



**UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID
TLEMCEM**



Faculté des Sciences Département de Physique

THESE

Présentée par

M^{me} BOUABDELLA née DEMBAHRI Zahra

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHYSIQUE
OPTION : PHYSIQUE DES POLYMERES

THEME

**ELABORATION ET ETUDE DE PROPRIETES DES GELS ET MONOLITHES UTILISES
DANS LES SYSTEMES DE SEPARATION DES PROTEINES**

Soutenue le 25 juin 2013 devant le jury composé de :

M ^{elle} Amina NEGADI	Professeur à l' UAB de Tlemcen	Présidente
M ^{me} Majda Rahal	Professeur à l' UDL de Sidi Bel Abbès	Examinatrice
M ^f Hassen GUERMOUCHE	Professeur à l'USTHB d'Alger	Examineur
M ^f Mustapha BENMOUNA	Professeur à l' UAB de Tlemcen	Examineur
M ^f Boufeldja TABTI	Professeur à l' UAB de Tlemcen	Examineur
M ^f Christian ROLANDO	Directeur de recherche au CNRS et USTde Lille	Co-Directeur de thèse
M ^{me} Farida BENMOUNA	Professeur à l'UAB de Tlemcen	Directrice de thèse

SOMMAIRE

SOMMAIRE	i
REMERCIEMENTS	v
LISTE DES ABREVIATIONS	vi

INTRODUCTION GENERALE	1
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	9

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DES COLONNES CAPILLAIRES MONOLITHIQUES A BASE DE POLYMERES EN VUE DE LA SEPARATION DES PROTEINES	10
1. 1. INTRODUCTION	10
1. 2. PHASES MONOLITHIQUES	12
1. 2. 1. Phases monolithiques inorganiques	12
1. 2. 2. Préparation des monolithes organiques	13
1. 2. 3. Différentes familles de phases monolithiques organiques	16
1. 2. 3. 1. Monolithes à base de polystyrène-divinyl benzène	17
1. 2. 3. 2. Monolithes à base de polyacrylamide	18
1. 2. 3. 3. Monolithes à base de méthacrylates	20
1. 3. EFFETS DE CERTAINS PARAMETRES SUR LES PROPRIETES DES MONOLITHES	22
1. 4. QUELQUES APPLICATIONS DES MONOLITHES	31
1. 4. 1. Séparation des protéines	31
1. 4. 2. Applications en microfluidique	33
1. 4. 3. Autres applications	36

1. 5. PROPRIETES HYDRODYNAMIQUES	37
1. 5. 1. Effet de la nature de la phase mobile	38
1. 5. 2. Effet de la taille des pores	39
1. 5. 3. Effet de la géométrie et des dimensions de la colonne	40
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	42

CHAPITRE 2

SYNTHESE, CARACTERISATIONS DES COLONNES MONOLITHIQUES ET RESULTATS PRELIMINAIRES	47
---	----

2. 1. SYNTHESE ET CARACTERISATIONS DES COLONNES MONOLITHIQUES	47
2. 1. 1. Composition du mélange réactionnel	47
2. 1. 2. Préparation des colonnes	48
2. 1. 2. 1. Dimensions des colonnes	48
2. 1. 2. 2. Traitement de la surface du capillaire : silanisation	49
2. 1. 3. Polymérisation	50
2. 1. 4. Marqueurs fluorophores	51
2. 1. 5. Viscosité de l'éluant	52
2. 1. 6. Appareillages et techniques expérimentales utilisés	54
2. 1. 6. 1. L'Ultimate [®] 3000 de LC-packing [™] Dionex	54
2. 1. 6. 2. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	56
2. 2. MORPHOLOGIE A SEC : MEB	56
2. 2. 1. Effet de la concentration de l'agent réticulant EDMA	56
2. 2. 2. Effet de la composition du mélange porogène	58
2. 3. ETUDE MICRO FLUIDIQUE	59
2. 3. 1. Effet de l'agent réticulant	59
2. 3. 1. 1. Identification des colonnes préparées	59
2. 3. 1. 2. Etude microfluidique en mode statique	60
2. 3. 1. 3. Etude microfluidique en mode dynamique	70
2. 3. 2. Effet de la composition du porogène	74
2. 3. 2. 1. Identification des colonnes selon la composition du porogène	74

2. 3. 2. 2. Influence du porogène sur les propriétés microfluidiques	75
2. 4. TEMPS DE RETENTION	78
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	82

CHAPITRE 3

GELS DE POLYACRYLAMIDE RENFORCES AU DEXTRAN

3. 1. INTRODUCTION	83
3. 2. PARTIE EXPERIMENTALE	84
3. 2. 1. Produits utilisés	84
3. 2. 2. Préparation des échantillons	86
3. 2. 3. Techniques expérimentales	87
3. 2. 3. 1. Spectroscopie UV-Visible	87
3. 2. 3. 2. Cinétique de polymérisation: variation de la température	88
3. 2. 3. 3. Cinétique de gonflement	89
3. 2. 3. 4. Electrophorèse (SDS-PAGE)	89
3. 3. RESULTATS ET DISCUSSIONS	89
3. 3. 1. Cinétique de polymérisation	89
3. 3. 1. 1. Spectroscopie UV-Visible : cinétique de gélification	90
3. 3. 1. 2. Cinétique d'une polymérisation exothermique : profils de la température et effet Trommsdorf	92
3. 3. 2. Cinétique de gonflement	93
3. 3. 2. 1. Gonflement dans l'eau dé-ionisée	94
3. 3. 2. 2. Gonflement dans la solution tampon	95
3. 3. 3. Séparation des protéines en mode SDS-PAGE	96
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	100

CHAPITRE 4	
SYNTHESE DES GELS PAR LA METHODE DE SEPARATION DE PHASE INDUITE PAR LA POLYMERISATION: COMPORTEMENT THERMODYNAMIQUE ET EFFETS DES INTERACTIONS HYDRODYNAMIQUES	101
4. 1. INTRODUCTION	101
4. 2. PROCESSUS DE SEPARATION DE PHASE INDUITE PAR POLYMERISATION OU PIPS	102
4. 3. PROCESSUS DE DIFFUSION PAR LA METHODE DE L' EQUATION DE LANGEVIN	103
4. 4. EVOLUTION TEMPORELLE DE LA FONCTION DE DIFFUSION $S(q,t)$	105
4. 5. EFFETS DES INTERACTIONS HYDRODYNAMIQUES	107
4. 6. CINETIQUE DE POLYMERISATION	108
4. 7. APPLICATIONS	109
4. 7. 1. Evolution du comportement en phase: $\chi_s(t)$ vs $\chi_c(t)$	109
4. 7. 2. Relaxations des fluctuations et effets hydrodynamiques	111
4. 8. CONCLUSIONS	115
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	116
CONCLUSION GENERALE	118

REMERCIEMENTS

Cette thèse est le fruit d'une collaboration entre les Universités Aboubekr Belkaid de Tlemcen et des Sciences et Technologies de Lille, à travers le Laboratoire International Associé.

Je tiens tout d'abord à remercier M^{elle} Amina Negadi, Professeur à l'Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, d'avoir accepté de présider ce jury.

Mes plus vifs remerciements s'adressent également à M^{me} Majda Rahal, Professeur à l'Université Djilali Liabès de Sidi Bel Abbès pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je tiens à remercier aussi, Mr Hassen Guermouche, Professeur à l'USTHB d'Alger d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à M^r Boufeldja Tabti, Professeur à l'Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen d'avoir bien voulu faire partie de ce jury en tant qu'examinateur.

En particulier, je remercie M^r Mustapha Benmouna, Professeur à l'Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, de m'avoir aidé dans ce travail à travers des discussions constructives et enrichissantes.

Je remercie M^r Christian Rolando, Directeur de Recherche au CNRS, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir offert la chance d'apprendre et de travailler dans d'excellentes conditions.

Merci à M^{me} Farida Benmouna, Professeur à l'Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen pour la qualité de son encadrement, sa confiance et ses encouragements.

Je tiens à remercier ici chaleureusement toutes les personnes qui ont été présentes à mes côtés durant cette thèse, partageant mes difficultés mais aussi les immenses bonheurs de mes petites découvertes...

Enfin, un immense merci à ma famille de m'avoir épaulé durant toute la durée de mes études. Mes plus tendres remerciements à mon époux pour sa patience, son réconfort et ses encouragements sans lesquels ce travail n'aurait pu aboutir.

LISTE DES ABBREVIATIONS

AAm	Acrylamide
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AIBN	Azo bis isobutyronitrile
CyOH	Cyclohexanol
DVB	Divinyl benzène
EDMA	Ethylène glycol diméthacrylate
Et(OH)₂	Ethylène glycol
ECC	Électrochromatographie capillaire
EGDMA	Diméthacrylate d'éthylène glycol
EDTA	Acide ÉthylèneDiamine Tétraacétique
EC	Electrophorèse capillaire
FEO	Flux électro osmotique
GMA	Méthacrylate de glycidyle
GPC	Gel Permeation Chromatography
HEMA	Méthacrylate d'hydroxyéthyle
HMW	High Molecular Weight
IR	Infra rouge
2DGE	Gel Electrophorèse 2 Dimensions
LMA	Méthacrylate de Lauryl
LMW	Low Molecular Weight
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MALDI	Ionisation-désorption assistée par irradiation laser et une matrice
Nano-LC	Chromatographie en phase liquide travaillant avec des débits de l'ordre de quelques centaines de nanolitres par minute.
PAAm	Polyacrylamide

RP-HPLC	Chromatographie liquide phase inverse à haute performance
PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide
PDLC	Polymer Dispersed Liquid Crystals
PEG	Poly(éthylène glycol)
PIPS	Polymerization Induced Phase Separation
PS	Polystyrène
TEMED	<i>N,N,N,N'</i> -tétraméthylène diamine
TEMPO	2,2,6,6-tétraméthyl-1-piperidyloxy
THF	Tétrahydrofurane
UV	Ultra-Violet

INTRODUCTION GENERALE

Le mot protéine vient du grec et veut dire "premier rang", faisant allusion au rôle primordial d'acteur principal, joué par la protéine dans le monde du vivant. Chacun des processus biologiques engage une ou plusieurs protéines, montrant la nécessité d'étudier les propriétés régissant leurs modes de fonctionnement physico-chimiques et biologiques. Les protéines agissent pour le maintien et le renforcement des structures biologiques, comme le cytosquelette et les tissus de soutien. Elles permettent à notre système de défense, d'identifier et d'attaquer les corps étrangers. Elles transportent les aliments et l'oxygène vers les cellules. Les enzymes protéiques servent à la catalyse des réactions chimiques, d'autres ont une fonction motrice déterminant notre activité physique. Certaines protéines constituent les éléments de base, pour la transmission de l'information entre le cerveau et les différentes parties de notre corps.

Pour étudier leurs propriétés, les protéines devraient être séparées selon un processus à plusieurs étapes. Il faut d'abord prélever un échantillon du tissu en question, avant d'extraire les protéines, qui peuvent être séparées par chromatographie ou par électrophorèse sur gel. En chromatographie, les protéines sont séparées en jouant sur leurs migrations différentielles dans un milieu formé d'une phase fixe (gel poreux) et d'une phase mobile (éluant liquide). Elles sont séparées selon leur taille, la charge qu'elles portent ou par adsorption sélective. En électrophorèse, la séparation utilise la notion fondamentale du point obtenu à pH donné, et correspondant à un nombre égal de charges positives et négatives sur la chaîne. Après leur séparation, les protéines sont découpées en peptides ou acides aminés, dont il faut déterminer la composition chimique et en déduire la séquence. La structure tridimensionnelle de la chaîne sert à déterminer les mécanismes d'action et d'interaction au sein de la macromolécule.

Les acides aminés de la protéine sont reliés par des liaisons peptidiques. Il y a vingt acides aminés dans les protéines humaines, contenant une fonction amine (NH_2), une fonction

acide carboxylique (COOH), un hydrogène et une chaîne latérale R variable (Figure I. 1). Les liaisons peptidiques entre acides aminés sont formées par des réactions de condensation, entre les groupes carboxyles et amines des différents acides aminés. Les propriétés physico-chimiques des acides aminés, dépendent de la nature du groupement latéral R, qui peut être acide, basique, hydrophile ou hydrophobe.

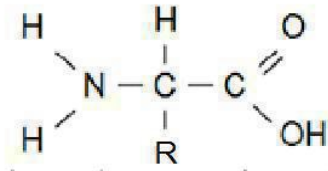


Figure I. 1: Formule générale d'un acide aminé.

Les protéines présentent quatre types de structure à complexité croissante (Figure 1. 2).

- La structure primaire correspond à la chaîne d'acides aminés propre à la protéine considérée.
- La structure secondaire est déterminée par les liaisons hydrogènes entre acides aminés voisins et peut être de type hélice α ou feuillet β .
- La structure tertiaire est tridimensionnelle et déterminée par une combinaison de la liaison hydrogène, des interactions hydrophobe / hydrophile et d'autres liaisons non covalentes.
- Une structure quaternaire peut exister à travers des complexations de sous unités et des liaisons non covalentes (hydrogène, ionique, hydrophile / hydrophobe, van der Waals).

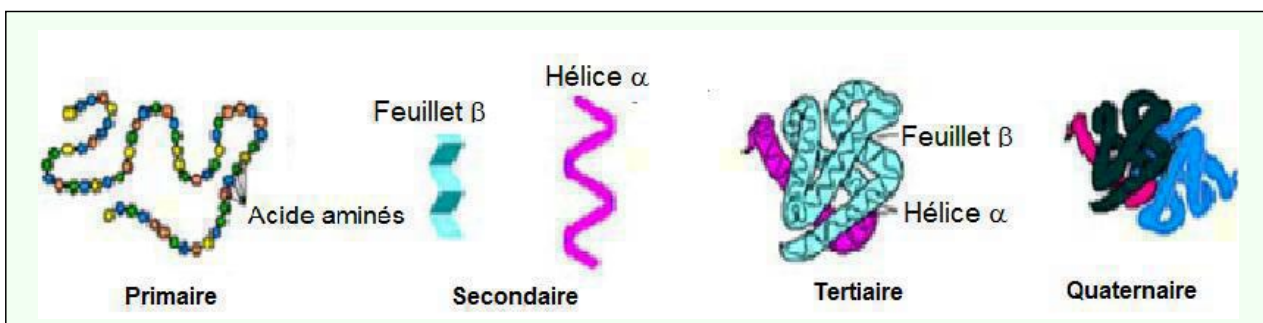


Figure I. 2 : Illustration des différentes structures des protéines.

On dénombre entre 20000 et 25000 types de protéines, alors que les modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, la phosphorylation et la glycosylation contribuent encore plus à leur diversité. Dans les conditions physiologiques, les protéines se présentent à l'état natif correspondant à une conformation compacte et de forme sphérique. La présence d'un surfactant ou la fixation sur un ligand provoque un changement de conformation. La rupture des interactions qui stabilisent leur conformation conduit à leur dénaturation et à la cessation de leurs fonctions biologiques. Un changement de pH de la solution ou de la force ionique, une augmentation de la température peuvent modifier les liaisons ioniques et hydrogènes entraînant un changement de conformation.

Il y a plusieurs familles de protéines selon leurs fonctions biologiques. Les hormones peptidiques sont des protéines de régulation, le collagène est constitué de protéines sous forme de fibres simples et résistantes à la traction engendrant la rigidité des cellules. Les immunoglobulines ou anticorps assurent la protection, l'hémoglobine est une protéine de transport. On peut également citer les protéines de la contraction musculaire, les enzymes, le plasma sanguin et les protéines du fluide biologique (albumine, fibrinogène). Le renforcement des membranes de protection, le transport d'oxygène, des peptides et d'autres molécules dans le sang, la contraction musculaire, la communication cellulaire sont des fonctions vitales qui existent grâce au rôle rempli par certaines protéines. Les protéines peuvent être à l'origine de nombreuses maladies, la formation du caillot sanguin est le résultat de l'action de fibres protéiques. Les bio-marqueurs sont formés de protéines spécifiques à l'origine d'un mauvais fonctionnement d'un organe ou du résultat d'un traitement. Le système immunitaire (anticorps), les enzymes, la neutralisation d'agents pathogènes sont parmi les rôles fondamentaux des protéines. C'est dire l'importance de la détection et de la séparation des protéines.

L'analyse de ces protéines constitue actuellement un défi majeur pour la recherche scientifique en vue d'élucider certaines maladies, de mettre au point de nouveaux médicaments agissant sur des protéines cibles présentes dans les tissus des malades. Trois grands types de techniques de séparation des protéines et des peptides sont couramment utilisés:

- L'électrophorèse sur gel : par focalisation isoélectrique (IEF, Isoelectric Focusing) ou au sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis).

- La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) : par échange d'ions, phase inverse ou exclusion stérique.
- L'électrochromatographie : électrophorèse capillaire (CE, Capillary Electrophoresis) et électrochromatographie capillaire (CEC, Capillary Electrochromatography).

L'une des méthodes d'analyse les plus courantes est celle connue sous l'acronyme SDS - PAGE (ou Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis). La version bidimensionnelle consiste en un gel orthogonal présentant deux types de séparations simultanées.

- La première dimension consiste à faire migrer les protéines selon leur point isoélectrique dans un gradient de pH. Les protéines se déplacent sous l'action d'un champ électrique jusqu'au point où le pH correspond à leur pI.
- La seconde dimension consiste à séparer les protéines selon leur masse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate. Le SDS est un tensioactif anionique qui se fixe sur les protéines et masque leur charge propre formant un complexe de charge négative. La séparation s'effectue alors en fonction de la masse des protéines, le gel de polyacrylamide servant de matrice de séparation.

Les deux dimensions sont indépendantes, donnant à cette technique une grande puissance de résolution pour de nombreuses espèces de protéines, qui sont identifiées par une coloration à l'aide du bleu de Coomassie, d'agents fluorescents, d'argent ou par marquage radioactif. Les protéines apparaissent comme des taches dites spots avec une intensité proportionnelle à leur quantité. Cependant, l'électrophorèse 2D présente des limites de résolution et ne permet pas de séparer toutes les protéines d'une cellule. En particulier, la séparation des protéines hydrophobes non solubles dans une solution aqueuse nécessite des techniques complémentaires. Ainsi, la chromatographie en phase liquide présente la possibilité de couplage avec la spectroscopie de masse et donne des résultats reproductibles de haute résolution.

La diversité des phases stationnaires (particulaires, monolithes ou tubes ouverts) et la variété d'éluants possibles (phase mobile) permettent la mise en œuvre de différents mécanismes d'interaction selon les besoins, en faisant intervenir soit les interactions par échange d'ions, les interactions de volume exclu ou d'exclusion stérique, les liaisons hydrogène de la phase stationnaire. Les phases monolithiques offrent des avantages par rapport aux phases particulières, sachant que leur fabrication est plus aisée et donnent ce

grandes performances séparatives.¹ Les monolithes forment une structure continue avec souvent une distribution bimodale de pores interconnectés. Les méso pores donnent au support une surface importante et les macropores permettent une grande perméabilité pour le mélange éluant / protéines et une perte de charge réduite dans les colonnes. L'un des avantages majeur de l'option monolithe dans le format capillaire, est le fait que la phase stationnaire soit greffée d'une façon covalente sur la surface du capillaire, évitant ainsi le recours aux frittés qui présente un grand inconvénient et des répercussions négatives dans le rendement des colonnes.^{2,3,4,5}

Les protéines sont le plus souvent séparées sur des colonnes monolithiques à base de poly(styrène-co-di vinyl benzène)^{6,7} (PS-DVB)) et de poly(butyle méthacrylate-co-éthylène di méthacrylate) pour la séparation en mode phase inverse. Une faible résistance à l'écoulement, permet une séparation à des débits élevés.⁸ L'électro chromatographie est une autre technique de séparation basée sur le principe du pompage électrocinétique. C'est une méthode de séparation hybride située entre la chromatographie et l'électrophorèse. Elle combine les interactions avec la phase stationnaire comme en chromatographie et l'écoulement d'un fluide sous l'effet d'un champ électrique comme en électrophorèse. Les phases stationnaires d'électro chromatographie ressemblent à celles de la chromatographie classique en présence de charges de surface produisant un flux électro osmotique.

