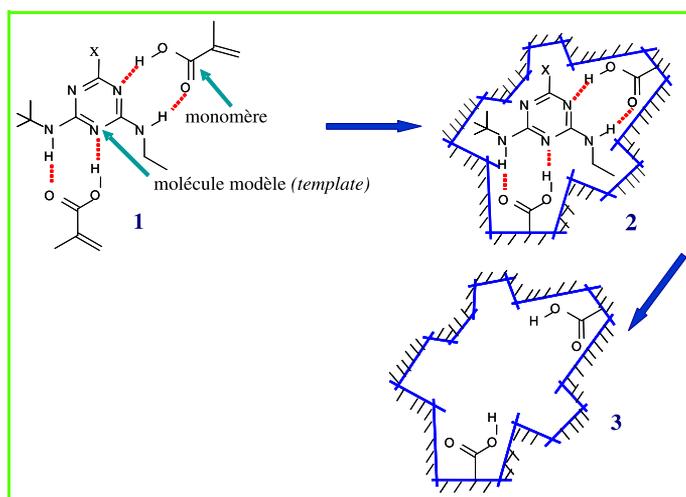


Figure 7 - Schéma de principe de la synthèse d'un polymère à empreinte moléculaire.

(1) complexation entre la molécule modèle (*template*) et le(s) monomère(s) dans le solvant de synthèse ; (2) polymérisation par voie thermique ou photochimique ; (3) lavage du polymère pour éliminer la molécule modèle. (Adapté de [64]).

### Choix des réactifs

#### Choix de la molécule modèle

De la même manière que l'haptène et donc l'immunoconjugué définissent la spécificité des anticorps produits, la structure de la molécule empreinte qui possède une géométrie et des fonctionnalités particulières va définir la spécificité du MIP. A titre d'exemple, sont comparés dans le *tableau V* des rendements d'extraction obtenus pour différentes triazines après percolation sur des polymères imprimés avec l'amétryne (thiotriazine) et la terbutylazine (chlorotriazine) comme molécule empreinte. Si ces deux supports

Tableau V - Rendements d'extraction obtenus pour des triazines sur des MIP synthétisés en prenant l'amétryne et la terbutylazine comme molécules modèles.

Percolation de 10 mL d'un mélange dichlorométhane/méthanol (99:1) dopé par les triazines [61].

	Amétryne	Terbutylazine
Atrazine	88	100
Cyanazine	82	100
Propazine	87	100
Simazine	93	100
Sebutylazine	72	98
Terbutylazine	77	100
Prometon	100	96
Amétryne	78	26
Prométryne	81	31
Terbutryne	60	25

permettent d'extraire toutes ces molécules de structure proche, le polymère synthétisé avec la terbutylazine est plus spécifique des triazines chlorées (dont le nom se termine en « *ine* ») puisque de plus faibles rendements d'extraction sont obtenus pour les triazines thiométhylées (dont le nom se termine en « *yne* »). En revanche, l'utilisation du polymère synthétisé à l'image de l'amétryne permet l'extraction de l'ensemble des triazines ciblées avec des rendements supérieurs à 60 %.

Cependant, si après synthèse il est important d'éliminer totalement cette molécule empreinte pour qu'elle ne soit pas relarguée par le polymère au cours de son utilisation conduisant ainsi à des faux positifs, cette élimination totale est parfois incertaine [51, 65] et conduit certains groupes à utiliser, comme empreinte pour la synthèse, un analogue structural de la molécule cible qui n'est pas susceptible d'être présent dans les échantillons. La difficulté réside alors dans le choix de cette molécule qui doit permettre d'obtenir une forte affinité pour la molécule ciblée, voire plusieurs molécules appartenant à la même famille structurale. Cette molécule doit de plus être disponible en grande quantité, ce qui peut poser des problèmes de coût et de toxicité.