La tendance actuelle est dans la miniaturisation des dispositifs de séparation et des échantillons à analyser. Cette tendance est dictée par la nécessité d'un gain de temps et de précision de l'analyse, de réduction du coût et de préservation des espèces rares (disponibles en très petites quantités) comme c'est le cas de certaines protéines. Des colonnes miniaturisées peuvent être mises au point sur des capillaires de silice ou de polymères (monolithes, tubes ouvert, polymères à empreintes moléculaires). Cette évolution des systèmes séparatifs vers la miniaturisation, a conduit à l'apparition de microsystèmes séparatifs comportant un réseau de canaux dont les dimensions sont typiquement de l'ordre de la dizaine de micromètres, au sein desquels une étape d'injection, suivie d'une étape de séparation et d'une étape de détection sont mises en œuvre. Ces laboratoires miniaturisés sont surtout utiles dans le domaine médical et servent à diagnostiquer certaines maladies.

D'autre part, comme les gels jouent un rôle de premier plan dans les techniques de séparation des protéines, il est utile de les présenter d'une façon succincte. Un gel est un état de la matière intermédiaire entre un liquide et un solide. Ils servent dans de nombreuses applications médicales, pharmaceutiques et peuvent être utilisés en ingénierie tissulaire

comme matériau de comblement (arthrose), en stimulant la prolifération cellulaire ou comme vecteur de principes actifs. Les tissus mous renfermant une grande quantité d'eau sont identifiés à des gels hydrosolubles ou simplement hydrogels. Les gels susceptibles de répondre d'une façon prévisible à certaines sollicitations externes sont parfois appelés "gels intelligents". Ces gels peuvent être sollicités sous plusieurs formes, comme un changement de température (chauffage ou refroidissement selon la nature du gel) l'application de forces de cisaillement, d'un champ électrique ou magnétique. Un exemple est dans le traitement du diabète où la variation du pH entraîne un gonflement important du gel donnant lieu au largage contrôlé d'insuline.

Dans ce travail, nous nous intéressons aux gels dans le contexte de la séparation des protéines et donc du transport de ces macromolécules à travers les mailles du réseau. Ceci implique que la taille de la maille doit être bien choisie et adaptée à la taille des protéines. La compatibilité entre le gel et ces protéines joue un rôle déterminant dans la séparation. En pratique et surtout pour des applications en chromatographie, des gels commerciaux sont utilisés. Les gels sont parfois mélangés à d'autres espèces macromoléculaires pour leur donner des propriétés spécifiques comme une plus grande tenue mécanique ou des propriétés optiques particulières. Partant d'une solution homogène de monomères, la gélification intervient lorsque les monomères voisins réagissent pour former des amas de plus en plus grands. Le taux de formation du réseau varie avec le temps et au point de gel, la solution de monomère initiale passe à l'état de gel. Dans les gels physiques, les nœuds de réticulation ne sont pas permanents et proviennent d'interactions physiques du même ordre de grandeur que l'agitation thermique. Ces aspects sont présents à travers les quatre chapitres que présente cette thèse.

Cette thèse comporte une partie importante portant sur l'étude des colonnes capillaires à base de polymères. La motivation réside essentiellement dans les tendances actuelles à concevoir des dispositifs de séparation des protéines miniaturisés et le développement rapide des études de protéomique.

Ainsi, le chapitre 1 est consacré à une revue bibliographique de ce développement en mettant l'accent sur les avantages présentés par les colonnes monolithiques à base de polymères. Comme on le constate sur cette revue, un grand nombre de travaux sont consacrés à ce sujet très récent et qui a connu des avancées significatives dans les dernières années. Nous passons en revue les différentes tentatives faites pour améliorer les performances séparatives des systèmes utilisés et diminuer toujours plus les tailles des dispositifs dans un souci de

précision, de ciblage des protéines rares, de limitation des coûts et des pertes d'échantillons et d'utilisation des solvants. Nous comparons les résultats des différentes études parues dans la littérature, nous analysons les effets des paramètres pertinents ayant une influence sur les performances et nous mettons l'accent sur les techniques de séparation qui s'apparentent à la chromatographie liquide. Nous accordons également un intérêt particulier aux aspects morphologiques à l'état sec par microscopie électronique, et à l'état humide en utilisant les modèles hydrodynamiques appropriés.

Le chapitre 2 est consacré à l'étude expérimentale des colonnes monolithiques à base de méthacrylate de lauryl (LMA) et leur caractérisation morphologiques et hydrodynamiques. La partie expérimentale montre la nature et la composition des mélanges utilisés, les méthodes de préparation des colonnes et en particulier la polymérisation in situ, les techniques de caractérisation utilisées. Ce chapitre se termine par la présentation de quelques résultats préliminaires. Les résultats détaillés de cette étude sont en cours d'analyse en vue d'une publication dans un journal spécialisé.

Les résultats préliminaires concernent d'abord une étude de morphologie à sec par microscopie électronique à balayage. Il s'agit en particulier de confirmer la nature poreuse des monolithes préparés. Une question importante concerne l'accrochage du monolithe à la paroi de la colonne après plusieurs passages de l'éluant sous pression. Après un traitement chimique adéquat de la paroi, le monolithe est supposé s'y greffer chimiquement, une vérification de l'état de ces parois par observation au MEB est donc nécessaire.

L'étude des propriétés hydrodynamiques est un aspect important de cette thèse. La composition du mélange de polymérisation, la nature (eau ou ACN) ou la composition (eau/ACN) de l'éluant ont été prises en compte à travers différentes colonnes préparés et protocoles d'injection de la phase mobile lors d'une expérience de séparation. Ces études ont permis de déterminer la perméabilité du monolithe, ainsi que le diamètre moyen des pores correspondant à différentes conditions expérimentales (composition de la phase mobile, débit utilisé, protocole d'injection de la phase mobile, composition du mélange de polymérisation). La publication en cours de préparation mettra l'accent sur cet aspect, puisqu'un phénomène inattendu et original a été mis en évidence et présentera un intérêt certain pour les chercheurs dans ce domaine.

Le chapitre 3a fait l'objet d'une publication⁹ qui porte sur la synthèse, la caractérisation et les applications en électrophorèse de gels de PAAM modifiés par l'ajout du polysaccharide

dextran pour améliorer la tenue mécanique, la résistance pendant les utilisations multiples et éventuellement les propriétés optiques. L'objet de ce travail était de trouver une alternance aux gels commerciaux comme le Duracryl dont la composition n'est pas connue d'une façon précise. En plus de la synthèse chimique de ces gels par une polymérisation radicalaire de type rédox en présence d'un mélange d'initiateur persulfate d'ammonium (APS) et de TEMED, les gels obtenus ont été caractérisés en mettant l'accent sur les effets de la masse molaire du dextran et sur sa concentration. La cinétique de polymérisation a été suivie en analysant la variation de l'absorbance en fonction du temps mesurée par spectroscopie UV-visible. Comme il s'agit d'une polymérisation exothermique, la cinétique de réaction a été également étudiée en mesurant la variation de la température en fonction du temps. Le gonflement des gels synthétisés a été analysé dans l'eau dé-ionisée et dans la solution tampon pour mimer le liquide physiologique dans lequel les protéines trouvent un milieu favorable pour leur solubilisation. Les applications des gels synthétisés ont été montrées en utilisant la technique de séparation des protéines connue sous l'acronyme anglais SDS - PAGE (Pour Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophores). Une large gamme de protéines ayant des petites masses à des grandes masses ont été utilisées comme marqueurs dans ces applications. La cinétique de polymérisation est décrite par un modèle simple dit de double réaction qui a l'avantage d'être soluble analytiquement. Il permet également de contrôler les effets des différents paramètres comme le paramètre de réaction, la température et la concentration en monomères dans le mélange initial. La cinétique de séparation de phases est décrite par un modèle de diffusion inspiré largement du modèle de Cahn-Hilliard-Cook développé dans le cas des alliages métalliques et adapté aux mélanges à base de polymères.

Le chapitre 4 met l'accent sur la compétition entre les cinétiques de polymérisation et de séparation de phase.¹⁰ Ces cinétiques sont modélisées à travers l'évolution temporelle du facteur de structure en temps réel contrairement à la technique de corrélation des photons. Cette étude est une extension aux polymères de la théorie de Cahn-Hilliard-Cook initialement conçue pour les alliages de métaux. Nous montrons en particulier les effets du couplage des modes hydrodynamiques sur la compétition des cinétiques de séparation de phase et de polymérisation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-
- [1] Szumski, M.; Buszewski, B. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2002**, 32, 1.
- [2] Ivanov, A. R.; Zang, L. ; Karger, B. L. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 5306.
- [3] Oberacher, H.; Huber, C. G. *Trends Anal. Chem.* **2002**, 21, 166.
- [4] Oberacher, H.; Premstaller, A.; Huber, C. G. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1030, 201.
- [5] Chen, H. S.; Rejtar, T.; Andeev, V.; Moskovets, E., Karger, B. L., *Anal. Chem.* **2005**, 77, 2323.
- [6] Jandera, P.; Urban, J.; Moravcová, D. *J. Chromatogr. A* 2006, 1109, 60.
- [7] Moore, R. E.; Licklider, L.; Schumann, D.; Lee, T.D. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4879.
- [8] Lee, D.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1051, 53.
- [9] Ain Sebaa, N.; Dembahri, Z.; Rolando C.; Benmouna, M. *Polym. Inter.* **2011**, 60, 1024.
- [10] Benmouna, F.; Bouabdellah-Dembahri Z.; Benmouna, M. *J. of Macromol.* **2012**, *Sci., Part B: Phys.*, DOI:10.1080/00222348.2012.748617.

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DES COLONNES CAPILLAIRES MONOLITHIQUES A BASE DE POLYMERES EN VUE DE LA SEPARATION DES PROTEINES

1. 1. INTRODUCTION

Trois grands types de techniques de séparation des protéines et des peptides sont couramment utilisés:

- L' électrophorèse sur gel : par focalisation isoélectrique (IEF, Isoelectric Focusing) ou au sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis).
- La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) : par échange d'ions, phase inverse ou exclusion stérique.
- L'électrochromatographie : électrophorèse capillaire (CE, Capillary Electrophoresis) et électrochromatographie capillaire (CEC, Capillary Electrochromatography).

La chromatographie en phase liquide (Liquid Chromatography ou LC) est une technique courante qui présente une possibilité de couplage avec la spectroscopie de masse. Elle donne des résultats reproductibles de haute résolution.

La diversité des phases stationnaires (particulaires, monolithes ou tubes ouverts) et la variété d'éluants possibles (phase mobile) permettent la mise en œuvre de différents mécanismes d'interaction selon les besoins en faisant intervenir soit des interactions par échange d'ions, des interactions de volume exclu ou d'exclusion stérique, des liaisons hydrogènes des phases stationnaires.

Nous nous intéressons dans cette partie de thèse à l'application des monolithes basée sur les propriétés micro-fluidiques des dispositifs de séparation miniaturisés. L'un des avantages majeurs de ces dispositifs réside dans la facilité de leur préparation en comparaison avec les phases particulières frittées qui nécessitent un contrôle de la densité de tassement en plus de

pressions plus élevées, puisque la phase est liée de façon covalente à la paroi interne du capillaire.

La technologie des phases particulaires s'est développée en premier avec les options d'électrochromatographie - capillaire (ou ECC) et de nano- chromatographie en phase liquide (ou CPL). La Figure 1. 1 montre que les colonnes des phases particulaires sont constituées de deux parties, une remplie de particules, la phase stationnaire et l'autre vide ou phase mobile caractérisée par un grand flux d'éluant. La détection est effectuée à l'entrée de la partie vide.

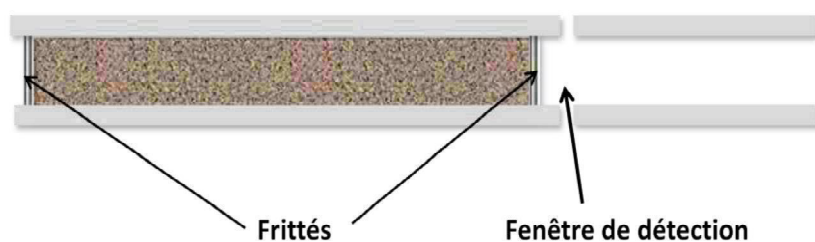


Figure 1. 1 : Schéma d'une phase particulaire remplie de billes.

La fabrication d'une colonne particulaire comporte une étape de remplissage sensible, souvent réalisée par force hydrodynamique pour obtenir une colonne homogène. Il est important de faire un choix judicieux de la nature du solvant, de la longueur de la colonne et de la taille des billes. Ces phases stationnaires sont le plus souvent immobilisées, au sein du capillaire, par des frittés fabriqués *in situ*. Ces frittés jouent un rôle important dans le maintien des phases stationnaires mais leur instabilité mécanique est insuffisante, l'apparition de bulles pourrait gêner leur utilisation en électro chromatographie. Il peut y avoir de plus des interactions indésirables entre ces frittés et les analytes, ce qui peut rendre leur application problématique.

Les performances de séparation des protéines dans ce cas dépendent de la qualité de remplissage des particules et du diamètre des billes. En diminuant ce diamètre on réduit le temps d'analyse avec cependant la possibilité d'une diminution de l'efficacité de séparation. Le flux d'éluant dépend de la taille des pores, il est amélioré par augmentation du transfert de masse intra-particulaire. Les billes (de silice par exemple) peuvent avoir des chaînes de polymère greffées interagissant avec les protéines et donnant lieu au processus de rétention.

1. 2. PHASES MONOLITHIQUES

Les phases monolithiques sont des phases continues et homogènes et se présentent sous forme d'une seule structure comme un monolithe. Dans la composition, il existe trois types : inorganiques (à base de silice habituellement), synthétiques (poly méthacrylate, polyacrylamide, polystyrène divinyl benzène) et naturels (agarose ou cellulose). Leur porosité peut être bimodale (mésopores et micropores) ou monomodale. Une macroporosité de l'ordre de 100µm peut même être possible par l'utilisation de cryogels dans lesquels le porogène est de la glace.

Actuellement, les monolithes peuvent être synthétisés in situ dans différentes géométries (disques, tiges ou colonnes capillaires) et peuvent avoir des tailles comprises entre plusieurs litres¹ à quelques nano litres dans le canal d'une puce micro fluidique.² Les phases monolithiques offrent plusieurs avantages par rapport aux phases particulaires, elles permettent d'obtenir des performances séparatives intéressantes et leur fabrication est plus facile.³

Comme nous venons de le dire, les monolithes présentent une structure continue et montrent généralement une distribution bimodale de pores interconnectés. Les mésopores ou micropores permettent d'attribuer au support une surface importante alors que les macropores permettent une grande perméabilité pour le mélange éluant / analytes et donc une perte de charge réduite pour l'utilisation de colonnes. De tels milieux ouvrent la voie à des analyses efficaces et des transferts de masse rapides entre les analytes (protéines dans le cas présent), la phase stationnaire et la phase mobile. En format capillaire, la phase stationnaire monolithique est greffée d'une façon covalente sur la surface du capillaire, ce qui constitue un avantage majeur en permettant d'éviter le recours aux frittés. Ceux-ci ont un grand inconvénient et des répercussions négatives dans le rendement des colonnes.

1. 2. 1. Phases monolithiques inorganiques

Le groupe de Tanaka a été le premier à développer les colonnes monolithiques inorganiques à base de silice.^{4,5,6} Ces colonnes ont été préparées en utilisant un nouveau procédé sol-gel basé sur l'hydrolyse et la polycondensation du tétraméthoxy silane (TMOS) en présence d'oxyde de polyéthylène (PEO). La séparation de phase durant l'étape de polycondensation conduit à un monolithe ayant une structure bi continue caractérisée par des macropores et des mésopores. Les premières colonnes poreuses à base de silice avaient

environ 7 mm de diamètre et 83 mm de long. Ces premières colonnes ont montré des propriétés chromatographiques intéressantes ayant simultanément une perméabilité et une performance élevées.

La Figure 1. 2 montre la structure typique d'un monolithe à base de silice obtenue par SEM. Cette structure poreuse est caractéristique avec les macropores et les mésopores. Les tailles des macropores et des mésopores peuvent être contrôlées indépendamment en contrôlant la composition du mélange de départ c'est -à-dire la concentration des silanes tels que le TMOS pendant le processus de préparation.⁷ La porosité des monolithes à base de silice est très supérieure à celle des colonnes particulaires.⁸ La porosité totale de ces monolithes est d'environ 85% ce qui est d'environ 15 - 20 % supérieur à celle des colonnes remplies de particules de 5 μ m.⁹

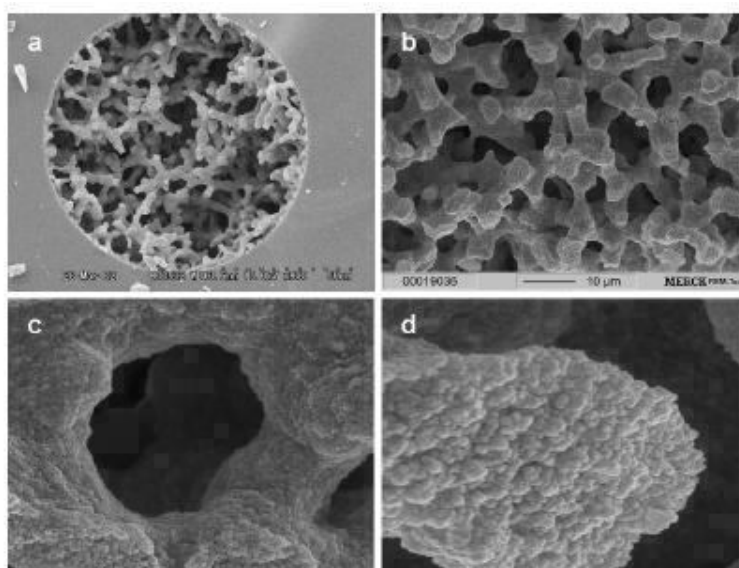


Figure 1. 2 : a) et b) Structures poreuses des monolithes de silice. c) Les macropores qui permettent un écoulement rapide de la phase mobile à faible pression (Leur taille moyenne est de 2 μ m). d) Les micropores forment la structure fine poreuse (Leur taille moyenne est de 13 nm).¹⁰

1. 2. 2. Préparation des monolithes organiques

En comparaison avec les monolithes à base de silice, la fabrication des monolithes organiques à base de polymères par le processus de moulage “moulding process” est simple et relativement directe.^{11,12} La fabrication est réalisée en employant une approche de

polymérisation à une étape au cours de laquelle les composés suivants sont nécessaires: des monomères fonctionnels (avec une ou deux doubles liaisons) des réticulants (avec deux ou plus doubles liaisons) qui forment le squelette du monolithe et déterminent la polarité du monolithe final, des solvants porogènes pour déterminer la distribution de la taille des pores, et un initiateur pour initier la polymérisation. Ces composés sont mélangés dans un rapport approprié, et dégazés avec de l'azote afin d'éliminer l'oxygène présent en solution.^{13,14,15,16} Les propriétés structurales de ces monolithes peuvent être influencées par différents facteurs tels que les conditions de polymérisation, i. e. la température de polymérisation, la concentration en réticulants et la qualité thermodynamique du porogène.^{17,18,19}

La fabrication des monolithes organiques à base de polymères suit le schéma simple illustré sur la Figure 1. 3.¹²