#### Choix du monomère

Le monomère est choisi pour sa capacité à établir des interactions fortes non covalentes avec la molécule empreinte dans le solvant de polymérisation. La majorité des MIP utilisés en extraction ont été synthétisés à partir de l'acide méthacrylique (voir *tableau IV*). Suivant les molécules empreintes, ce monomère est susceptible de développer des interactions de type liaison hydrogène ou des interactions électrostatiques. Des monomères basiques tels que la 4-vinylpyridine pouvant générer des interactions de type  $\pi$ - $\pi$  avec certains analytes peuvent également être utilisés. Une étude récente a permis de démontrer, comme pour le choix de l'haptène pour la synthèse d'un immunoabsorbant, l'intérêt de l'utilisation de la modélisation moléculaire pour choisir la nature du ou des monomères et leur ratio par rapport à la molécule empreinte pour obtenir un affinité maximale entre le MIP et la molécule empreinte [66].

Néanmoins, la nature des interactions développées au cours de la synthèse va dépendre de la nature du solvant de polymérisation, tout comme la spécificité et la sélectivité du MIP vont dépendre du solvant utilisé pour la percolation ou les étapes de lavage (voir chapitre suivant).

Enfin, la majorité des réactions de polymérisation décrites utilise, comme agent réticulant, le diméthacrylate d'éthylène glycol, ce qui s'explique notamment par sa grande stabilité mécanique et thermique [45].

### Choix du solvant

S'il doit être choisi au départ pour sa capacité à solvater les différents réactifs nécessaires à la synthèse, le solvant de polymérisation est un paramètre-clé de la spécificité du MIP puisqu'il conditionne la nature et la force des interactions entre la molécule empreinte et le(s) monomère(s). La spécificité des cavités du MIP dépend de la stabilité du complexe formé. Les solvants les plus utilisés sont des solvants peu polaires et aprotiques, de façon à favoriser les interactions préalablement citées comme les liaisons hydrogène. La nature du solvant de polymérisation influe aussi sur la structure et la morphologie du polymère en modifiant sa porosité (effet porogène) et sa capacité à gonfler en présence de certains solvants utilisés au cours de l'étape d'extraction.

### Rétention sélective sur MIP

Pour qu'un analyte soit extrait spécifiquement par le MIP, il faut que sa structure soit relativement proche de celle de l'empreinte pour pénétrer dans les cavités et interagir ensuite avec le polymère. L'analyte cible sera retenu spécifiquement dans les cavités du polymère s'il développe le même type d'interactions que celles développées lors de la synthèse ; cela implique donc l'utilisation pour l'extraction sur MIP d'un solvant analogue au solvant de synthèse. Le solvant de polymérisation étant de nature organique, l'extraction de composés d'échantillons aqueux implique une première étape de transfert dans un solvant organique par extraction liquide-liquide [49] ou par extraction sur un support hydrophobe conventionnel [58, 62-63]. L'échantillon aqueux peut être directement percolé sur le MIP, mais une étape de lavage par le solvant qui permet de générer les interactions spécifiques au sein des cavités est alors obligatoire (voir encadré 2). L'optimisation de cette étape est cruciale pour aboutir à une sélectivité optimale, mais également très délicate car les interactions analyte-polymère sont plus ou moins fortes en fonction de la nature de l'analyte et de la structure des cavités. En effet, toutes les cavités ne sont pas identiques. Ceci résulte de la structure méso- et macroporeuse des polymères [45]. Cette hétérogénéité peut être démontrée par des études de capacité (menées de manière similaire à celle décrite figure 2 pour les immunoabsorbants) : ces mesures conduisent à des courbes possédant plusieurs parties linéaires successives qui traduisent la présence de cavités différentes mettant en œuvre des interactions d'énergie variée [58]. De ce fait, l'optimisation de l'étape de lavage consiste à éliminer les interactions non spécifiques sans perdre les composés les plus faiblement retenus spécifiquement.

Pour vérifier la spécificité des interactions impliquées dans un processus d'extraction et éventuellement l'optimiser, l'approche couramment décrite consiste à comparer la rétention des analytes sur le MIP à celle sur un polymère non imprimé obtenu par la même voie de synthèse mais sans introduire la molécule empreinte. C'est ainsi qu'il a été vérifié que dans le cas des résultats reportés dans le tableau V, la rétention était due à des interactions spécifiques à condition d'introduire 1 % de méthanol dans la fraction de dichlorométhane, et ce pour limiter l'interaction par liaisons hydrogène avec des résidus méthacryliques situés dans des régions

#### Encadré 2

### Principe de l'extraction sur polymères à empreintes moléculaires appliquée aux échantillons aqueux



1. Percolation de l'échantillon aqueux  
☞ Rétention sur MIP par interactions hydrophobes non sélectives.

Séchage



2. Percolation d'un solvant faiblement polaire et aprotique  
☞ Induction d'un mécanisme de rétention sélectif par interactions polaires/élimination des composés de structure non complémentaire des cavités.



3. Élution des analytes par un solvant polaire protique.

Analyse

non spécifiques du polymère (en dehors des cavités bien définies). Dans le cas des composés très polaires, la réduction des interactions non spécifiques est difficile car ils interagissent fortement par liaisons hydrogène avec la matrice polymère [61]. Une élimination totale de ces interactions parasites implique l'utilisation d'un solvant polaire protique, ce qui peut entraîner également l'élution des composés les plus faiblement retenus spécifiquement [49].

### Applications et effets de matrices

Comme évoqué précédemment, compte tenu des réactifs utilisés pour leur synthèse, les MIP développent des interactions sélectives principalement polaires qui ne peuvent se développer en milieu aqueux au cours de la percolation. Pour pallier ce problème, de nombreuses procédures décrites dans la littérature consistent en une étape préalable de changement de solvants (par extraction liquide-liquide ou par extraction sur support conventionnel) qui permet le transfert des analytes dans le solvant adapté au passage sur MIP, ce dernier intervenant alors comme support de purification. Un exemple d'application est donné figure 8. Il correspond à l'analyse d'une eau de source dopée par des triazines et leurs métabolites (100 mL à 0,5 µg/L) après extraction sur un polymère hydrophobe (polystyrène divinylbenzène) suivie (a) ou non (b) d'une étape de purification sur un MIP. La comparaison des deux chromatogrammes illustre le gain en sélectivité puisque le passage sur le MIP a permis d'éliminer une grande quantité de composés préalablement extraits par le polymère hydrophobe.

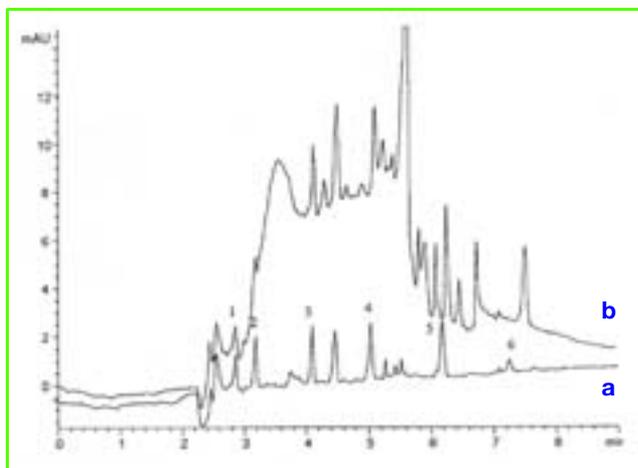


Figure 8 - Analyse d'une eau de source dopée par des triazines et leurs métabolites (100 mL à 0,5 µg/L) après extraction sur un polymère hydrophobe (PS-DVB) suivie (a) ou non (b) d'une étape de purification sur un MIP [58].

Composés : (1) déisopropylatrazine ; (2) dééthylatrazine ; (3) simazine ; (4) atrazine ; (5) propazine ; (6) prométryne.