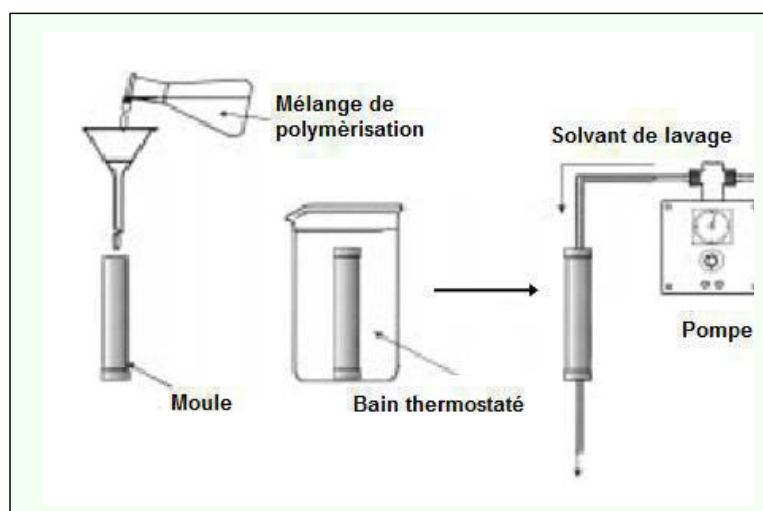


Figure 1. 3 : Préparation de monolithes macroporeux par un procédé de moulage “molding process”¹²

Le moule est scellé à une extrémité, rempli par le mélange de polymérisation, désoxygéné et ensuite scellé à l'autre extrémité. La polymérisation est alors initiée. Quand elle est terminée, la colonne est ouverte à une extrémité et reliée à une pompe pour le lavage du monolithe avec une quantité abondante de solvant organique afin d'en éliminer le porogène ou tout autre composé qui n'a pas réagi.^{20,21}

Pour la préparation de ces monolithes à base de polymères une vaste gamme de matériaux a été utilisée, tels que des tubes en acier inoxydable, en PEEK

(Polyétheretherketone), et en verre.²² En plus du tube, les monolithes à base de polymères ont été préparés dans des moules de différentes formes tels que les puces microfluidiques, les seringues, ou les bouts de pipette. La préparation de monolithes cylindriques avec une structure poreuse homogène et un diamètre entre 10 et 25 mm est facilement réalisée en une seule étape de polymérisation alors que des tailles plus grandes sont plus difficiles à préparer.¹²

Le moule pourrait nécessiter un traitement approprié de ses parois pour un attachement éventuel du monolithe aux parois. Cette étape est cruciale à la stabilisation du monolithe dans le moule. Par exemple, un capillaire en silice est traité avec le 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate (TMSPM) avant l'étape de polymérisation.^{23,14}

Le processus de polymérisation dans la préparation des colonnes monolithes peut être décrit comme suit. D'abord, la réaction est initiée par la décomposition de l'initiateur pour former un radical libre activé. Nous avons décrit au chapitre 2 comment la solubilité du mélange décroît à mesure que la polymérisation évolue dans le temps et la taille des polymères formés augmente. A un certain temps, les chaînes de polymères s'agrègent pour donner des noyaux. A cet instant, le monomère peut devenir meilleur solvant que le porogène vis-à-vis des noyaux ce qui explique pourquoi ces noyaux gonflent. A mesure que la polymérisation avance la taille des noyaux augmente donnant des amas appelés microglobules qui peuvent réticuler entre elles pour former la morphologie finale du réseau monolithique. La phase porogène donne lieu à ce qui est appelé macropores.²⁴

Il est à noter que l'initiation du processus de polymérisation peut être réalisée de différentes manières dont les plus fréquentes sont l'augmentation de température, l'irradiation par les rayonnements UV, gamma, bombardement électronique ou simplement par ajout d'un composé chimique.

Si la polymérisation est initiée par rayonnement UV, la morphologie des monolithes obtenus est plus homogène.^{25,26} Ce type de polymérisation a lieu en général à température ambiante contrairement à la réaction initiée par chauffage²⁴ et donc le recours aux solvants volatiles tels que l'éthanol, le tétrahydrofurane, l'acétonitrile, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, et l'hexane agents porogènes est possible. De plus, le monolithe peut être synthétisé en un temps court qui est de l'ordre de quelques minutes dans un capillaire de silice, ou dans des canaux à puces microfluidiques,²⁷ Les propriétés du monolithe dépendent de l'intensité de la lampe UV, Il faut cependant choisir un support capillaire qui soit transparent aux rayonnements UV.^{28,29}

D'autres initiations par irradiation sont possibles comme les rayons gamma ou le bombardement électronique mais ces options sont plus rares à cause des mesures de protection qu'elles nécessitent.^{24,16} Ce type de polymérisation présente l'avantage majeur de ne pas nécessiter la présence d'un initiateur et de produire des radicaux libres à partir des monomères présents dans le mélange initial.^{24,30,31,32}

L'utilisation d'un agent chimique comme initiateur tels que le peroxydisulfate d'ammonium avec le *N,N,N',N'*-tetraméthyléthylènediamine à température ambiante est la voie la plus ancienne¹⁶ pour la préparation de monolithes à base de poly(butyl méthacrylate).³³

Les monolithes à base de polymères ainsi obtenus montrent une faible résistance au transfert de masse et permettent d'atteindre des vitesses de séparation élevées. Ils ont une aire spécifique élevée en comparaison avec les phases particulières et ne possèdent pas de volume interstitiel. Cette caractéristique de structure monolithique leur a valu l'utilisation d'une nomenclature riche comme 'continuous polymer bed', 'macro porous polymer membrane', ou encore 'continuous polymer rod's'.

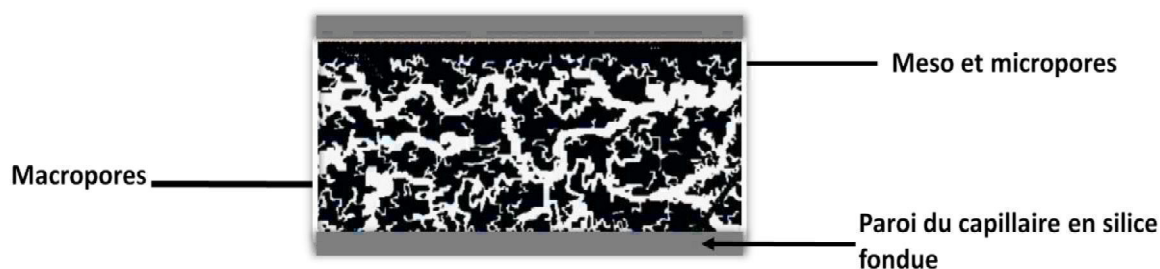


Figure 1. 4 : Représentation d'une colonne monolithique à base de polymère. Adapté de la référence 34.

1. 2. 3. Différentes familles de phases monolithiques organiques

Les monolithes organiques résultent de la réticulation et de la polymérisation de monomères organiques comme des acrylates, des acrylamides, des styrènes ou des divinyl benzènes. Une grande variété de monomères est disponible donnant lieu à un choix quasi-illimité de matrices. Ce type de monolithes en développement depuis 1993²², présente également l'avantage d'être réalisé à partir d'un processus de polymérisation simple, peu coûteux et rapide. La porosité et la fonctionnalisation peuvent être ajustées en modifiant la composition du mélange initial et le polymère obtenu reste stable même dans des conditions

extrêmes de pH³⁵. Ces colonnes monolithiques sont classées en quatre groupes principaux, suivant le type de monomère utilisé:

- Monolithes à base de styrène-co-divinylbenzène fortement hydrophobes et préparés par polymérisation de styrène et ses dérivés, avec le divinylbenzène comme agent réticulant.^{36,37,34,38}
- Monolithes non-polaires préparés par polymérisation vivante et offrant une surface flexible pour le greffage de ligands chromatographiques variés comme par exemple, les matériaux à base de norbornène et réticulés par l'hexahydrodiméthanonaphthalène.^{39,40}
- Monolithes modérément polaires à base d'ester d'acide méthacrylique synthétisés par polymérisation du butyl méthacrylate ou autres esters d'acide méthacrylique avec l'éthylène diméthacrylate comme agent réticulant.
- Monolithes fortement polaires à base d'acrylamide obtenus par co-polymérisation d'acrylamide, méthacrylamide, ou leurs dérivés avec un agent réticulant, comme le méthylène bisacrylamide ou le diacrylamide pipérazine.

1. 2. 3. 1. Monolithes à base de polystyrène-divinyl benzène

Les premières colonnes monolithiques organiques à base de poly-(styrène-divinylbenzène) ont été introduites par Tennikova et al. en 1991.⁴¹ Quelques années plus tard, Hjertén et al.⁴² ont suggéré la fabrication de colonnes capillaires à base de polystyrène-divinylbenzène. Le mélange à polymériser contient le styrène et le divinylbenzène, un solvant porogène comme le méthanol, l'éthanol, le propanol, le toluène, le formamide ou l'azobisisobutyronitrile (AIBN) comme initiateur. La réaction de polymérisation est thermiquement induite et a lieu généralement à 70°C pendant 24 heures. Afin d'assurer un ancrage covalent, les parois du capillaire sont silanisées en utilisant une solution de diméthyl formamide à 50% de 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate à la température de 120°C pendant 6 heures. Le micrographe (SEM) de la Figure 1. 5B montre la structure poreuse bimodale classique des monolithes obtenus.

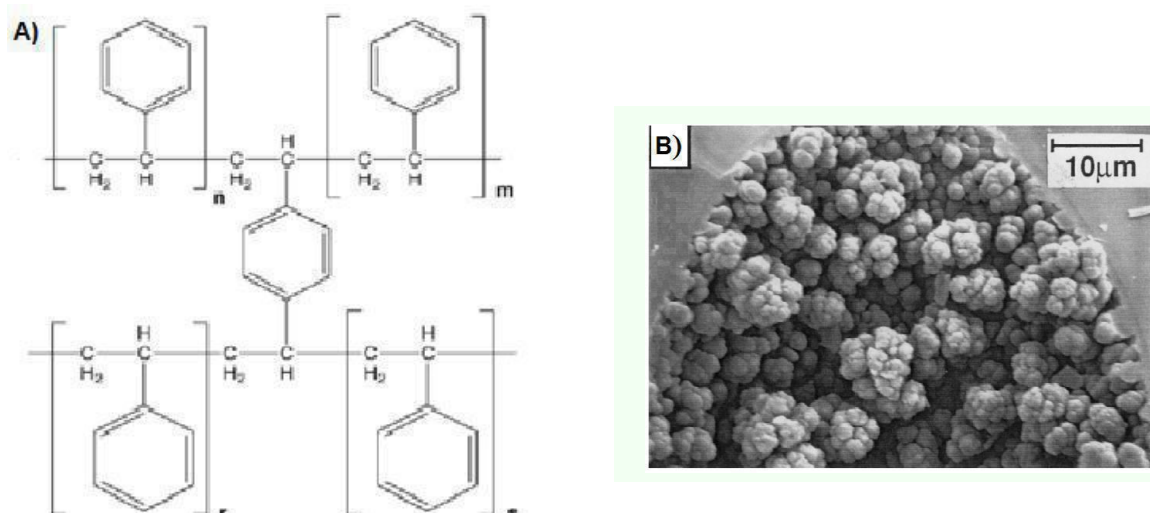


Figure 1. 5 : A) Structure chimique d'un monolithe fortement hydrophobe à base de polystyrène.¹⁶ B) SEM micrographe de monolithes à base de poly(styrène-co-divinylbenzène)⁴² fortement hydrophobe.

Mehrar et al.⁴³ ont décrit la préparation d'un nouveau support monolithique sous forme de disque, de longueur 3mm et de diamètre 12mm, basé sur le styrène-divinylbenzène (déposé sous la marque CIM[®] RP-SDVB disk). Testées en chromatographie en phase inverse, ces colonnes ont montré de bonnes performances, elles ont en effet permis la séparation de quatre protéines tests en moins d'une minute.

Récemment Carbonnier et al.⁴⁴ ont préparé des phases stationnaires monolithiques au format capillaire, à base de styrène et divinylbenzène (PS-DVB), pour des applications en électrochromatographie capillaire. Leur stratégie de synthèse, qui se basait sur une approche de réseau polymère semi interpénétré (semi-IPN), était initiée par UV en présence du poly(ϵ -caprolactone) (PCL) comme agent porogène.

1. 2. 3. 2. Monolithes à base de polyacrylamide

Les premières colonnes monolithiques utilisées en CEC contenaient un gel de polyacrylamide, imitant ceux utilisés en gel électrophorèse capillaire⁴⁵. Typiquement, le capillaire est rempli avec une solution aqueuse contenant des monomères à base d'acrylamide, un agent réticulant (monovinyl ou divinyl) ainsi qu'un initiateur composé de persulfate d'ammonium et de TEMED (N,N,N',N'-tétraméthylène diamine). Une fois le mélange introduit dans le capillaire, la réaction de polymérisation a lieu à température ambiante pendant la nuit. Ces gels sont très souples, car ils sont souvent formés de longues chaînes peu

réticulées. Le monolithe obtenu est alors fortement gonflé et contient rarement plus de 5% de polymère solide. La Figure 1. 6 montre la structure chimique d'un monolithe à base de polyacrylamide fortement polaire.

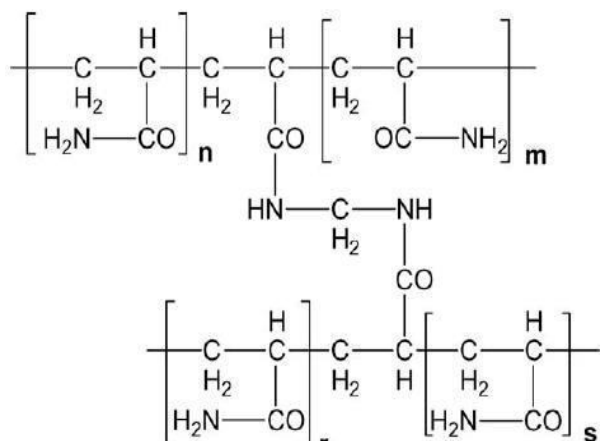


Figure 1. 6: Structure chimique d'un monolithe à base de polyacrylamide fortement polaire.¹⁶

Fujimoto et al.⁴⁶ ont polymérisé une solution aqueuse d'acrylamide, méthylène bisacrylamide, et acide 2-acrylamido-2-méthyl-1-propanesulfonic (AMPS) dans le confinement d'un capillaire. Malgré l'absence d'attachement chimique aux parois interne du capillaire, ces gels réticulés ont montré une bonne stabilité physique. Bien que des efficacités de plus de 150,000 plateaux/m aient été observées pour la séparation d'acétophénone, leurs temps de rétention étaient trop longs. Se basant sur ces résultats, les auteurs ont conclu que le mécanisme de séparation qui prévalait reposait sur un phénomène de tamisage plutôt qu'une interaction des cétones avec la matrice.⁴⁷ En remplaçant l'acrylamide hydrophile par le *N*-isopropylacrylamide hydrophobe, et en fonctionnalisant la surface interne du capillaire avec le 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate, le gel monolithique fut attaché au capillaire de manière covalente. L'éluion par électrochromatographie d'analytes hydrophobes sur cette colonne a nécessité l'utilisation de solutions aqueuses tampon/acétonitrile.⁴⁸ Des améliorations dans la séparation par rapport au travail décrit précédemment ont été observées avec ces colonnes. Cela a été confirmé par les temps de retentions plus courts et les efficacités élevées obtenues (160,000 plateaux/m) lors de la séparation de divers stéroïdes.⁴⁸ La séparation de composés hydrophobes usant cette phase stationnaire faite d'un gel de polymère avait tous les attributs d'une chromatographie de phase inverse et non pas celle d'une

chromatographie d'exclusion de taille en contraste avec le gel de polyacrylamide utilisé au début.

Palm et Novotny⁴⁹ ont développé une méthode permettant la synthèse des monolithes de polyacrylamide comportant des chaînes hydrophobes (C4, C6 ou C12) en présence de N-méthyle formamide pour obtenir une solution de polymères homogène constituée d'acrylamide, acide acrylique, méthylène bis acrylamide, et alkyl acrylates. L'addition de Poly(oxy-éthylène) a aidé pour produire des colonnes hautement efficaces.

Un peu plus tard, Hjertén et al.⁵⁰ ont mis au point une méthode pour la préparation de monolithes à base d'acrylamide fortement réticulés. Le mélange de polymérisation consiste en une solution aqueuse d'acrylamide, pipérazine diacrylamide et d'acide vinylsulfonique.

Pour contrôler l'hydrophobicité, des méthacrylates de butyle ou stéaryle sont aussi ajoutés. Ces deux composés étant insolubles dans l'eau, un surfactant est ajouté avant l'émulsification par sonication. L'émulsion est ensuite placée dans un capillaire (75 ou 100 μm) et laissée jusqu'à la fin de la réaction.

1. 2. 3. 3. Monolithes à base de méthacrylates

La préparation de monolithes à base de polyméthacrylates en format capillaire est simple et rapide. Le capillaire est rempli par le mélange réactionnel, scellé aux deux extrémités par des bouchons en caoutchouc avant l'initiation de la réaction de polymérisation par augmentation de la température ou par irradiation UV.¹³

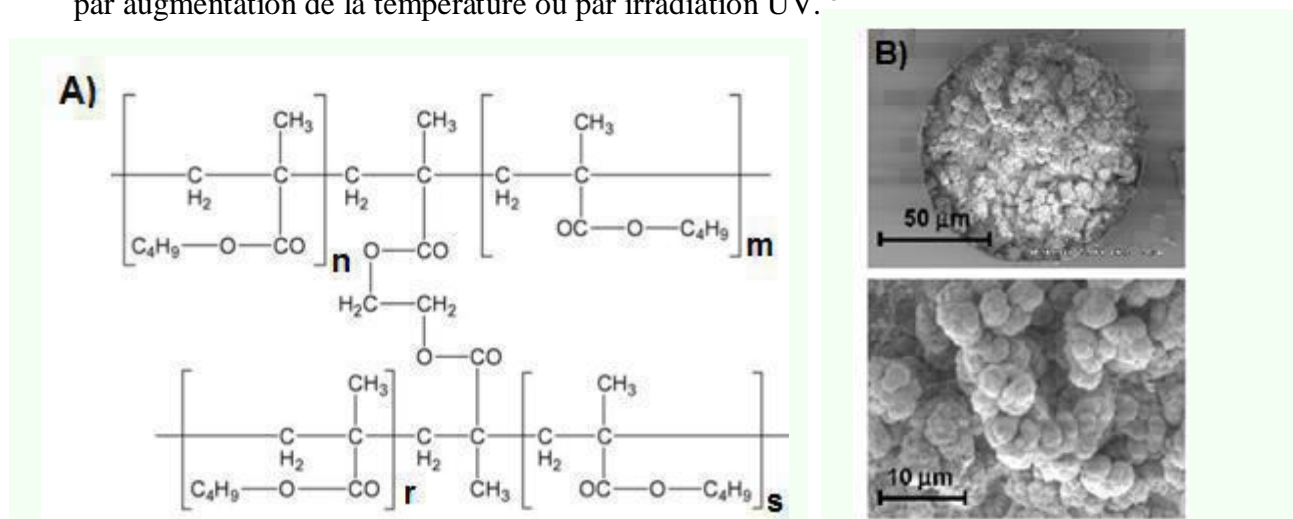


Figure 1. 7 : A) Structure chimique d'un monolithe à base de poly(butyl méthacrylate) moyennement polaire.¹⁶ B) SEM micrographes de monolithes à base poly(butyl méthacrylate-co-éthylène diméthacrylate) préparés dans une colonne capillaire de diamètre interne 100 μm .⁸⁵

Le monomère fonctionnel dans le mélange de polymérisation contrôle la polarité du monolithe obtenu; l'agent réticulant (un monomère avec deux ou plus liaisons) et le solvant porogène déterminent la taille et la distribution des pores.