Lorsque l'on cherche à appliquer directement un échantillon aqueux sur le MIP, il convient, pour développer une interaction sélective entre les analytes et les cavités spécifiques, d'introduire dans la procédure d'extraction un solvant permettant de générer les interactions adéquates. Cependant, quelques travaux mentionnent des problèmes d'effets de matrice qui se traduisent par des baisses de rendement d'extraction lorsque les solutés sont recherchés dans des matrices réelles et non plus dans des eaux pures dopées [52, 63]. Pour un MIP fondé sur l'utilisation de méthacrylate comme monomère, nous avons mis en évidence des problèmes liés à la présence de cations dans les eaux naturelles (notamment  $\text{Ca}^{2+}$ ) dont l'effet est de bloquer, par échange d'ions, les sites d'interaction donneurs de liaisons hydrogène. Au pH des eaux naturelles, les fonctions carboxyliques sont ionisées et ne peuvent plus développer de liaisons hydrogène avec les solutés. Ce problème a été résolu par introduction d'une étape de lavage à l'acide chlorhydrique après l'étape de percolation de l'échantillon. La solution acide permet d'éliminer les cations interagissant avec la matrice polymère par échange d'ions avec les protons avant passage du solvant de lavage favorisant les interactions polaires (solvant peu polaire et aprotique). Cette méthode a été appliquée à l'extraction sélective de triazines d'un effluent industriel et le résultat est illustré *figure 9* [61]. L'apport en sélectivité du MIP est démontré par le fait qu'il permet de limiter considérablement la présence d'interférents dans l'extrait analysé. De plus, l'application de la solution acide de régénération avant percolation de dichlorométhane (solvant de lavage) permet de supprimer les effets de matrice et d'obtenir, pour tous les échantillons d'eau analysés, des rendements d'extraction identiques à ceux obtenus pour l'eau pure dopée [61]. Un autre groupe a utilisé un complexant des ions calcium (EDTA) ajouté dans les échantillons d'eau avant percolation pour éliminer ces effets de matrice [56].

L'apport en sélectivité visible dans la *figure 9* par la réduction du massif d'interférents est aussi démontré par le fait que des phénylurées, composés de même taille et appartenant à la même gamme de polarité que les triazines, n'ont pas été piégées par le MIP.

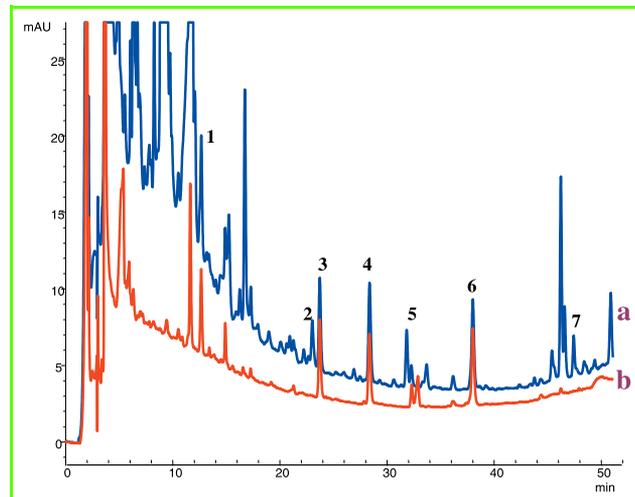


Figure 9 - Chromatogrammes obtenus après extraction de 50 mL d'un effluent industriel (dilué et dopé par des triazines et des phénylurées à 1 µg/L) sur styrène divinylbenzène (a) et sur MIP terbutylazine (b).

Triazines : 1. dééthylatrazine ; 3. dééthylterbutylazine ; 4. atrazine ; 6. terbutylazine. Phénylurées : 2. monuron ; 5. diuron ; 7. néburon. Détection UV à 220 nm [61].

### Couplage en ligne des polymères imprimés à l'analyse chromatographique

Récemment, un couplage en ligne a été décrit pour l'analyse de traces de triazines dans des eaux. Les auteurs préconisent l'utilisation en amont d'une précolonne remplie d'un support à accès restreint (phase RAM : « restricted access media » ; support à mécanisme mixte dont les particules possèdent un greffage interne hydrophobe et externe hydrophile) pour extraire les composés de l'eau avant leur transfert sur MIP [62]. Le transfert entre ce support et le MIP a été réalisé par passage d'acétonitrile. L'acide méthacrylique ayant été utilisé pour la synthèse du MIP, la désorption a été réalisée par passage du mélange méthanol/eau constituant la phase mobile puisque ce solvant permet la rupture des interactions polaires (de type liaisons hydrogène) entre les solutés et le MIP et ainsi leur transfert vers la colonne analytique. Dans cet exemple, le mécanisme d'exclusion induit par le support à accès restreint a permis d'éliminer les substances humiques de haut poids moléculaire (> 15 kD).

Dans ce type de couplage, la difficulté réside dans la compatibilité des solvants de lavage, de transfert et d'élution en terme de miscibilité. Il faut aussi s'assurer que le transfert vers le système analytique est suffisamment rapide pour ne pas occasionner de perte en efficacité. Or, l'exemple décrit témoigne d'un étalement des pics jusqu'à une perte importante en résolution que l'on peut contourner en associant la séparation analytique à une détection sélective en spectrométrie de masse.

### Conclusion : immunoadsorbants ou polymères à empreintes moléculaires ?

Au regard des différentes caractéristiques décrites précédemment, les deux approches semblent complémentaires. La possibilité de piéger sélectivement une famille complète de polluants peut être envisagée dans les deux cas. Il suffit pour cela de comparer les résultats reportés dans les

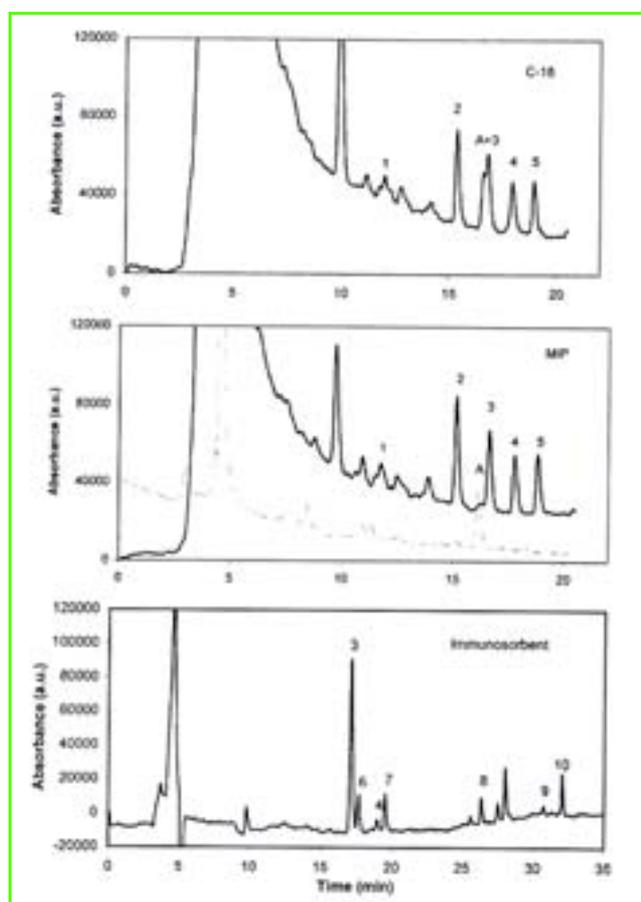


Figure 10 - Chromatogrammes correspondant à l'analyse de 100 mL d'eau de rivière dopée à 1 µg/L par des sulfonamurées et préconcentrée sur C18, MIP et immunoabsorbant [56].

tableaux II et V. Cependant, si l'objectif est le même au départ, à savoir un gain en sélectivité, le moyen d'y accéder est différent en raison de la nature des interactions impliquées. L'application directe des immunoabsorbants au traitement d'échantillons aqueux se fait sans problème majeur puisque l'interaction antigène-anticorps est créée initialement dans ce milieu. En revanche, pour les polymères à empreintes moléculaires, la synthèse se faisant actuellement dans des solvants peu polaires et aprotiques, il est souvent nécessaire d'opérer un transfert des solutés du milieu aqueux vers un solvant approprié par une première étape d'extraction conventionnelle, ou d'appliquer directement l'échantillon sur le MIP et de procéder ensuite à un lavage sélectif parfois difficile et délicat à optimiser. Cependant, pour le traitement d'extraits issus de matrices solides, ces deux supports deviennent compétitifs puisqu'il suffit alors de dissoudre l'extrait sec dans le solvant adapté au support : de l'eau pour les immunoabsorbants, un solvant proche du solvant de synthèse pour les polymères à empreintes moléculaires.

Concernant l'apport en sélectivité, un exemple récent reporté figure 10 permet de comparer ces deux types d'approche : un échantillon d'eau de rivière (100 mL) dopé à 1 µg/L par des sulfonamurées a été préconcentré sur C18, un MIP et un immunoabsorbant [56]. Si la réduction du massif d'interférents est importante lorsque l'on compare le chromatogramme résultant de l'utilisation d'un support de silice greffée C18 par rapport à celle d'un MIP, une

suppression complète du massif est obtenue après immunoextraction. Ce résultat est conforme à ce qui pouvait être attendu car compte tenu de la polarité élevée des interférents (substances humiques et fulviques), celles-ci interagissent fortement avec ce MIP par interactions non spécifiques, interactions difficiles à éliminer totalement sans perte de certains composés de la famille retenus sélectivement mais pour lesquels l'affinité des MIP est plus faible que pour le composé modèle. Cependant, l'apport en sélectivité est aussi démontré par le fait que le composé noté A qui interfère avec le composé 3 après extraction sur C18 n'est plus présent dans l'extrait issu du MIP mais dans la fraction de lavage (représentée en ligne discontinue).