Vlakh et Tennikova²⁴ ont publié une revue détaillée sur la préparation et la fonctionnalisation des monolithes à base de poly méthacrylate. Ces monolithes sont préparés généralement par polymérisation radicalaire libre⁵¹ initiée par chauffage,^{52,53} radiation UV,^{25,26} radiation gamma,³⁰ ou agents redox.⁵⁴ Le di-nitrile ou les initiateurs azo tels que le 2,2'-azo-bis-isobutyronitrile (AIBN) requièrent des températures entre 60 et 80°C pour se décomposer avec la formation de radicaux libres.

Coufal et al.⁵⁵ ont préparé des colonnes monolithiques au format capillaire (diamètre interne égal à 320 µm) par polymérisation radicalaire du butyl méthacrylate (BMA) et d'éthylène diméthacrylate (EDMA) en présence de solvants porogènes contenant le propane-1-ol, le butane-1,4-diol et l'eau. Ces colonnes ont été testées dans la séparation par chromatographie liquide capillaire (CLC) de composés polaires et hydrophobes. Leur performance a été optimisée en fonction de la composition du mélange de polymérisation.

Récemment, Cantó-Mirapeix et al.⁵⁶ ont préparé des phases monolithiques stationnaires pour l'électrochromatographie capillaire (diamètre externe 375 µm et diamètre interne 100 µm) en utilisant deux monomères, le butyl méthacrylate (BMA) et le lauryl méthacrylate (LMA), par polymérisation in situ dans un milieu non-aqueux en présence de 1,4-butanediol et de 1-propanol comme solvant porogène. Une comparaison des performances des colonnes préparées a été réalisée pour les monolithes faits à partir d'un seul monomère (BMA ou LMA) et du mélange BMA-LMA. Les auteurs ont montré que ces monolithes mixtes avaient des efficacités et des temps d'analyse satisfaisants par rapport aux monomères seuls, et constituaient des alternatives attractives pour moduler les propriétés chromatographiques et poreuses des phases stationnaires méthacrylates appropriées en CEC.

L'éthylène diméthacrylate (EDMA) peut être considéré comme le réticulant le plus utilisé pour la préparation de monolithes rigides macroporeux à base de méthacrylate copolymérisé le plus souvent avec le butyl méthacrylate, glycidyl méthacrylate, et hydroxyéthyl méthacrylate.^{57,58,59,60} Des alternatives à l'EDMA sont le diéthylène et le triéthylène glycol diméthacrylates (DEGDMA et le TEGDMA, respectivement),^{61,62} le triméthylolpropane triméthacrylate (TRIM)^{61,63,64} le glycérol diméthacrylate (GDMA)^{65,67} ou le 1,4-butanediol diméthacrylate (BDDMA) Parfois, un mélange de réticulants est utilisé pour

la préparation de monolithes méthacrylates. Par exemple, Courtois et al.^{61,66} ont proposé la préparation de monolithes à base de poly-(GMA-co-TEGDMA-co-TRIM). L'avantage du DEGDMA et du TEGDMA est la présence de chaînes di ou tri éthylène glycol dans leurs structures qui assurent une bonne flexibilité au réseau. Ceci permet d'éviter l'endommagement du matériau causé par la tension interne durant la polymérisation ou lors du choc osmotique dû à un gradient de concentration en sel élevé, grande variation de pH, ou la présence de solvants organiques.

1. 3. EFFETS DE CERTAINS PARAMETRES SUR LES PROPRIETES DES MONOLITHES

La morphologie des monolithes est contrôlée par le type d'initiation (photochimique ou chimique), la qualité du solvant porogène, le pourcentage du monomère réticulant, du rapport entre le monomère et les solvants porogènes et la température de polymérisation qui affecte la taille moyenne des pores dans un large intervalle allant de quelques dizaines à quelques microns.

Dans le cas d'une polymérisation initiée par irradiation, on peut contrôler les propriétés structurales du monolithe en faisant varier la dose et le débit de la radiation incidente. En augmentant ce dernier, on augmente le taux de formation des radicaux libres ce qui entraîne une accélération de la polymérisation et de la réticulation et par conséquent une taille plus grande des pores.²⁴ La dose optimale se situe généralement autour de 20 à 40 kGy, alors que le débit de dose se situe autour de 10 et 16 kGy/h.³⁰

La morphologie du monolithe dépend aussi de la nature de l'agent chimique utilisé comme initiateur. A titre d'exemple, les températures de décomposition du dinitrile ou des azo initiateurs comme l'AIBN sont comprises entre 60 et 80°C. Une polymérisation initiée par le peroxyde di-benzoyl à 60-140°C donne des monolithes avec des pores plus larges qu'avec l'AIBN, du fait de sa décomposition plus lente. Le remplacement de l'AIBN par le 2,2'-azo bis(2,4-diméthyl)valéronitrile (ADVN) donne lieu à une diminution du nombre de petits pores et donc à une diminution de la surface totale du monolithe.⁶⁷

Le facteur le plus important qui permet d'obtenir la propriété poreuse désirée d'un polymère monolithe est le choix des solvants porogènes et leur proportion dans la phase organique.⁶⁷ Alors que la variation des autres paramètres tels que le rapport entre le monomère et le réticulant ou le type d'initiateur peut changer la composition et la rigidité du monolithe, modifier le porogène affecte seulement la structure poreuse du polymère final. Le

mécanisme de la formation des pores utilisant un porogène peut être décrit de la manière suivante. Le porogène est bon ou mauvais solvant pour le polymère. La polymérisation a lieu dans une solution initialement homogène jusqu'à ce que les chaînes réticulées croissent et précipitent. Si le porogène est un bon solvant pour le polymère formé, la séparation de phase a lieu plus tard et les pores formés sont petits.^{17,68,69}

Un changement dans la composition du porogène affecte la solvation du polymère au début de la polymérisation. En effet, si un mauvais solvant pour les chaînes de polymère est utilisé, la séparation de phase est précoce. Les nuclei formés lors de la polymérisation gonflent avec les monomères puisque ceux-ci sont thermodynamiquement meilleurs solvants pour le polymère que le solvant porogène. La concentration locale des monomères est plus importante dans les nuclei et donc la polymérisation a lieu essentiellement au sein des nuclei plutôt qu'en solution. Ces nuclei coalescent pour donner des globules de taille supérieure. Ces derniers peuvent aussi absorber de nouveaux petits nuclei. Les globules qui forment la structure monolithique sont, dans ce cas plus gros et séparés par de plus larges pores. Si, au contraire, la qualité du solvant s'améliore, il entre en compétition avec les monomères dans la solvation des nuclei. La concentration locale des monomères est plus faible et les globules formés sont plus nombreux et plus petits que dans le cas précédent. Cette fois la distribution de la taille des pores est caractérisée par une grande proportion de micropores.

Le choix de la nature du porogène doit donc être basé sur l'analyse des paramètres de solubilité du monomère et du solvant. Par exemple, si le DEGDMA (diéthylène glycol diméthacrylate) est utilisé comme réticulant, son paramètre de solubilité DEGDMA étant égal à 8.5H,⁷⁰ celui des solvants portés sur le Tableau 1.1 fait d'eux de bons solvants pour ce polymère.

Tableau 1. 1 : Paramètres de solubilité pour certains solvants utilisés comme agents porogènes et se comportant comme bon solvants pour le DEGDMA.⁷⁰

Solvant	Acétone	THF	Ethylène propionate	Ethylène acétate
δ	9.9	9.1	8.4	9.1

Par contre, les solvants dont les paramètres de solubilité δ sont portés sur le Tableau 1. 2 peuvent être considérés comme mauvais solvants pour le DEGDMA. En effet, comme résultat, des monolithes préparés en utilisant le méthanol comme solvant porogène avaient un diamètre de pores de $3\ \mu\text{m}$ fournissant les meilleures caractéristiques d'écoulement t^{71} (flow-through)

Tableau 1. 2 : Paramètres de solubilité pour certains solvants utilisés comme agents porogènes et se comportant comme mauvais solvants pour le DEGDMA.⁷⁰

Solvant	méthanol	éthanol	2-propanol	Tert-butanol
δ	14.5	12.7	11.5	10.5

Courtois et al.⁶⁶ ont proposé l'utilisation du poly(éthylène glycol) (PEG) comme solvant porogène pour obtenir un support monolithique biocompatible. L'idée était de produire un support avec des pores larges et compatibles avec les protéines ne provoquant pas la dénaturation ou un changement de conformation des protéines séparées. Ces auteurs ont utilisé des échantillons de PEG de 1.5 à 20 kDa dissous dans une solution de 2-méthoxy éthanol et une série de co-porogènes. La masse moléculaire du PEG a une grande influence sur la surface et la distribution de la taille des pores comme le montre la Figure 1. 8.

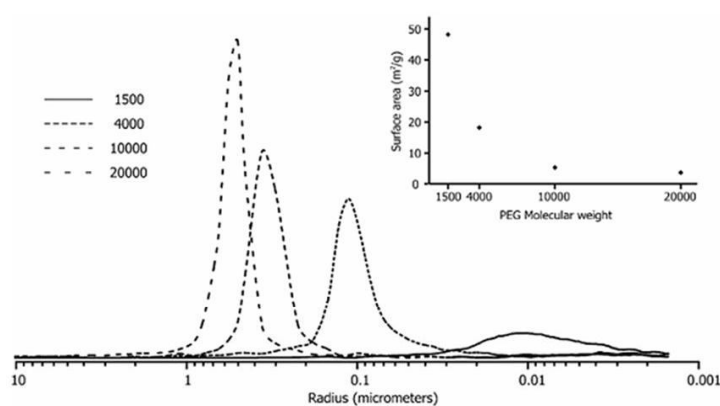


Figure 1. 8: Distribution de la taille des pores et surface des monolithes préparés avec le mélange de porogènes PEG/2-méthoxy éthanol.⁶⁶

La Figure 1. 8 consiste en fait généralement en une distribution bimodale des pores. Les mésopores assurent au support une grande surface alors que les macropores assurent la perméabilité recherchée. Le transfert de masse est rapide permettant d'améliorer l'efficacité de séparation. La grande perméabilité entraîne une faible perte de charge sur de longues colonnes et donc des débits plus élevés améliorant la performance de séparation.⁶¹

Des monolithes formés de glycidyl méthacrylate-co-éthylène diméthacrylate poly(GMA-co-EDMA) sont souvent préparés avec un mélange porogène comprenant le cyclohexanol (microporogène) et le dodécanol (macroporogène). Une augmentation de la quantité de dodécanol dans le mélange porogène de 6 à 12% permet l'augmentation de la taille moyenne des pores qui passe de 91 à 283 nm à 70°C.⁶⁹ (Figure 1. 9).

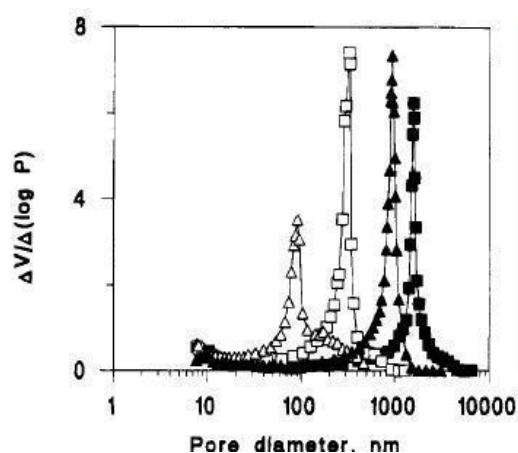


Figure 1. 9 : Profils de distribution de la taille des pores obtenus pour des colonnes monolithiques à base de poly(glycidyl méthacrylate-co-éthylène di méthacrylate) préparées à partir de mélanges contenant 6% (▲,△) et 12% de dodécanol (■,□) par polymérisation à 55°C (symboles pleins) et 70°C (symboles vides).⁶⁹

La Figure 1. 9 illustre le contrôle de la taille des pores de monolithes obtenus à base de glycidyl méthacrylate-co-éthylène di méthacrylate poly(GMA-co-EDMA). Cette figure montre également l'effet de la température à laquelle est réalisée la polymérisation sur la taille des pores du monolithe. A taux de dodécanol égaux, les monolithes préparés à 50°C ont des diamètres de pores supérieurs à ceux préparés à 70°C. Globalement, la taille des pores est inversement proportionnelle à la valeur de la température de polymérisation dans le cas d'un amorçage thermique de cette dernière.

Dans une polymérisation par chauffage, étant donné le rôle déterminant de la température sur la croissance des noyaux, celle-ci doit être minutieusement contrôlée pour obtenir une matrice reproductible présentant une structure poreuse uniforme. La décomposition de l'initiateur et le taux de propagation de la réaction sont plus rapides à température plus élevée ce qui entraîne un nombre plus grand de gros noyaux et donc des pores de taille plus faible. Un processus de polymérisation trop rapide peut donner lieu à des

hétérogénéités dans la structure poreuse, ce qui montre qu'une température moins élevée peut être privilégiée, cette préférence devra cependant être conciliée avec la température de décomposition de certains initiateurs.^{24,72}

Le pourcentage de l'un des composants du mélange porogène et la nature du microporogène peuvent également avoir un effet sur la taille des pores et par suite sur la perméabilité et l'efficacité des colonnes capillaires, Ces effets ont été étudiés par Trojer⁷³ et al. qui préparèrent de nouvelles colonnes monolithiques par polymérisation de méthylstyrène (MS) et de 1,2-bis(p-vinylphényl)éthane (BVPE) comme agent réticulant en présence d'un mélange de 1-décanol (macroporogène) et de THF (microporogène). En augmentant graduellement le pourcentage de THF de 8 à 10% v/v (monolithes 2, 4 et 5 du Tableau 1. 3), les diamètres des microglobules ont visiblement diminué comme le confirment les micrographes d-f de la Figure 1. 10.

Tableau 1. 3 : Compositions et caractéristiques des colonnes monolithiques préparées par Trojer et al.⁷³ La composition du microporogène THF dans le mélange porogène augmente de la colonne 2 à la colonne 5.

Colonne	MS (% v/v)	BVPE (% v/v)	1-décanol (% v/v)	THF (% v/v)	Débit μ L/min	Perméabilité relative
2	18.5	18.5	55	8	16.4	7.7
4	18.5	18.5	54	9	1.1	1.4
5	18.5	18.5	53	10	58.2	27.9

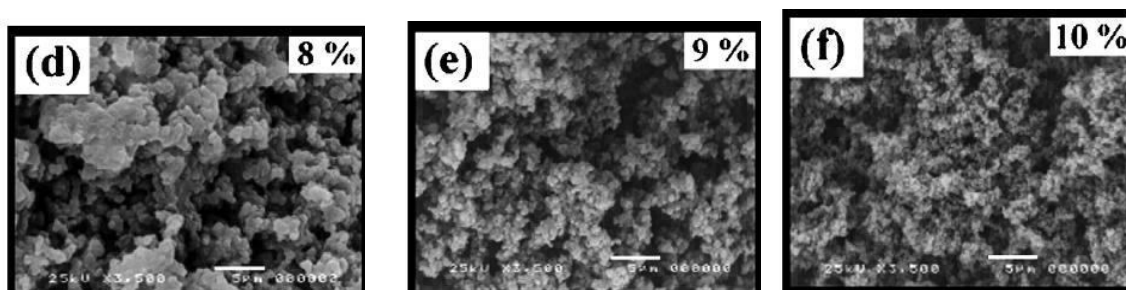


Figure 1. 10: SEM micrographes des monolithes 2, 4, 5; Effet de la composition du microporogène (THF) dans le mélange porogène (agrandissement: $\times 3500$, la barre d'échelle est de 5μ m).⁷³

En maintenant le 1-décanol comme macroporogène, ces mêmes auteurs⁷³ ont modifié la nature du microporogène. Les monolithes 4, 6 and 7 (Tableau 1. 1) ont été préparé pour étudier l'effet de la nature du microporogène (THF, CH₂Cl₂ et toluène) sur le système MS/BVPE, puisque c'est un autre paramètre qui peut être utilisé pour changer la structure du polymère. En modifiant la nature du microporogène, la perméabilité relative du support a été fortement influencée (Tableau 1. 4). En effet, les diamètres des microglobules ont augmenté de 0.5 à 1.3 et finalement à 2.4 μ m en utilisant le THF, le CH₂Cl₂ et le toluène, respectivement (Figure 1. 11 g-i).

Tableau 1. 4: Compositions et caractéristiques des colonnes monolithiques préparées par Trojer et al.⁷³. La nature du microporogène change de la colonne 4 à la colonne 7.

Colonne	MS (% v/v)	BVPE (% v/v)	Macro porogène (% v/v)	Micro porogène (% v/v)	Débit μ L/min	Perméabilité relative
4	18.5	18.5	54	9 (THF)	1.1	1.4
6	18.5	18.5	54	9 (CH ₂ Cl ₂)	58.2	27.9
7	18.5	18.5	54	9 (Toluène)	151.0	71.3

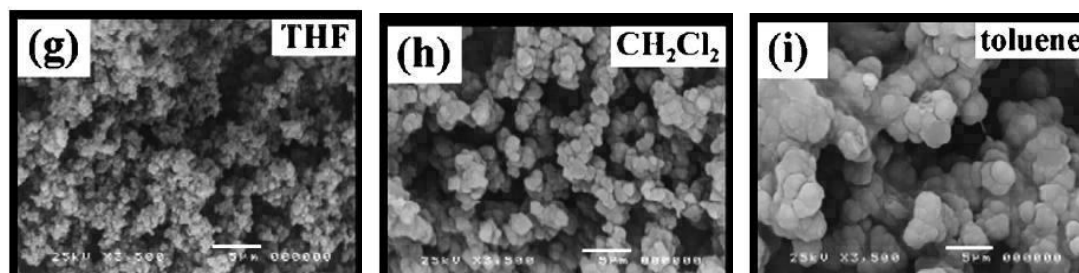


Figure 1. 11 : SEM micrographes des monolithes 4, 6 et 7 (Tableau 1. 4). Effet de la nature du microporogène; (agrandissement \times 3500 la barre d'échelle est de 5 μ m).⁷²

Cette différence importante dans la morphologie du monolithe a été attribuée à la facilité qu'ont ces solvants pour dissoudre les nuclei en croissance au début de la polymérisation. Selon les propriétés du microporogène, la séparation de phase est accélérée

ou retardée,⁷⁴ résultant en une porosité globale différente. Ainsi, le THF semble accélérer la séparation de phase formant des globules plus petits et par conséquent une microporosité plus élevée. Si le toluène est utilisé, les nuclei ont plus de temps pour croître avant la précipitation, conduisant à une macroporosité et une perméabilité plus élevées. Cette observation est surprenante puisque le toluène est connu pour être un meilleur solvant pour les styrènes que le THF dont la polarité est plus élevée. Par exemple, les polymères macroporeux à base de PS/DVB, préparés en présence de toluène, ont montré une microporosité plus élevée que celles des polymères polymérisés dans THF.⁷⁴ La similarité chimique n'est donc pas un facteur suffisant pour prédire le comportement pendant la polymérisation et la porosité qui en résulte.

Le pourcentage total en solvant porogène dans le mélange de polymérisation est également un paramètre nécessitant un ajustement car il détermine les caractéristiques du réseau poreux, c'est-à-dire la taille et le volume des pores. Une diminution du pourcentage total en solvants porogènes du système provoque ainsi une diminution du volume poreux total et un déplacement du maximum de la distribution de la taille des pores vers des valeurs plus faibles. Une conséquence directe de cette diminution de la taille des pores consiste en une forte augmentation de la résistance à l'écoulement.