Beaucoup d'exemples témoignent aujourd'hui d'un apport plus important en sélectivité en immunoextraction. Néanmoins, ces supports synthétiques sont plus récents et si l'on regarde le nombre de groupes travaillant actuellement sur leur développement, il est raisonnable d'espérer beaucoup d'améliorations à court terme.

## Références

- [1] Delaunay N., Pichon V., Hennion M.-C., *J. of Chromatogr. B*, **2000**, 745, p. 15.
- [2] Delaunay-Bertoncini N., Pichon V., Hennion M.-C., *LC-GC*, **2001**, 14 (3), p. 162.
- [3] Tsikas D., *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2001**, 49, p. 705.
- [4] Pichon V., Delaunay-Bertoncini N., Hennion M.-C., Immunosorbents in sample preparation, *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. XXXVII: Sampling and sample preparation for field and laboratory, Elsevier, **2002**, chap. 33, p. 1081-1100.
- [5] Delaunay N., Pichon V., Le Caer J.-P., Hennion M.-C., *Analytica Chimica Acta*, **2000**, 407, p. 173.
- [6] Ten-Hage L., Delaunay N., Pichon V., Couté A., Puiseux-Dao S., Turquet J., *Toxicol.*, **2000**, 38, p. 1043.
- [7] Bouzige M., Machtalère G., Legeay J., Pichon V., Hennion M.-C., *Waste Management*, **1999**, 19, p. 171.
- [8] Bouzige M., Legeay P., Pichon V., Hennion M.-C., *J. of Chromatogr. A*, **1999**, 846, p. 317.
- [9] Pichon V., Bouzige M., Miège C., Hennion M.-C., *Trends in Analytical Chemistry*, **1999**, 18 (3), p. 219.
- [10] Zhao M., Liu Y., Li Y., Zhang X., Chang W., *J. of Chromatogr. B*, **2003**, 783, p. 401.
- [11] Ouyang S., Xu Y., Chen Y.H., *Anal. Chem.*, **1998**, 70, p. 931.
- [12] Bean K.A., Henion J.D., *J. of Chromatogr. A*, **1997**, 791, p. 119.
- [13] Cahill L.M., Kruger B., McAlice B.T., Ramsey C.S., Prioli R., Kohn B., *J. of Chromatogr. A*, **1999**, 859, p. 23.
- [14] Vasquez-Lira J.C., Camacho-Frias E., Pena-Alvarez A., Vera-Avila L.E., *Chem. Mater.*, **2003**, 15, p. 154.
- [15] Prince A.E., Fan T.S., Skoczinski B.A., Bushway R.J., *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 444, p. 37.
- [16] Watanabe E., Yoshimura Y., Yuasa Y., Nakasawa H., *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 433, p. 199.
- [17] Tsusumi T., Nagata S., Hasegawa A., Ueno Y., *Food and Chemical Toxicology*, **2000**, 38, p. 593.
- [18] Kondo F., Matsumoto H., Yamada S., Tsuji K., Ueno Y., Harada K., *Toxicol.*, **2000**, 38, p. 813.
- [19] Kondo F., Ito Y., Oka H., Yamada S., Tsuji K., Imokawa M., Niimi Y., Harada K., Ueno Y., Miyazaki Y., *Toxicol.*, **2002**, 40, p. 893.
- [20] Rivasseau C., Hennion M.-C., *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 399, p. 75.
- [21] Lawrence J.F., Ménard C., *J. of Chromatogr. A*, **2001**, 922, p. 111.
- [22] Flinois C., Pichon V., Hennion M.-C., *Bioforum*, oct. **2002**, p. 23.
- [23] Bronshtein A., Aharonson N., Turniansky A., Altstein M., *Chem. Mater.*, **2000**, 12, p. 2050.
- [24] Bensten-Farmen R.K., Botnen I.V., Noto H., Jacob J., Ovrebø S., *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **1999**, 72, p. 161.
- [25] Thomas S.D., Li Q.X., *Environ. Sci. Technol.*, **2000**, 34, p. 2649.
- [26] Pichon V., Aulard-Macler E., Oubihy H., Sassié P., Hennion M.-C., Caude M., *Chromatographia*, **1997**, 46, p. 529.
- [27] Pichon V., Bouzige M., Hennion M.-C., *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 376, p. 21.
- [28] Pérez S., Ferrer I., Hennion M.-C., Barcelo D., *Anal. Chem.*, **1998**, 70, p. 4996.
- [29] Bouzige M., Pichon V., Hennion M.-C., *Environ. Sci. Technol.*, **1999**, 33, p. 1916.
- [30] Miège C., Bouzige M., Nicol S., Dugay J., Pichon V., Hennion M.-C., *J. of Chromatogr. A*, **1999**, 859, p. 29.
- [31] Bouzige M., Pichon V., Hennion M.-C., *J. of Chromatogr. A*, **1998**, 823, p. 197.
- [32] Eskola M., Kokkonen M., Rizzo A., *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, p. 41.