Jiang et al.⁷⁵ ont étudié l'effet du rapport entre les monomères et le mélange porogène incluant l'iso-amyl alcool et le 1,4-butanediol dans la synthèse de monolithes à base de styrène méthacrylate (SMA) et d'éthylène diméthacrylate (EDMA). Ces auteurs ont montré, en diminuant la teneur en porogène dans le mélange de 70 à 50% et en maintenant la teneur de tous les autres constituants constante, que la porosité ε_T décroissait. Les observations au microscope électronique ont révélé que les microglobules étaient plus petits lorsque la teneur en porogène diminuait dans le mélange.

Pour illustrer l'effet de la nature du monomère, nous avons choisi l'exemple rapporté par Cantó-Mirapeix et al.⁷⁶ Ces auteurs ont préparé des phases stationnaires monolithiques pour l'électrochromatographie capillaire en utilisant le méthacrylate de butyl (BMA) et le lauryl méthacrylate (LMA) par polymérisation in situ en milieu non aqueux. L'effet du rapport de 1,4-butanediol/1-propanol sur les propriétés poreuses a été étudié pour chaque monomère séparément en gardant le rapport entre les monomères et le mélange porogène fixé à 40/60 wt/wt. Des mélanges de BMA et de LMA ayant différents rapports 1,4-butanediol/1-propanol ont été étudiés pour suivre les comportements morphologiques des colonnes. Pour un même pourcentage de 1,4-butanediol, les monolithes à base de LMA montrent des

globules et des pores plus grands que leurs homologues à base de BMA, résultant en une plus faible résistance à l'écoulement et à une surface spécifique plus faible. Ce comportement a été expliqué par les auteurs⁷⁶ par l'hydrophobicité plus élevée du LMA par rapport à celle du BMA. Dans l'environnement polaire du mélange de polymérisation, la séparation de phase a lieu plus tôt pour le LMA. Les agrégats formés ont tendance à gonfler par les monomères de LMA plutôt qu'avec le solvant porogène, ce qui explique les larges globules et pores.

L'effet de la concentration des monomères sur les propriétés finales du polymère a été démontré par Hebb et al.⁷⁷ pour les monolithes poly(triméthylolpropane triméthacrylate) (poly-TRIM). Ces auteurs ont trouvé que les polymères monolithes ne se formaient pas à faible concentration de monomère (< 0.5 g/mL) et le produit isolé était une poudre. Au contraire, les monolithes préparés en utilisant des concentrations en TRIM plus élevées (1.2-2.2 g/mL) étaient plus denses, semi transparents et cassants.

La teneur en agent réticulant ou monomère affecte aussi bien la porosité du matériau que sa composition chimique. Une augmentation du pourcentage en agent réticulant conduit, lors de la polymérisation, à l'apparition de globules plus réticulés¹⁷ et la séparation de phases est plus précocè l'effet est identique à celui d'un solvant « pauvre ». Les globules plus réticulés sont de moins bons solvants pour les monomères : la coalescence est moindre, les nuclei sont plus nombreux, plus petits et les pores sont, de même, plus petits. La distribution de la taille moyenne des pores est décalée vers les plus faibles valeurs. En règle générale, la surface spécifique est d'autant plus grande et la taille des pores plus petites que le pourcentage du réticulant dans le mélange de polymérisation est élevé.

De plus, le pourcentage en agent réticulant peut affecter la rigidité et l'homogénéité du monolithe.²⁴ Les mélanges de polymérisation contenant un pourcentage élevé en réticulant peuvent conduire à des monolithes qui ont des surfaces spécifiques élevées de l'ordre de centaine de m². Ces monolithes ont, cependant, une perméabilité aux liquides limitée, et sont donc moins appropriés pour la HPLC à cause des hautes pressions requises pour l'écoulement.

Tennikova et al.⁷⁸ ont étudié l'effet de la pression dans l'écoulement à travers des monolithes à base de poly(GMA-co-EDMA) préparés avec différents pourcentages de réticulant. Les monolithes préparés à partir d'un mélange contenant 75% EDMA avaient une perméabilité égale à seulement 8.0 m s⁻¹ Pa⁻¹, alors que ceux obtenus avec 60 et 50% EDMA avaient des perméabilités de 22.4 et 40.0 m s⁻¹ Pa⁻¹, respectivement. La valeur proche de 50%

de réticulant représente un optimum en terme des propriétés importantes des polymères synthétisés

Nordborg et al.⁶² ont décrit la préparation de monolithes à base de polyméthacrylate préparés à partir d'un mélange de 1-propanol et de 1,4-butanediol comme solvants porogènes. Ces auteurs ont utilisé l'éthylène glycol di-méthacrylate (EDMA), le diéthylène glycol di-méthacrylate (DEGDMA), le tri-éthylène glycol di-méthacrylate (TEGDMA), et le penta-érythritol tétraacrylate (PETA) comme agents réticulants. L'utilisation de ces réticulants, portant un lien formé de un, deux ou trois unités d'éthylène glycol reliant deux entités méthacrylates polymérisables a permis l'étude de l'effet de la longueur du lien et donc de la nature du réticulant sur les propriétés des monolithes préparés. Pour comparaison, le PETA avec quatre fonctionnalités vinyl polymérisables formant des structures monolithes plutôt rigides a été également considéré. Dans la même étude, la porosité a été ajustée en modifiant le rapport du 1-propanol au 1,4-butanediol dans le système porogène.

Pour résumer, les propriétés poreuses des colonnes et la morphologie du polymère sont contrôlées par les conditions de polymérisation, le type et la quantité du porogène, la nature et la quantité du monomère et du réticulant, la concentration de l'initiateur, la température de polymérisation et la durée de la réaction.^{15,17,52,53,79} A ce jour, il n'existe pas de règles établies pour la sélection des conditions de polymérisations et des expériences d'optimisation doivent être entreprises pour chaque nouveau système.

En pratique, les systèmes contrôlés par plusieurs facteurs ont été étudiés en utilisant l'approche "un seul paramètre à la fois". Par exemple dans la littérature spécialisée, la température de polymérisation⁵², la proportion en porogène, la composition du porogène^{15,79,80} la quantité d'AMPS (Acide 2-acrylamido-2-méthyl-1-propanesulfonique), la durée de polymérisation⁵² ont été considérés séparément, en supposant tous les autres paramètres optimums. L'inconvénient majeur de cette approche est qu'elle ne tient pas compte des interactions possibles entre les facteurs.⁸¹ Par exemple, il est possible que le temps et la température soient reliés puisque ces deux paramètres influent sur la cinétique de la réaction de polymérisation. De plus, la température peut affecter la solubilité du monolithe dans le solvant porogène et donc modifier sa structure.

1. 4. QUELQUES APPLICATIONS DES MONOLITHES

Actuellement, les polymères monolithes apparaissent comme uniques pour des applications en nano chromatographie liquide rapide, extraction en solide phase, immobilisation d'enzymes en format capillaire et puce microfluidique. Ces phases sont fabriquées en une seule étape dans un procédé de moulage avec une polymérisation radicalaire.^{82,83,84,85} Cependant la surface interne de la conduite doit être modifiée et impliquée dans le processus de polymérisation. Ce qui peut être réalisé à l'aide d'un précurseur donnant à la surface un groupement vinyl greffé point de départ d'une chaîne de polymérisation radicalaire.

Les colonnes monolithiques ont de nombreuses applications en raison de la facilité et de la flexibilité de leur élaboration ainsi que du choix des constituants, monomères ou autres pouvant entrer dans leur fabrication. Il est possible de contrôler leur morphologie, de diminuer la résistance au transfert de masse et d'augmenter le rapport surface / volume par rapport aux autres matériaux poreux. Ces applications couvrent de nombreux domaines, nous citerons en particulier la séparation des protéines.

1. 4. 1. Séparation des protéines

Des travaux récents ont souligné la possibilité des phases stationnaires en format capillaire à séparer les protéines, les peptides, les oligo nucléotides et les acides nucléiques. Une attention particulière est donnée aux applications en protéomique et génomique^{36,38,86,87} ainsi que l'utilisation des monolithes comme support pour l'immobilisation d'enzymes protéolytiques.^{88,89,90,91} La séparation des protéines peut être réalisée en fonction de la masse, la nature chimique, la charge électrostatique ou la chiralité. Elle comporte trois étapes : la préparation et le traitement de l'échantillon, la séparation des constituants et leur détection.

On distingue les séparations chromatographiques dans les conditions normales et inverses, les séparations qui reposent sur les échanges d'ions ou sur une affinité donnée. Les colonnes à phase inverse sont faites de monomères fonctionnels ayant une longue chaîne aliphatique ou à partir d'un co - monomère de type mélange styrène - divinyl benzène. Les phases à échange d'ions sont synthétisées à partir de monomères possédant un groupe chargé comme le sulfonate de sodium. Le faible transport de masse par diffusion des macromolécules dans les pores des phases particulières affecte négativement l'efficacité de séparation qui est considérablement plus rapide dans une colonne monolithique où les performances de transport

de masse par convection sont favorables.⁹² Un gradient d'élution plus fort dans la phase mobile accélère l'élution par rapport à une séparation isocratique et permet une séparation dans un temps considérablement plus court.^{20,93}

A titre d'exemple, la Figure 1. 12 montre une excellente séparation de quatre protéines tests sur une micro colonne monolithique à base de poly(butyl méthacrylate co- glycérol diméthacrylate).⁶⁵

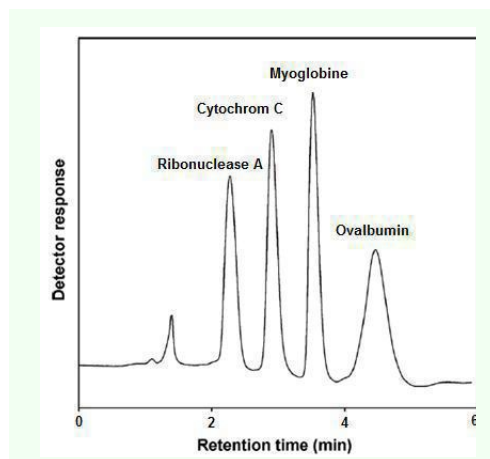


Figure 1. 12 : Séparation par RP-HPLC de quatre protéines sur une colonne à base de poly(butyl méthacrylate-co-glycéroldiméthacrylate).

Conditions: éluant A: 90% H₂O/10% acétonitrile (v/v), 0.1% TFA; éluant B: 10% H₂O/90% (v/v) acétonitrile, 0.1% TFA; gradient linéaire A-B: 0% (0 min) à 100% (5 min), concentration 0.25mg/mL pour chaque protéine; débit 7.4 μL/mL⁶⁵

Une séparation rapide d'un mélange de quatre protéines standards a été réalisée par HPLC à phase inverse à gradient d'élution sur une colonne non polaire à base de PS -DVP par Gusev et al.³⁴ Les chromatogrammes montrés sur la Figure 1. 13 ont été obtenus à différentes vitesses d'écoulement et illustrent la séparation rapide à vitesse d'écoulement élevée due à la porosité et la stabilité mécanique élevées de ces colonnes.

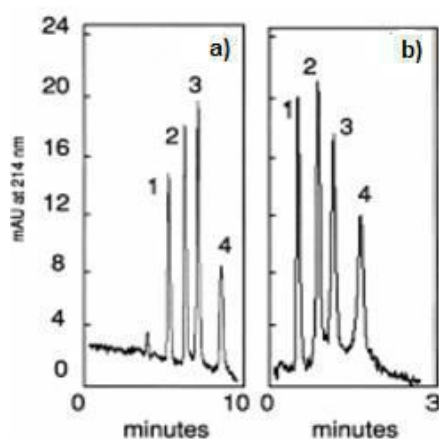


Figure 1. 13 : Chromatogrammes de protéines standards obtenus par CLC (Capillary Liquid Chromatography) sur une colonne capillaire monolithique à base de PS-DVP (75 μm×27/38 cm); gradient linéaire de 20 à 75% d'acétonitrile dans l'eau contenant 0.1% d'acide trifluoroacétique; débit, 0.34 μl/s a) et b) 1.5 μl/s. Identification des pics: 1, ribonucléase A; 2, cytochrome C; 3, lysozyme; 4, β-lactoglobuline B (1 mg/ml dans une solution tampon).³⁴

Les phases stationnaires destinées à l'électrochromatographie capillaire utilisent une méthode de séparation mixte combinant la chromatographie et l'électrophorèse. L'écoulement du liquide donnant un flux électro-osmotique est provoqué par un champ électrique. Ainsi la

phase stationnaire présente des charges de surface à travers l'introduction de monomères chargés dans le mélange réactionnel. Wu et al.⁹⁴ ont développé un mode d'électrochromatographie capillaire pour la séparation de composés ioniques sur une colonne monolithique neutre et hydrophobe. La colonne monolithique préparée par copolymérisation in situ de lauryl méthacrylate et d'éthylène diméthacrylate forme une phase stationnaire C₁₂ hydrophobe. Le flux électro osmotique (EOF) dans cette colonne hydrophobe était très faible même à un pH de la phase mobile égal à 8. Des peptides ont été séparés à pH tampon acide sur la base de la différence de leur mobilité électrophorétique et de leur interaction hydrophobe avec la phase stationnaire (Figure 1. 14).

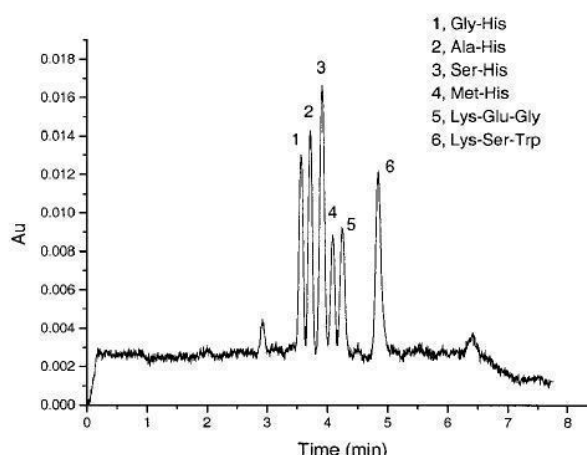


Figure 1. 14 : Electro chromatogrammes pour la séparation de peptides modèles sur une colonne monolithique à base de lauryl méthacrylate. Conditions expérimentales: voltage appliqué, 5 kV. longueur effective de la colonne, 10 cm (longueur totale, 30 cm) avec 75 μ m i.d. et 365 μ m o.d.; phase mobile, 40 mM tampon phosphate (pH 2.1); détection UV longueur d'onde, 214 nm; injection électrocinétique, 5 kV pendant 5s.⁹⁴

1. 4. 2. Applications en microfluidique

Les efforts de recherche portent actuellement sur la miniaturisation des dispositifs de séparation dans le but de réduire le volume de l'échantillon (comme les cellules ou les tissus biologiques), le coût des réactifs (comme les anticorps et les enzymes) et de satisfaire l'urgence de réduire le temps d'analyse, répondre rapidement au besoin médical en examinant plusieurs échantillons à la fois. La nano-chromatographie (nano-CL) et les microsystèmes analytiques représentent des thèmes de recherche qui retiennent une attention particulière et qui connaissent une évolution rapide.^{95,96} La complexité croissante des systèmes étudiés, la miniaturisation de plus en plus poussée des techniques chromatographiques utilisées nécessitent l'emploi de phases stationnaires appropriées pour le type de séparation considéré. Pour cela, le recours aux monolithes à base de polymère constitue une bonne alternative qui permet de résoudre certains problèmes liés à la technologie de fabrication tout en donnant lieu à des niveaux de séparation améliorés. Ces systèmes présentent des avantages indéniables dus

à la simplicité de leur préparation en grande quantité, leur coût relativement faible lorsqu'on compare ces propriétés avec celles des systèmes équivalents à base de billes de silice, de verre ou de quartz. Ces microsystèmes permettent le couplage de techniques séparatives efficaces avec des systèmes de détection performants. Cependant, une étape préliminaire de traitement des parois est indispensable afin d'assurer la forte liaison covalente du polymère à son support, capillaire ou microcanal.

Liu et al.⁹⁷ ont mis au point une approche solide pour la fabrication de puces HPLC en oléfine cyclique contenant une phase monolithique stationnaire à base de poly méthacrylate photo polymérisée in situ. En plus d'une séparation à phase inverse de peptides modèles marqués par fluorescence, de digests de protéine et d'échantillons de protéines intacts, la puce utilise un injecteur/séparateur intégré permettant au dispositif d'être relié à une pompe standard et maintenir un débit à l'échelle du nano litre. La Figure 1. 15 montre des micrographes de monolithes de BMA-TMPTMA (Triméthylolpropane triméthacrylate).

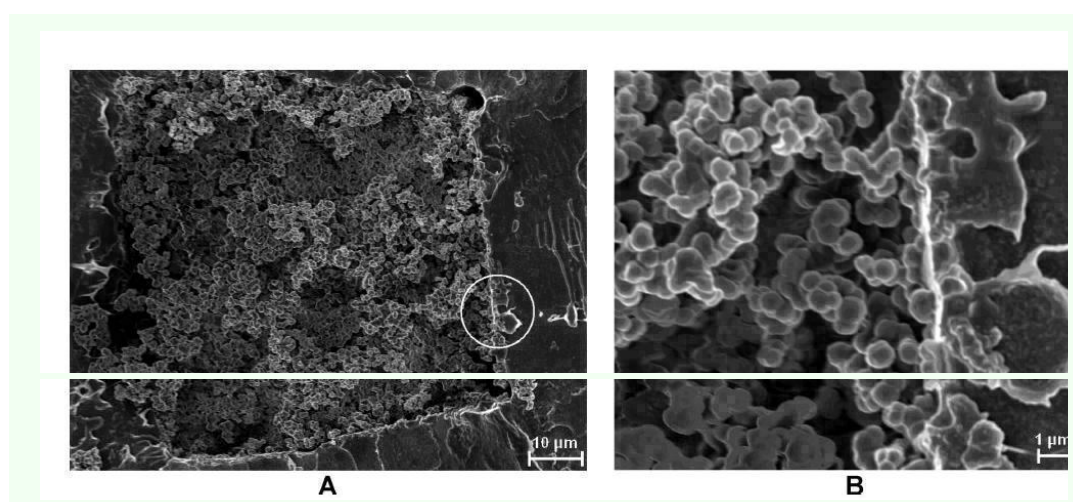


Figure 1.15 : (A) images SEM de monolithes à base de BMA-TMPTMA (Triméthylolpropane triméthacrylate). (B) Agrandissement de la zone circulaire de la partie A révélant un attachement covalent apparent à la surface du canal en COP (Cyclic Olefin Polymer).⁹⁷

Les travaux en microfluidique utilisant des laboratoires sur puces sont en pleine expansion dans l'analyse des protéines et l'étude de leurs fonctions. Les opérations sur puces permettent une séparation rapide et reproductible alors que les dispositifs microfluidiques doivent résister dans des conditions d'utilisations répétées sous pressions élevées. Une séparation à phase inverse rapide sur micropuce de peptides et protéines à un gradient de

pression de 12 bar/cm a été réalisée par Reichmuth et al.⁹⁸ à l'aide d'un microsystème intégrant des injections de l'ordre de nanolitres et utilisant un détecteur à fluorescence miniaturisé (Figure 1. 16 A). Des protéines et peptides ont été séparés en des temps allant de 40 à 200 s sur un monolithe à base de C18 mis au point par lithographie de contact (Figure 1. 16 B) Les volumes d'échantillons varient entre 220 et 800 pL et peuvent être mesurés linéairement en contrôlant la durée de l'impulsion de la pression selon des procédés classiques.

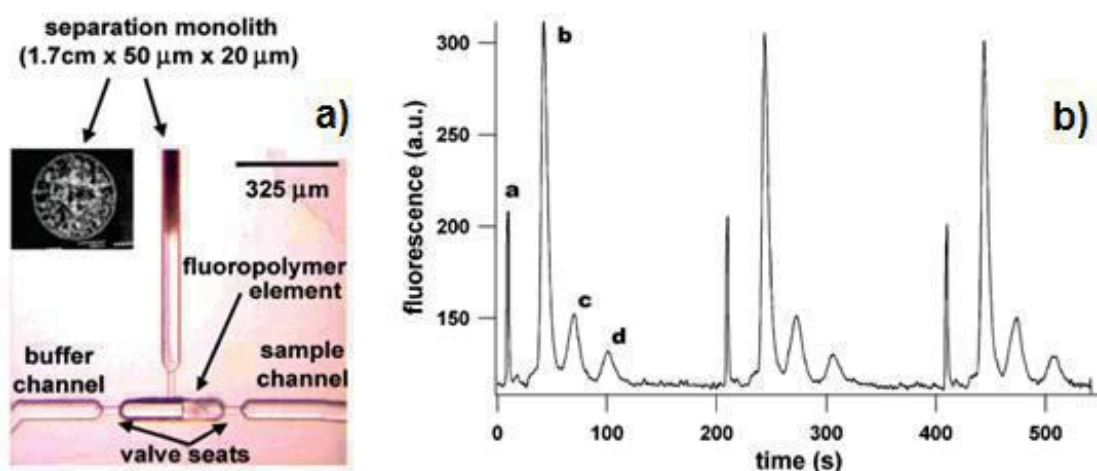


Figure 1. 16: a) Micrographie d'un milieu de séparation et de la pompe d'injection. La polymérisation est faite à l'intérieur d'un capillaire de verre de diamètre interne égal à 150 µm. b) Injections répétées de 6400 pL, 750ms d'un mélange de protéines. % ACN + 0.16% HFBA dans 5 mM tampon de phosphate (pH 2.0) à 300 psi. Identification de pics et facteurs de rétention: a, colorant; b, insuline (1.2); c, anti-biotine (6.0); d, R-lactalbumine (9.1).⁹⁸

Récemment, Levkin et al.⁸² ont préparées des phases stationnaires à base de poly(lauryl méthacrylate-*co*-éthylène diméthacrylate) et de poly(styrène-*co*-divinylbenzène). La polymérisation radicalaire a été initiée thermiquement dans une puce de polyimide formant des canaux ayant une surface carrée 200 µm x 200 µm et une longueur de 6.8 cm. Ces puces ont été utilisées pour séparer un mélange de protéines incluant la ribonucléase A, myoglobine, cytochrome *c*, et ovalbumine et aussi des peptides (Figure 1. 17). Les phases à base de méthacrylate et de styrène ont permis la séparation rapide de la majorité des mélanges tests

considérés. La meilleure performance a été atteinte pour le monolithe à base de styrène permettant une séparation rapide de quatre protéines en moins de 2.5 min.

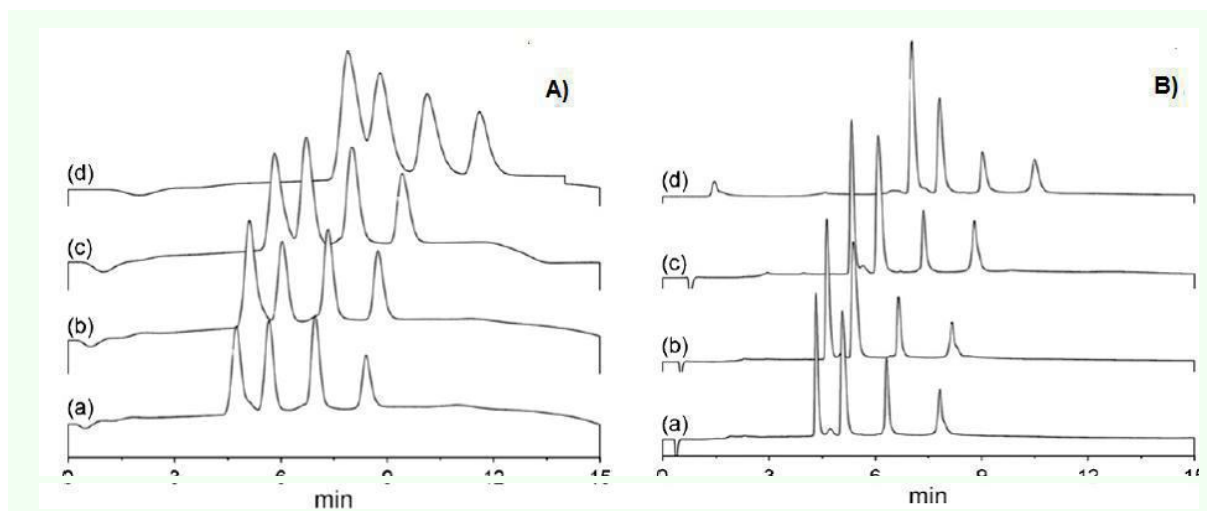


Figure 1. 17 : Séparations sur puce de ribonucléase A, cytochrome *c*, myoglobine, ovalbumine (par ordre d'éluion) utilisant les phases stationnaires monolithiques A) poly(lauryl méthacrylate-*co*-éthylène diméthacrylate) et B) poly(styrène-*co*-divinylbenzène) à différents débits (a) 4, (b) 3, (c) 2, et (d) μ L/min. Gradient: 0-60% d'acétonitrile dans l'eau (0.05%, v/v d'acide formique) en 10 min. Concentration des solutions de protéines par échantillon: 0.2 et 0.1mg/mL pour les monolithes à base de poly(lauryl méthacrylate-*co*-éthylène diméthacrylate) et de poly(styrène-*co*-divinylbenzène), respectivement. Volume d'injection 40 nL. Détection: UV à 210 nm.⁸²

1. 4. 3. Autres applications

Les monolithes ont aussi un grand potentiel d'applications dans la préparation d'échantillons avant leur analyse protéomique. Les supports monolithiques ayant de grands pores peuvent être exploités pour l'isolation de nanoparticules, cellules, organelles, virus ou agrégats de protéines.⁹⁹ Ils sont utilisés comme supports de microréacteurs et de réacteurs.

Les monolithes ont d'autres applications comme phases solides de détection par chimio-luminescence comme la détection du peroxyde d'hydrogène à l'aide d'un groupement contenant du fluore immobilisé sur le support du monolithe.

Les monolithes ont également servi de support, dans un microsystème fluide pour la réalisation de valves en polymère thermosensible.^{100,101} Le poly(N-isopropylacrylamide) est un polymère thermosensible non chargé hydrosoluble à basse température et précipitant à une température supérieure à 31.32°C. C'est la température critique inférieure de solution nommée T_c . Au dessous de T_c le polymère est hydrophile et gonflé, alors qu'au dessus, il

devient hydrophobe et se rétracte. Cette transition de volume montrée par le poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) en réponse à un changement de température peut être utilisée pour contrôler l'écoulement de liquide à travers les polymères monolithiques. Par exemple, des chaînes de PNIPAAm greffées sur la surface des pores d'un monolithe existent sous leur forme collapsée à 40°C et n'empêchent pas l'écoulement de liquide à travers les pores. Si le matériau est refroidi à température ambiante, qui est bien au-dessus de la température de transition T_c du PNIPAAm, les chaînes de PNIPAAm gonflent et empêchent l'écoulement du liquide. Ce comportement peut être facilement contrôlé dans un système à pompe par une augmentation rapide de la pression qui s'oppose à l'écoulement dans le monolithe lorsque le PNIPAAm est gonflé.¹⁰² Le greffage de chaînes de PNIPAAm dans un microcanal permet donc de réguler l'écoulement des liquides par un simple changement de température.

Les monolithes ont aussi été utilisés pour la séparation des hydrocarbures polyaromatiques. Ces chaînes sont souvent formées suite à la combustion des hydrocarbures naturels (charbon, pétrole, gaz naturel). Elles ne sont pas solubles dans l'eau et se trouvent donc en très faible quantité dans les solutions aqueuses mais peuvent être présentes en plus grande quantité dans les milieux hydrophobes comme l'huile végétale ou la matière grasse animale. Des polyaromatiques sont fortement cancérigènes et se décomposent lentement dans l'air. Les conditions environnementales et d'hygiène imposent des limites strictes à leur présence dans l'air, dans l'eau potable ou dans les aliments. La méthode de séparation la plus utilisée pour le contrôle de leur présence est la chromatographie liquide à base de colonnes monolithiques.^{103,104,105}

1. 5. PROPRIÉTÉS HYDRODYNAMIQUES

La possibilité pour l'éluant de s'écouler d'une façon contrôlée à travers le réseau poreux du monolithe constitue un enjeu majeur dans la conception du milieu monolithique et donc de sa morphologie. En plus d'une perméabilité adéquate pour le type d'application considérée, la structure poreuse doit permettre un taux adapté de transfert de la matière par convection. Plusieurs techniques classiques de mesure de la porosité sont réalisées à l'état sec comme la porosimétrie par intrusion de mercure ou par absorption / désorption d'azote alors que les colonnes opèrent effectivement en présence d'un solvant éluant et donc à l'état humide. Ceci veut dire que les données chromatographiques peuvent ne pas correspondre à la taille des pores observée à sec.

La perméabilité de la colonne dépend fortement de la porosité du monolithe et du rapport entre les macropores et les mésopores. Dans ce paragraphe, nous allons passer brièvement en revue quelques résultats qui montrent les effets hydrodynamiques en relation avec la perméabilité des colonnes monolithiques.

1. 5. 1. Effet de la nature de la phase mobile

La Figure 1. 18 montre la relation entre la pression appliquée et le débit d'un capillaire monolithique à base de MS/BVPE préparés par Trojer et al.⁷³ La linéarité entre la chute de pression et le débit montre la stabilité mécanique de ce type de polymère. Une pression atteignant 30 MPa a pu être appliquée sans endommager le monolithe. Ce résultat montre que le gonflement du polymère est faible dans un solvant organique. Selon la loi de Darcy donnée par l'Equation 4. 2, la perte de charge ΔP ne dépend que de la viscosité η de la phase mobile sachant que la perméabilité B_0 , la longueur L et le débit Q sont constants:

Les droites sont décalées vers des pressions plus élevées dans l'ordre ACN < THF < MeOH < H₂O puisque la viscosité augmente de 0.39, 0.50, 0.58 à 1.00 mPa s, respectivement. Tous les solvants suivent cette tendance, excepté THF, qui semble avoir causé un léger gonflement du polymère. Le rapport de η sur ΔP à un débit fixe permet de déterminer la perméabilité qui, pour le mélange MS/BVPE s'avère plus élevée dans l'eau en comparaison avec l'ACN et le MeOH ($\sim 24\%$ in both cases), alors que dans le THF cette perméabilité est encore réduite de $\sim 25\%$ comparée à l'ACN ou le MeOH.

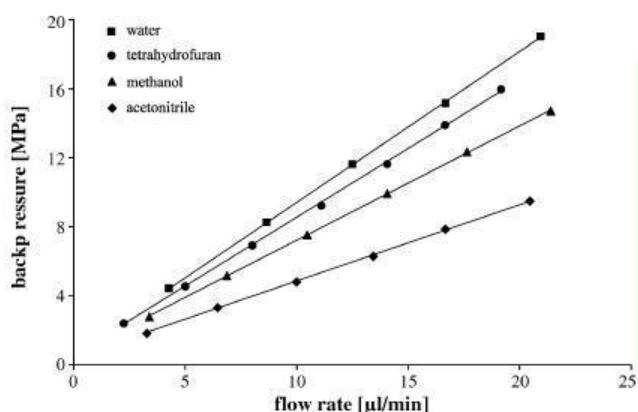


Fig. 1. 18: Corrélation entre la pression appliquée et le débit dans une colonne monolithique capillaire MS/BVPE pour quatre différents solvants à température ambiante.⁷³

La Figure 1. 19 montre la chute de pression normalisée à la viscosité du solvant à 25°C dans une puce en polyimide en fonction du débit en ACN, MeOH et eau à travers un canal

contenant des monolithes à base de poly(lauryl méthacrylate-*co*-éthylène diméthacrylate) (Fig 1. 19A) et de poly(styrène-*co*-divinylbenzène) (Fig 1. 19B).⁸² La chute de pression plus élevée avec ACN est une indication de la réduction de la taille des pores due au gonflement. Les perméabilités calculées²³ sont égales à 1.4×10^{-10} et 6.3×10^{-11} cm² pour les monolithes à base de LMA-EDMA et ST-DVB, respectivement. Ainsi la perméabilité du monolithe à base de LMA-EDMA est similaire à celle d'une colonne tassée avec des sphères de silice de diamètre 4 μ m, alors que le monolithe à base de ST-DVB donne un résultat proche de celui d'une colonne contenant des billes de 2 à 3 μ m de diamètre.

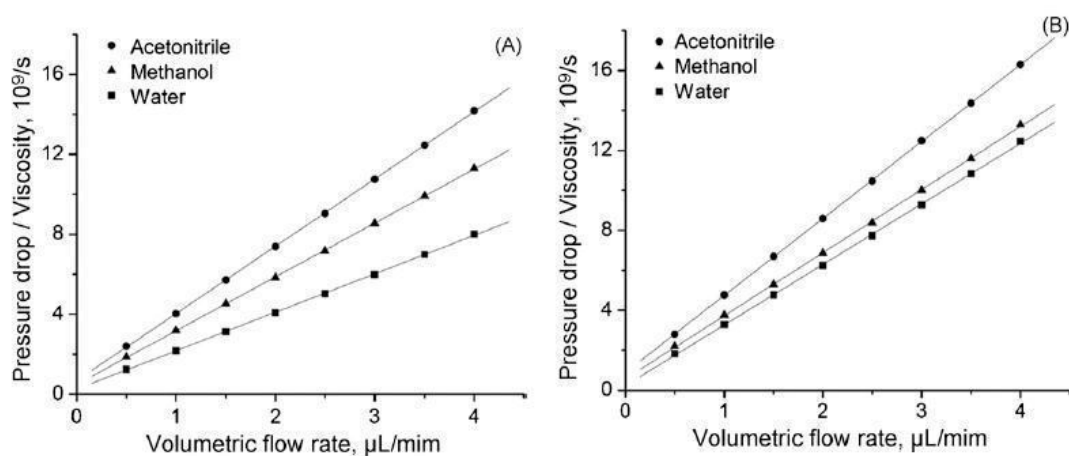


Figure 1. 19 : Perte de charge dans une puce en polyimide normalisée par la viscosité du solvant en fonction du débit d'acétonitrile, méthanol, et eau à travers des canaux contenant des monolithes de poly(lauryl méthacrylate-*co*-éthylène diméthacrylate) (A) et de poly(styrène-*co*-divinylbenzène) (B).⁸²

1. 5. 2. Effet de la taille des pores

La Figure 1. 20 montre l'effet du débit à travers des colonnes monolithiques à base de poly(butyl méthacrylate-*co*-EDMA)⁶². La pression nécessaire pour maintenir même un faible débit est assez élevée pour un matériau montrant un diamètre de pores moyen inférieur à 500 nm alors que des débits élevés sont obtenus à basse pression pour des matériaux ayant des pores de diamètres supérieurs à 1000 nm.

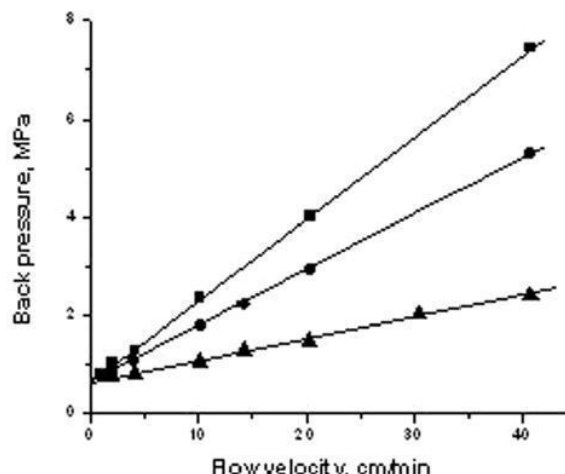


Figure 1. 20 : Perte de charge dans une colonne monolithique de 0.25× 100 mm à base de poly(butyl méthacrylate-co-EDMA) en fonction du débit en utilisant l'eau comme phase mobile. Taille des pores: 1.6 (■), 2.1 (●), et 3.8 μm (▲).⁶²

Puisque la viscosité apparaît au numérateur dans la loi de Darcy (voir Eq. 2. 2), la pression du monolithe doit être plus basse dans des solvants moins visqueux tels que le MeOH et l'ACN, en supposant que les monolithes ne gonflent pas et ne se contractent pas. Le gonflement des micro globules peut entraîner une augmentation de leur taille et de celle des macropores ce qui résulte en une diminution de la perméabilité et une augmentation de la pression. Similairement, une compression devrait réduire la taille et le volume des pores. Puisque la pression mesurée pour des solvants moins visqueux tels que le méthanol et l'ACN est toujours inférieure à celle mesurée dans l'eau, on peut conclure en une absence de gonflement et rigidité structurale pour de tels monolithes.⁶²

1. 5. 3. Effet de la géométrie et des dimensions de la colonne

Nischang et al. ont préparé récemment⁸⁵ des polymères monolithiques poreux dans des capillaires ayant des sections transversales de géométries circulaires ou carrées de dimensions latérales de 50, 75, 100 μm ainsi que des capillaires de sections rectangles de dimensions 38 μm×95 μm. Ces capillaires ont été utilisés pour déterminer l'effet de la taille et de la géométrie de leur section transversale sur les propriétés poreuses et hydrodynamiques de monolithes à base de poly(butyl méthacrylate-co-éthylène diméthacrylate) (Figure 1. 21). Ces capillaires ont été observés par MEB et leur perméabilité a été évaluée.

Leur performance en chromatographie a été testée dans la séparation d'un mélange de protéines comprenant le ribonucléase A, le cytochrome c, le myoglobine et l'ovalbumine en utilisant un gradient linéaire d'ACN dans la phase mobile. Aucune différence résultant de la géométrie de ces colonnes capillaires n'a été observée montrant que des capillaires circulaires

représentent une bonne option pour modéliser les processus physiques présents en microfluidique sur puces.