- [33] Ferrer I., Pichon V., Hennion M.-C., Barcelo D., *J. of Chromatogr. A*, **1997**, 777, p. 91.
- [34] Schoenletter E., Pichon V., Thiebaut D., Fernandez-Alba A., Hennion M.-C., *J. Microcolumn Separations*, **2000**, 12 (5), p. 316.
- [35] Pichon V., Chen L., Durand N., Le Goffic F., Hennion M.-C., *J. of Chromatogr. A*, **1996**, 725, p. 107.
- [36] Pichon V., Rogniaux H., Fisher-Durand N., Ben Rejeb S., Le Goffic F., Hennion M.-C., *Chromatographia*, **1997**, 45, p. 289.
- [37] Delaunay-Bertoncini N., Pichon V., Hennion M.-C., *Chromatographia*, **2001**, 53, p. S224.
- [38] Lawrence J.F., Ménard C., Hennion M.-C., Pichon V., Le Goffic F., Durand N., *J. of Chromatogr. A*, **1996**, 732, p. 277.
- [39] Sheedy C., Hall C., *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, p. 1151.
- [40] Ben Rejeb S., Cléroux C., Lawrence J.F., Geay P.Y., Wu S., Stavinsky S., *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 432, p. 193.
- [41] Delaunay-Bertoncini N., Pichon V., Hennion M.-C., *J. of Chromatogr. A*, **2003**, 999, p. 3.
- [42] Stalikas C., Knopp D., Niessner R., *Environ. Sci. Technol.*, **2002**, 36, p. 3372.
- [43] Dallüge J., Hankemeier T., Vreuls J.J., Brinkman U.A.T., *J. of Chromatogr. A*, **1999**, 830, p. 377.
- [44] Lawrence J.F., Ménard C., Hennion M.-C., Pichon V., Le Goffic F., Durand N., *J. of Chromatogr. A*, **1996**, 752, p. 147.
- [45] Sellergren B., Lanza F., *Molecularly imprinted polymers in solid phase extractions, Molecularly imprinted polymers – Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*, vol. 23 de la série *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, Elsevier, **2001**, chap. 15, p. 355.
- [46] Lanza F., Sellergren B., *Chromatographia*, **2001**, 53, p. 599.
- [47] Ramström O., Skudar C., Haines J., Patel P., Brüggemann O., *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, p. 2105.
- [48] Zi-Hui M., Qin L., *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 435, p. 121.
- [49] Baggiani C., Giovanolli C., Anfossi L., Tozzi C., *J. of Chromatogr. A*, **2001**, 938, p. 35.
- [50] Kubo T., Hosoya K., Watabe Y., Ikegami T., Tanaka N., Sano T., Kaya K., *J. of Chromatogr. A*, sous presse.
- [51] Zander A., Findlay P., Renner T., Sellergren B., *Anal. Chem.*, **1998**, 70, p. 3304.
- [52] Masqué N., Marcé R.M., Borrull F., Cormack P.A.G., Sherrington D.C., *Anal. Chem.*, **2000**, 72, p. 4122.
- [53] Caro E., Marcé R.M., Cormack P.A.G., Sherrington D.C., Borrull F., *J. of Chromatogr. A*, **2003**, 995, p. 233.
- [54] Martin-Esteban A., Turiel E., Stevenson D., *Chromatographia*, **2001**, 53, p. S434.
- [55] Tamayo F.G., Casillas J.L., Martin-Esteban A., *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 482, p. 165.
- [56] Zhu Q.-Z., Degelmann P., Niessner R., Knopp D., *Environ. Sci. Technol.*, **2002**, 36, p. 5411.
- [57] Muldoon M.T., Stanker L.H., *Anal. Chem.*, **1997**, 69, p. 803.
- [58] Turiel E., Martin-Esteban A., Fernandez P., Perez-Conde C., Camara C., *Anal. Chem.*, **2001**, 73, p. 5133.
- [59] Bjarnason B., Chimuka L., Ramström O., *Anal. Chem.*, **1999**, 71, p. 2152.
- [60] Ferrer I., Lanza F., Tolokan A., Horvath V., Sellergren B., Horvai G., Barcelo D., *Anal. Chem.*, **2000**, p. 3934.
- [61] Chapuis F., Pichon V., Lanza F., Sellergren B., Hennion M.-C., *J. of Chromatogr. A*, **2003**, 999, p. 23.
- [62] Koeber R., Fleischer C., Lanza F., Boos K.-S., Sellergren B., Barcelo D., *Anal. Chem.*, **2001**, 73, p. 2437.
- [63] Pap T., Horvath V., Tolokan A., Horvai G., Sellergren B., *J. of Chromatogr. A*, **2002**, 973, p. 1.
- [64] Matsui J., Fujiwara K., Ugata S., Takeuchi T., *J. of Chromatogr. A*, **2000**, 889, p. 25.
- [65] Martin P., Wilson I.D., Jones G.R., *Chromatographia*, **2000**, 52, p. S19.
- [66] Chianella, I., Lotierzo M. Piletsky S.A., Tothill I.E., Chen B., Karim K., Turner A.P.F., *Anal. Chem.*, **2002**, 74, p. 1288.