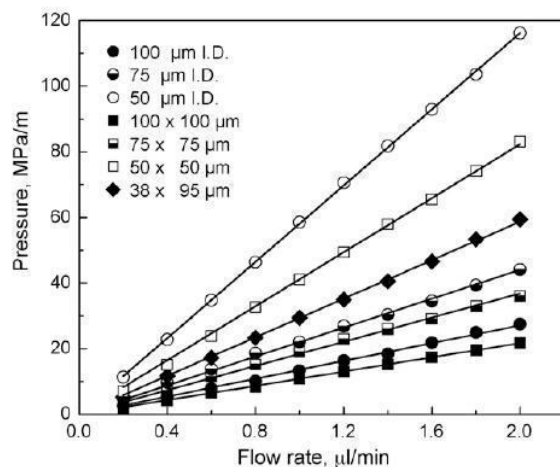


Figure 1. 21 : Effet du débit sur la perte de charge générée dans un canal contenant des monolithes poreux à base de poly(butyl méthacrylate-*co*-éthylène diméthacrylate) préparés à partir du même mélange de polymérisation mais différents par la forme et la taille. Conditions: longueur de la colonne 15 cm, phase mobile 0.1% (v/v) solution^d acide formique dans 50/50 (v/v) acétonitrile-eau.⁸⁵

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-
- [1] Podgornik, A.; Barut, M.; Strancar, A.; Josic, D.; Koloini, T. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5693.
- [2] Vlakh, E.G.; Tennikova, T.B. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 2637.
- [3] Szumski, M.; Buszewski, B. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2002**, *32*, 1.
- [4] Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N. *J. Chromatogr. A* **1997**, *762*, 135.
- [5] Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3498.
- [6] Nakanishi, K.; Minakuchi, H.; Soga, N.; Tanaka, N.; *J. Sol⁻ Gel Sci. Techn.* **1997**, *8*, 547.
- [7] Nunez, O.; Nakanishi, K.; Tanaka, N. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1191*, 231.
- [8] Tanaka, N.; Kobayashi, H.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Hosoya, K.; Ikegami, T. *J. Chromatogr. A* **2002**, *965*, 35.
- [9] Cabrera, K.; *J. Sep. Sci.*, **2004**, *27*, 843.
- [10] Zacharis; C. K. *J. Chromatog. Sci.*, **2009**, *47*, 443.
- [11] Unger, K. K.; Skudas, R.; Schulte, M. M. *J. Chromatogr. A* **2008** *1184*, 393.
- [12] Svec, F.; Frechet, J.M.J. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1999**, *38*, 34.
- [13] Urban, J.; Jandera, P. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 2521.J
- [14] Xu, L.; Shi, Z.G.; Feng, Y.Q. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *399*, 3345.
- [15] Eeltink, S.; Herrero-Martinez, J.M.; Rozing, G.P.; Schoenmakers, P.J.; Kok, W.T. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7342.
- [16] Štulík, K.; Pacáková, V.; Suchánková, J.; Coufal, P. *J. Chromatog. B*, **2006** *841* 79.
- [17] Viklund, C.; Svec, F.; Frechet, J.M.J.; Irgum, K. *Chem. Mater.*, **1996**, *8*, 744.
- [18] Peters, E.C.; Petro, M.; Svec, F.; Frechet, J.M.J. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3646.
- [19] Peters, E.C.; Petro, M.; Svec, F.; Frechet, J.M.J. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2288.
- [20] Svec, F. *J. Sep. Sci.*, **2004**, *27*, 747.
- [21] Svec, F.; Tennikova, T.B.; *Monolithic Materials: Preparation, Properties, and Applications*, Deyl, Z. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, **2003**.
- [22] Wang, Q.C.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J. *Anal. Chem.*, **1993**, *65*, 2243.

- [23] Guiochon, G. J. *Chromatogr. A* **2007**, *1168*, 101.
- [24] Vlakh, E.G.; Tennikova, T.B. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 2801.
- [25] Viklund, C., Ponten, E., Glad, B., Irgum, K., Horsted, P., Svec, F., *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 463.
- [26] Yu, C.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 120.
- [27] Tan, A.; Benetton, S.; Henion, J. D. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5504.
- [28] Rohr, T.; Hilder, E.F.; Donovan, J.J.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J. *Macromolecules* **2003**, *36*, 1677.
- [29] Tan, A.; Benetton, S.; Henion, J.D. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5504.
- [30] Safrany, A.; Beiler, B.; Laszlo, K.; Svec, F. *Polymer* **2005**, *46*, 2862.
- [31] Grasselli, M.; Smolko, E.; Hargittai, P.; Safrany, A. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B* **2001**, *185*, 254.
- [32] Beiler, B.; Vincze, A.; Svec, F.; Safrany, A. *Polymer* **2007**, *48*, 3033.
- [33] Holdšvendova, P.; Coufal, P.; Suchankova, J.; Tesařova, E.; Bosakova, Z.J. *Sep. Sci.* **2003**, *26*, 1623.
- [34] Gusev, I.; Huang, X., Horváth, Cs., *J. Chromatogr. A* **1999**, *855*, 273.
- [35] Svec, F.; Peters, E.C.; Sykora, D. et al. *J. Chromatogr. A*, **2000**, *887*, 3.
- [36] Oberacher, H.; Huber, C.G.; *Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 166.
- [37] Petro, M.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J. *J. Chromatogr. A* **1996**, *752*, 59.
- [38] Oberacher, H.; Premstaller, A.; Huber, C. G. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1030*, 201.
- [39] Mayr, B.; Holz, G., Eder, K., Buchmeiser, M.R., Huber, C.G., *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 6080.
- [40] Mayr, B.; Tessadri, R.; Post, E.; Buchmeiser, M.R. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4071.
- [41] Tennikova, T.B.; Svec, F. *J. Chromatogr.*, **1993** *646* 279.
- [42] Hjertén, S.; Eaker, D.; Elenbring, K.; Ericson, C.; Kubo, K.; Liao, J.L.; Zeng, C.M., Lidström, P.A.; Lindh, C.; Palm, A.; Srichiayo, T.; L. Valtcheva; Zhang, R.; *Jpn. J. Electrochem.* **1995**, *39*, 105.
- [43] Merhar, M.; Podgornik, A.; Barut, M.; Štrancar, A.; *Majda MTAEC9*, *36* (3 -4) 163 (2002).
- [44] Lav, T.X.; Grande, D.; Gaillet, C.; Guerrouache, M.; Carbonnier, B. *Macromol. Chem. Phys.*, **2012**, *213*, 64.
- [45] Baba, Y.; Tsuhako, M.; *Trends Anal. Chem.* **1992**, *11*, 280.
- [46] Fujimoto, C.; Kino, J.; Sawada, H. *J. Chromatogr. A* **1995**, *716*, 107.

- [47] Fujimoto, C. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2050.
- [48] Fujimoto, C. *Analisis* **1998**, *16*, M49.
- [49] Palm, A.; Novotny; M.V. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4499.
- [50] Ericson, C.; Hjerten, S. *Anal. Chem.* **1999**, *71* 1621.
- [51] Carraher, C.E., Jr. in: *Polymer Chemistry*, 6th Ed., Marcel Dekker, Inc., Chap. 8, New York, **2003**.
- [52] Svec, F.; Fréchet, J.M.J. *Chem. Mater.* **1995**, *7*, 707.
- [53] Svec, F.; Fréchet, J.M.J. *Macromolecules* **1995**, *28*, 7580.
- [54] Holdšvendová, P.; Coufal, P.; Suchánková, J.; Tesařová E., Bosáková Z., *J. Sep. Sci.* **2003**, *26*, 1623.
- [55] Coufala, P.; Čihák, M.; Suchánková, J.; Tesařová, E.; Bosáková, Z.; Štulík, K. *J. Chromatog. A* **2002**, *946*, 99.
- [56] Cantó-Mirapeix, A.; Herrero-Martínez, J.M.; Mongay-Fernandez, C.; Simó-Alfonso, E.F. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 607.
- [57] Štrancar, A., Podgornik, A., Barut, M., Necina, R., in: Scheper, T. (Ed.), *Advances in Biochemical Engineering & Biotechnology*, Vol. 76: *Modern Advances in Chromatography*, Springer-Verlag: Berlin- Heidelberg, pp. 49– 85. **2002**.
- [58] Hradil, J.; Azanova, A.; Ilavsky, M., Svec, F. *Angew. Makromol. Chem.* **1992**, *205*, 141.
- [59] Hahn, R.; Podgornik, A.; Merhar, M.; Schallaun, E.; Jungbauer, A. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5126.
- [60] Yu, C.; Xu, C.; Svec, F.; Frechet, J.M.J. *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **2002**, *40*, 755.
- [61] Courtois, J.; Bystrom, E.; Irgum, K.; *Polymer* **2006**, *47*, 2603.
- [62] Nordborg, A.; Svec, F.; Frechet, J.M.J.; Irgum, K. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 2401.
- [63] Ponten, E.; Viklund, C.; Irgum, K.; Bogen, S.T.; Lindgren, A.N. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4389.
- [64] Svec, F.; Peters, E.C.; Sykora, D.; Yu, C.; Fréchet, J.M.J. *J. High. Resol. Chromatogr.* **2000**, *23*, 3.
- [65] Hemström, P.; Nordborg, A.; Irgum, K.; Svec, F., Frechet, J.M.J., *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 25.
- [66] Courtois, J.; Szumski, M.; Georgsson, F.; Irgum, K. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 335.
- [67] Aoki, H.; Kubo, T.; Omegami, T.; Tanaka, N.; Hosoya, K.; Tokuda, D.; Ishizuka, N.J. *Chromatogr. A* **2006**, *1119*, 66.
- [68] Steinke, J.H.G.; Dunkin, I.R.; Sherrington, D.C. *Macromolecules* **1996**, *29*, 5826.

- [69] Peters, E.C.; Svec, F.; Frechet, J.M.J. *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 1169.
- [70] Bakry, R.; Bonn, G.K.; Mair, D.; Svec, F. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 486.
- [71] Safrany, A.; Beiler, B.; Laszlo, K., Svec, F., *Polymer* **2005**, *46*, 2862.
- [72] Svec, F.; Frechet, J.M.J. *Macromol. Symp.* **1996**, *110*, 203.
- [73] Trojer, L.; Lubbad, S.H; Bisjak, C.P.; Bonn, G.K. *J. Chromatog. A* **2006**, *1117*, 56.
- [74] Okay, O.; *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25* 711.
- [75] Jiang, Z.; Smith, N.W.; Ferguson, P.D.; Taylor, M.R. *J. Biochem. Bioph. Methods* **2007**, *70*, 39.
- [76] Cantó-Mirapeix, A.; Herrero-Martínez, J.M.; Mongay-Fernandez, C.; Simó-Alfonso, E.F. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 607.
- [77] Hebb, A. K.; Senoo, K.; Cooper, A. I.; *Composites Sci. Tech.* **2003**, *63*, 2379.
- [78] Tennikova, T. B., Belenkii, B. G., Svec, F., *J. Liq. Chromatogr.* **1990**, *13*, 63.
- [79] Lu, M.; Feng, Q.; Lu, Q.; Cai, Z.; Zhang, L.; Chen, G. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 3540.
- [80] Jiang, T.; Jiskra, J., Claessens, H.A., Cramers, C.A., *J. of Chromatog. A* **2001**, *923*, 215.
- [81] Leardi, R. *Anal Chim Acta* **2009**, *652*, 161.
- [82] Levkin, P.A.; Eeltink, S.; Stratton, T.R.; Brennen, R.; Robotti, K.; Yin H., Killeen, K.; Svec F.; Fréchet, J.M.J. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1200*, 55.
- [83] Robotti, K.M.; Yin, H.F.; Brennen, R.; Trojer L.; Killeen, K.J. *J. Sep. Sci.* **2009** *32* 3379.
- [84] Mair, D.A., Geiger, E., Pisano A.P., Fréchet J.M.J., Svec F. *Lab. Chip* **2006**, *6* 1346.
- [85] Nischang I., Svec F., Fréchet J.M.J. *J Chromatogr A* **2009**, *1216* 2355.
- [86] Ivanov, A.R.; Zang, L.; Karger, B. L. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5306.
- [87] Josic, D.; James, Clifton, G. *J. Chromatog. A*, **2007**, *1144* 2.
- [88] Peterson, D.S.; Rohr, T.; Svec, F. Fréchet, J M.J. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 40814.
- [89] Massolini, G.; Calleri, E. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 7.
- [90] Křenkova, J.; Foret, F. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3550.
- [91] Foret, F.; Krenkova; J. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 1675.
- [92] Liapis, A.I.; Meyers, J. J.; Crosser, O.K. *J. Chromatogr.* **1999**, *865*, 13.
- [93] Jandera, P.; Urban, J.; Moravcová, D. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1109*, 60.
- [94] Wu, R.; Zou, H.; Ye, M.; Lei, Z.; Ni, J. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4918.
- [95] Le Gac, S.; Carlier, J.; Camart, J. C.; Cren-Olivé, C.; Rolando, C. *J. Chromatogr. B*, **2004**, *808*, 3.
- [96] Pruijm, P.; Öhman, M.; Schoenmakers, P.J.; Kok W. Th. *J. Chromatogr.* **2011**, *1218*, 6.

-
- [97] Liu, J.K.; Chen, C.F.; Tsao, C.W.; Chang, C.C.; Chu, C.C.; Devoe, D.L.; Anal. Chem. **2009**, *81*, 2545.
- [98] Reichmuth, D.S.; Shepodd, T.J.; Kirby, B. J. Anal. Chem. **2005**, *77*, 2997.
- [99] Duan, Y.; Liu, H.; Sun, S.; Gu, Y.; Li J.; Yang, G. J. Chromat. Separ. Techniq. **2012**, *3*, 2.
- [100] Luo, Q.; Mutlu, S.; Gianchandani, Y.B.; Svec, F.; Frechet, J.M.J. Electrophoresis **2003**, *24*, 3694.
- [101] Yu, C.; Mutlu, S.; Selvaganapathy, P.; Mastrangelo, C.H.; Svec, F.; Frechet, J.M.J. Analytical Chemistry **2003**, *75*, 1958.
- [102] Peters, E. C.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J. Adv. Mater. **1997**, *9*, 630.
- [103] Waguespack, B.L.; Hodges, S. A.; Bush, M. E.; Sondergeld, L.J.; Bushey, M.M. J. Chromatogr., A **2005**, *1078* 171.
- [104] Lim, L.W.; Okouchi, Y.; Takeuchi T. Talanta **2008** *72* 1600.
- [105] Yan, L.J.; Zhang, Q.H.; Feng, Y.Q.; Zhang, W.B.; Li, T.; Zhang, L.H.; Zhang, Y.K. J. Chromatogr., A **2006**, *1121*, 92.

CHAPITRE 2

SYNTHESE, CARACTERISATIONS DES COLONNES MONOLITHIQUES

ET RESULTATS PRELIMINAIRES

2. 1. SYNTHESE, CARACTERISATIONS DES COLONNES MONOLITHIQUES

2. 1. 1. Composition du mélange réactionnel

Les monolithes macroporeux de nature macromoléculaires sont obtenus par polymérisation radicalaire amorcée par voie photochimique à l'aide d'irradiation UV du mélange réactionnel. Celui-ci se compose de monomères plus ou moins hydrophobes, d'un mélange de solvants appelé porogène et d'un photo-amorceur radicalaire.

Le monomère est constitué de méthacrylate de Lauryl (LMA) dont la formule chimique est donnée sur la Figure 2. 1a et de diméthacrylate d'éthylène (EDMA) qui sert d'agent réticulant pour former la structure réseau. La formule chimique de l'EDMA est donnée sur la Figure 2. 1b.

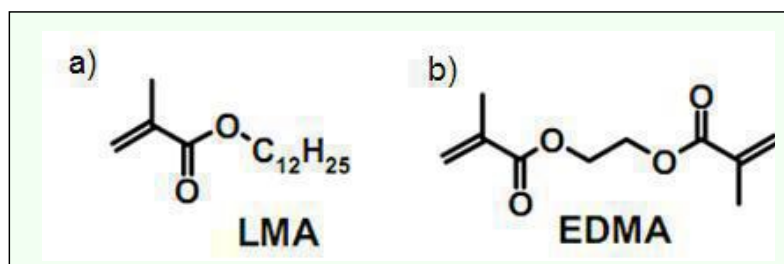


Figure 2. 1 : Monomères utilisés pour la préparation des phases monolithiques: le méthacrylate de lauryl (LMA) et le diméthacrylate d'éthylène (EDMA) comme agent réticulant.

L'amorceur utilisé est l' AIBN (ou Azobis (isobutyro nitrile)). Il se décompose sous l'effet du rayonnement UV pour initier la polymérisation radicalaire. Sa formule chimique est donnée sur la Figure 2. 2.

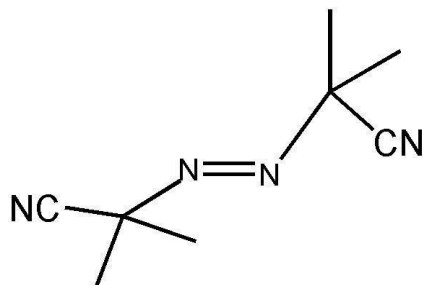


Figure 2. 2 : Amorceur utilisé dans la préparation des phases monolithiques

Dans notre étude nous avons utilisé le mélange porogène cyclohexanol/éthylène glycol pour la faiblesse de son paramètre de solubilité qui est proche de celui de polymère (LAM-co-EDAM)¹ ce qui fait de ce porogène un meilleur solvant car il favorise plus la formation de micropores que celle de macropores.

Le porogène est un mélange binaire d'un mauvais solvant (éthylène glycol) et d'un bon solvant (cyclohexanol) dans un pourcentage qui fixe la porosité de la phase monolithique.

2. 1. 2. Préparation des colonnes

2. 1. 2. 1. Dimensions des colonnes

Les supports monolithiques sont préparés dans des capillaires en silice fondue (Polymicro Technologies (Phoenix, AZ)), transparents aux irradiations UV. Par conséquent, ces capillaires ne sont pas recouverts de polyimide mais de Téflon[®] qui est moins résistant, c'est pour cela qu'il faut les manipuler avec précaution. Il s'avère qu'à ces échelles, un traitement des parois internes est nécessaire, afin d'ancrer de façon covalente la phase monolithique à l'intérieur du capillaire. Ils sont rigides au lieu d'être souples et la présence de monolithes peut être visualisée à travers le capillaire. Tout d'abord, les capillaires sont facilement manipulables et se connectent aisément sur les systèmes de pompage usuels, sur les chaînes de nanoLC (UltiMate 3000), sur les pousses-seringues (Harvard Apparatus, Holliston, MA,

USA) à l'aide de raccords (UpChurch Scientific, Oak Harbour, WA, USA), aussi bien pour l'élaboration des phases que leurs tests ultérieurs. Ensuite, les dimensions des capillaires sont proches des dimensions des microcanaux dans lesquels seront réalisées in fine les phases monolithiques. Le capillaire utilisé ici a un diamètre externe de $360\ \mu\text{m}$ pour un diamètre interne inférieur ou égal à $75\ \mu\text{m}$. Les colonnes capillaires monolithiques préparées ont une longueur de 15-20 cm pour mimer les colonnes commerciales. Ces longueurs seront précisées dans le Tableau 2.1 d'identification des colonnes. La photographie MEB de la figure 2.3b montre une section d'une des colonnes préparées.

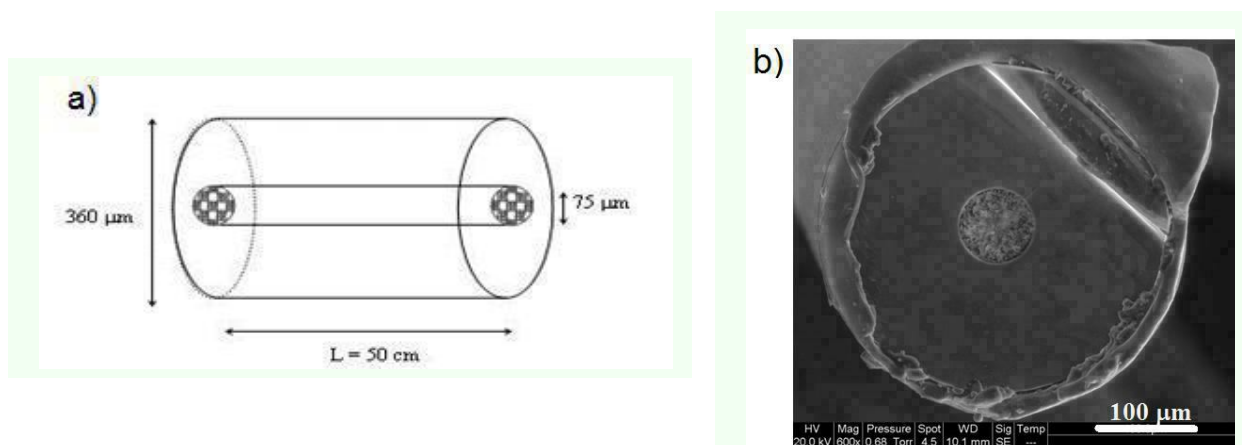


Figure 2. 3 : a) Schéma (non à l'échelle) d'un capillaire montrant ses dimensions. b) Cliché MEB du capillaire.