De gauche à droite : F. Chapuis, M.-C. Hennion et V. Pichon

#### Valérie Pichon

est maître de conférences à l'ESPCI\*.

#### Florence Chapuis

est doctorante au LECA (ESPCI).

#### Marie-Claire Hennion

est professeur à l'ESPCI et directeur du LECA.

\* Laboratoire Environnement et Chimie Analytique (LECA), UMR CNRS 7121, École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles (ESPCI), 10 rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05. Tél. : 01 40 79 47 72. Fax : 01 40 79 47 76. Courriel : valerie.pichon@espci.fr

## La verrerie hermétiquement étanche sans graisse et ultra propre Bagues d'étanchéité PTFE Glindemann®

Informations techniques : [www.glindemann.net](http://www.glindemann.net), Echantillons libres : [dglinde@aol.com](mailto:dglinde@aol.com).

Une alternative économique et étonnamment efficace aux manchons et bouchons en PTFE pour joints coniques en verre. Les fuites sont extraordinairement faibles : Taux de fuite d'air < 10<sup>-8</sup>...10<sup>-6</sup> mBar \* Litre / sec. Taux de fuite de solvant < 0.1...0.03 mg/jour. Température -200...+300 °C. Utiles pour le stockage hermétique de produits chimiques et d'échantillons dans des pots en verre ou bien des appareils. S'adaptent aux pinces en plastique pour joints. La verrerie chimique pharmaceutique et organo-métallique et l'échantillonnage de chimie environnementale sont quelques-unes des nombreuses applications.



50 bagues en PTFE sur un tube pour un joint de 29 mm.  
L'anneau ne se déforme pas et est réutilisable.  
Prix : environ 25 Euros par paquet de 50 bagues PTFE.

Distributeurs et numéros  
de catalogue : (Aldrich, Carl Roth  
(Roth-Sochiel), Fisher Scientific,  
Quadrolab (Sodipro), VWR)  
[www.glindemann.net](http://www.glindemann.net)  
GLINDEMANN cherche  
un distributeur français en France.