2. 1. 2. 2. Traitement de la surface du capillaire : silanisation

Le processus de synthèse d'un monolithe à l'intérieur d'un capillaire comporte une première étape ayant pour but la modification chimique des groupements silanol de la paroi du capillaire, dans le but de pouvoir ancrer le futur polymère aux parois. L'état de surface et la charge potentielle du capillaire sont donc modifiés afin de s'adapter aux fonctionnalités du monolithe qui sera synthétisé. L'importance de cette étape dans l'obtention d'un monolithe a été soulignée par quelques auteurs^{2,3,4,5,6,7,8} qui ont observé que sans aucune procédure de prétraitement, la colonne n'a pas un comportement régulier : il arrive qu'elle se détache en partie ou en entier des parois lors d'analyses sous champs électriques et qu'elle soit donc plus ou moins éliminée. Un des avantages de cette étape est donc de lier de façon covalente le polymère à la paroi du capillaire et ce, de façon uniforme et homogène. De plus, si le polymère est lié aux parois, les effets de bords devraient être minimisés lors d'analyses et

donc permettre d'obtenir de meilleures efficacités. Cette modification comprend généralement plusieurs étapes.

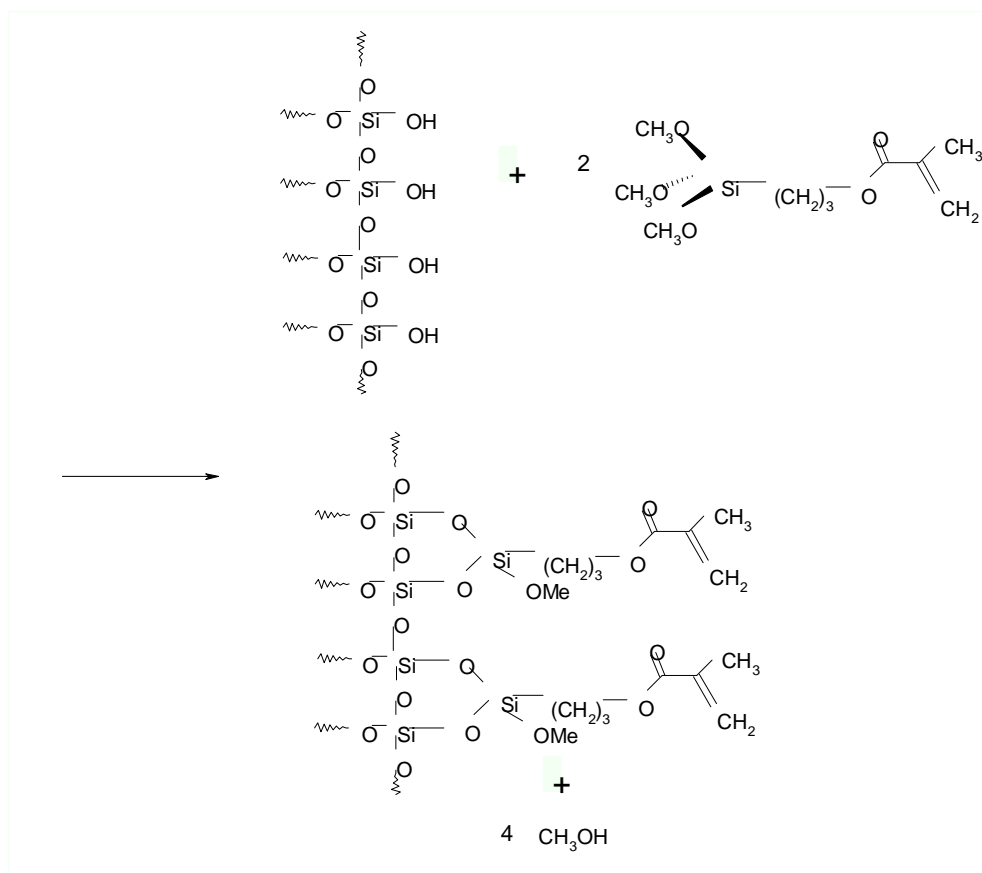


Figure 2. 4 : Schéma de la réaction de modification des parois du capillaire.

2. 1. 3. Polymérisation

Le mélange réactionnel constitué des monomères, du porogène et de l'amorceur indiqués précédemment est préparé dans des proportions indiquées ultérieurement. L'ensemble obtenu est soumis aux ultrasons pendant 5 min puis dégazé à l'argon. Le mélange est ensuite injecté à l'aide d'un pousse-seringue dans le capillaire en utilisant un raccord approprié. Celui-ci est fermé avant d'être placé sous irradiation UV (puissance : 40 W, intensité : $2100 \mu \text{Wcm}^{-2}$ $\lambda = 365 \text{ nm}$) pendant 2 heures environ. Le processus de polymérisation se passe en trois étapes: l'initiation, la propagation et la terminaison. Ces étapes sont décrites selon le schéma réactionnel donné sur la Figure 2. 5.

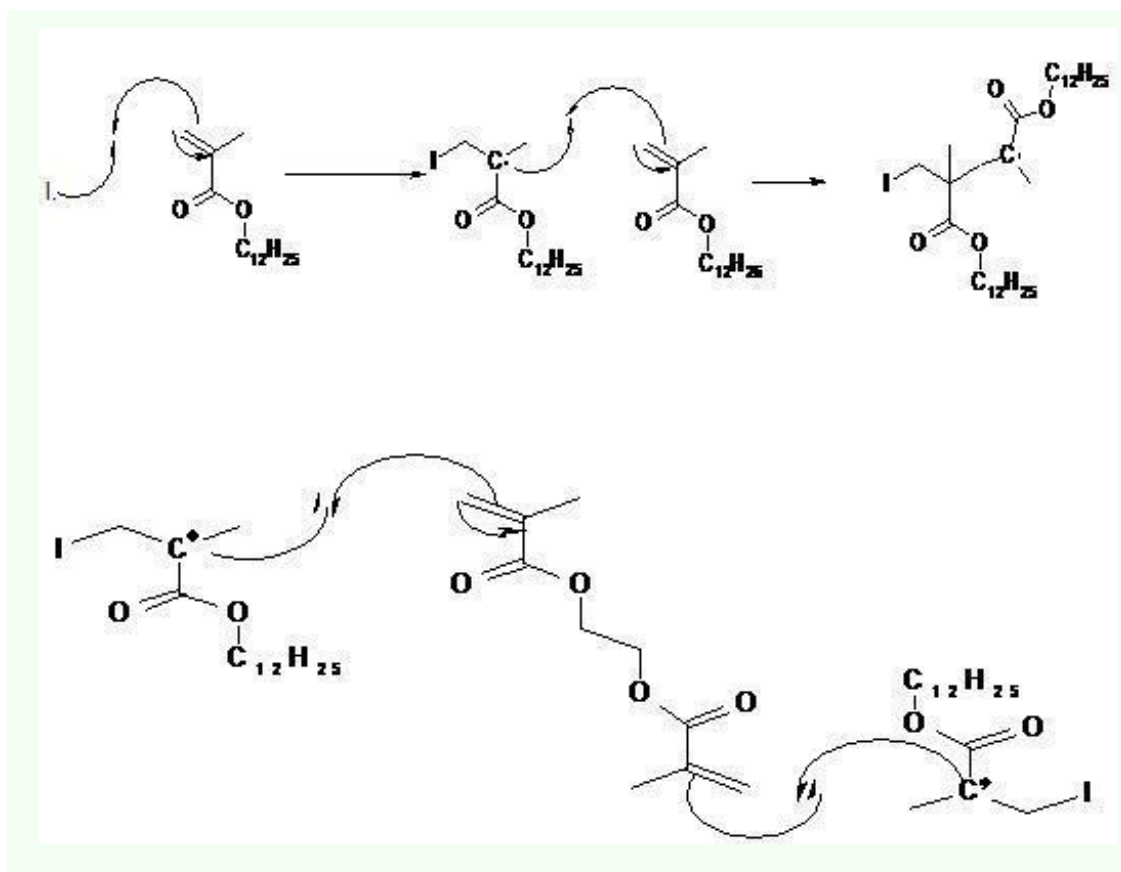


Figure 2. 5 : Schéma réactionnel montrant les différentes étapes de polymérisation.

Lorsque la polymérisation est terminée, le monolithe obtenu est lavé abondamment au méthanol pour éliminer toute trace du mélange réactionnel et séché à l'étuve une nuit (80 °C).

2. 1. 4. Marqueurs fluorophores

Les performances séparatives des colonnes synthétisées ont été évaluées à l'aide de tests de séparation comportant 2 marqueurs fluorophores Cye 3 et Cye 5 (Figure 2. 6) de structures chimiques très proches utilisés fréquemment dans la technique 2D Differential Gel Electrophoresis (2D-DIGE) pour la quantification des protéines.

Deux solutions à base de Cye 3 et de Cye 5 (Figure 2. 6) et de DMF (diméthylformamide) à 2 pmol/μL ont été diluées dans l'eau à 20 attomol/μL. Un mélange de 1 μL de chaque solution a

été mis dans un petit flacon avant d'être placé dans le passeur d'échantillon pour une injection automatique.

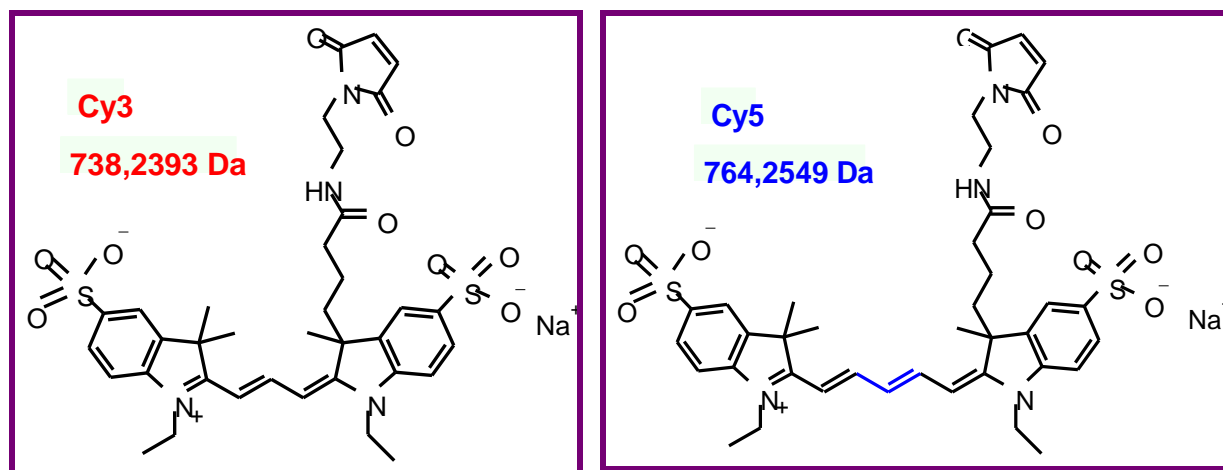


Figure 2. 6 : Structures chimiques des fluorophores commerciaux utilisés Cy3 et Cy5.

2. 1. 5. Viscosité de l'éluant

Le choix de l'éluant a été déterminé par deux facteurs importants. La qualité de solvation par rapport au réseau polymère qui peut avoir un effet sur son gonflement ou contraction pendant les mesures de séparation. Pour cette raison, l'éluant utilisé est l'eau déionisée (mauvais solvant), l'acétonitrile pur (ACN, un bon solvant), ou un mélange EAU/ACN communément utilisé comme phase éluante. Le second facteur important est la viscosité qui a un comportement particulier en fonction de la composition du mélange. En effet, pour mettre en évidence ce caractère particulier, la variation de la viscosité du mélange EAU/ACN en fonction de la fraction molaire en ACN a été étudiée expérimentalement dans la référence⁹. Dans la Figure 2. 1, nous avons utilisé les résultats expérimentaux obtenus par les auteurs et leur ajustement par une série polynomiale selon l'équation :

$$\eta = \sum_{j=0,n} c_j x^j \quad (2. 1)$$

où x_2 représente la fraction molaire en ACN, les c_j sont les coefficients d'ajustement polynomial donné dans le Tableau 2. 3

Cette équation permet de calculer la viscosité du mélange à une composition donnée. La Figure 2. 7 représente la variation de la viscosité pour un mélange eau/ACN en fonction de la fraction molaire (Figure 2. 7a) ou de la fraction volumique d'ACN (Figure 2. 7b), On voit bien que le mélange présente un maximum de viscosité pour une fraction molaire d'ACN, $x_{ACN}=0.077$ ou pour une fraction volumique $\phi_{ACN} = 0.196$.

Tableau 2. 1 Coefficients d'ajustement des points expérimentaux de la viscosité du mélange des mélanges eau/ACN $c_i/(mPa \cdot s)$ de la série polynomiale selon l'Equation 2. 1.

c_0	c_1	c_2	c_3	c_4	c_5	c_6
0.89606	2.4347	- 22.175	61.922	-91.094	67.935	- 19.580

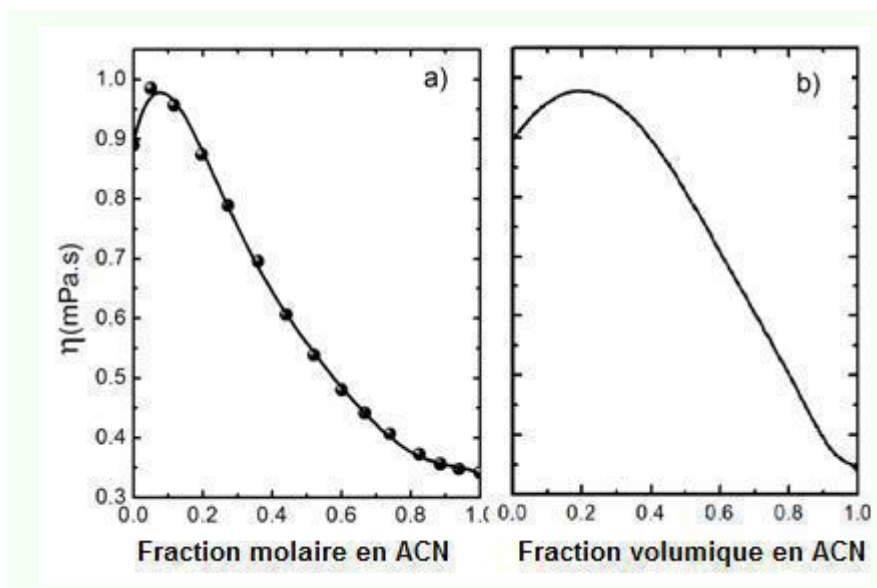


Figure 2. 7 : Variation de la viscosité du mélange porogène EAU/ACN en fonction a) de la fraction molaire x_2 en acétonitrile b) de la fraction volumique d'ACN . Les symboles représentent les points expérimentaux mesurés à 25°C reportés dans la référence 9. La courbe représente un ajustement en série polynomiale selon l' Equation 2. 1.

Dans l'étude des propriétés micro fluidiques des colonnes préparées ainsi que dans les tests préliminaires de séparation, l'éluant a été utilisé sous la forme d'eau pure noté EAU d'ACN pur ou du mélange eau/ACN. Dans ce dernier cas, nous avons choisi deux compositions déterminées correspondant à la composition 25% eau, 75 % acétonitrile) noté 75ACN et un mélange donnant une viscosité maximale notée par la suite ACN(η_{\max})

Les viscosités η pour les deux mélanges ainsi que celles des constituants purs sont données dans le Tableau 2.2.

Tableau 2. 2 : Viscosités en Pa.s des différents éluants utilisés.

Solvant	EAU	ACN(η_{\max})	75ACN	ACN
Viscosité [Pa.s]	$8,90 \times 10^{-4}$	$9,71 \times 10^{-4}$	$5,53 \times 10^{-4}$	$3,70 \times 10^{-4}$

2. 1. 6. Appareillages et techniques expérimentales utilisés

2.1. 6. 1. L'Ultimate[®] 3000 de LC-packing[™] Dionex

L'Ultimate 3000 (U3000) constitue la nouvelle génération nanoLC de LC -packing Dionex. Son avantage essentiel est la présence d'un pont fluidique qui permet de corriger le débit dans la colonne en fonction de la perte de charge. Si la perte de charge de la colonne est importante, un débit apparaît dans le pont et une vanne (stepper) se ferme pour créer une perte de charge et augmenter le débit dans la colonne. Le débit dans le pont ne doit pas dépasser 2 nL min⁻¹. Deux paramètres supplémentaires sont mesurés dans le cas de l'U3000 : la valeur du stepper caractérise l'état de fermeture ou d'ouverture de la vanne .



Figure 2. 8 : Ultimate 3000 de LC-Packing Dionex

Le gestionnaire de l'écoulement (flow manager) permet de générer de faibles débits constants allant de micro à des nano litres indépendamment de la pression et de la viscosité du solvant et réguler la température avec une précision de $\pm 0.1^\circ\text{C}$. Une bonne régulation de la température permet de réduire les fluctuations dans la mesure du temps de rétention.

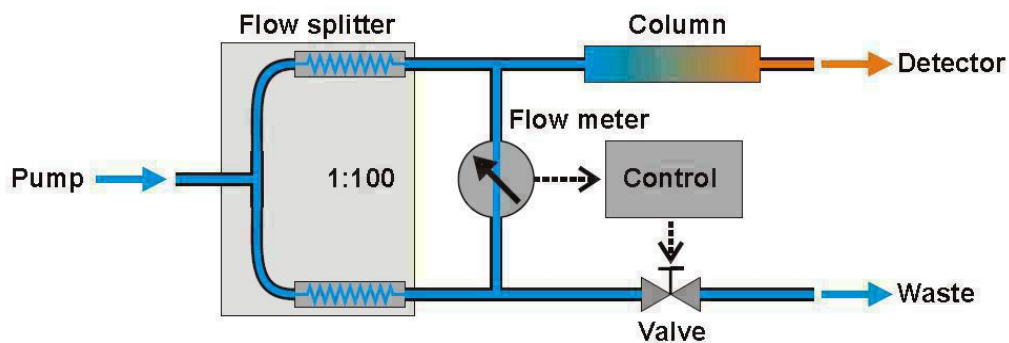


Figure 2. 9 : Schéma du principe de fonctionnement du T-séparateur et du contrôle de température.

La phase mobile binaire est composée d'eau et d'acétonitrile. Le gradient d'élution utilisé est un gradient classique en chromatographie liquide phase inverse. Il commence par l'eau acidifiée et se termine par l'acétonitrile, afin d'éluer les échantillons retenus par des interactions hydrophobes à l'intérieur de la colonne.

2. 1. 6. 2. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Les monolithes ont été observés par microscopie électronique à balayage (MEB). Ces observations ont été effectuées sur des sections transversales des capillaires. Le MEB est une technique destructive mais elle est réalisée sur des sections de capillaire très courtes. A cette fin, les capillaires sont coupés proprement à l'aide d'un outil adéquat de façon à générer une section nette, qui est alors observée. Ici, nous avons utilisé un microscope dont le filament est à basse tension, ce qui permet de s'affranchir de l'étape de métallisation du matériau préliminaire.



Figure 2. 10 : Photographie du MEB ((Marque FEI, modèle QUANTA 200 environmental MEB environmental filament de tungstène. Pression : 20Kv, spot 2.0).

2. 2. MORPHOLOGIE A SEC : MEB

2. 2. 1. Effet de la composition de l'agent réticulant EDMA

Les colonnes monolithiques préparées ont été observées au microscope électronique à balayage (MEB) pour obtenir des informations sur la morphologie à sec. La Figure 2. 11 montre des clichés MEB des colonnes monolithiques ayant différentes compositions en réticulant comme indiqué sur la légende. La composition du mélange porogène a été maintenue constante et égale à 80/20 cyclohexanol/éthylène glycol.

Ces clichés révèlent un remplissage total du capillaire ainsi qu'une homogénéité structurale. De plus, les clichés c) et f) qui représentent une vue agrandie de la phase monolithique au voisinage de la paroi montrent qu'il n'existe pas de larges fissures ou failles entre le matériau monolithique et la paroi du capillaire et que, par conséquent, le traitement des parois a été efficace.

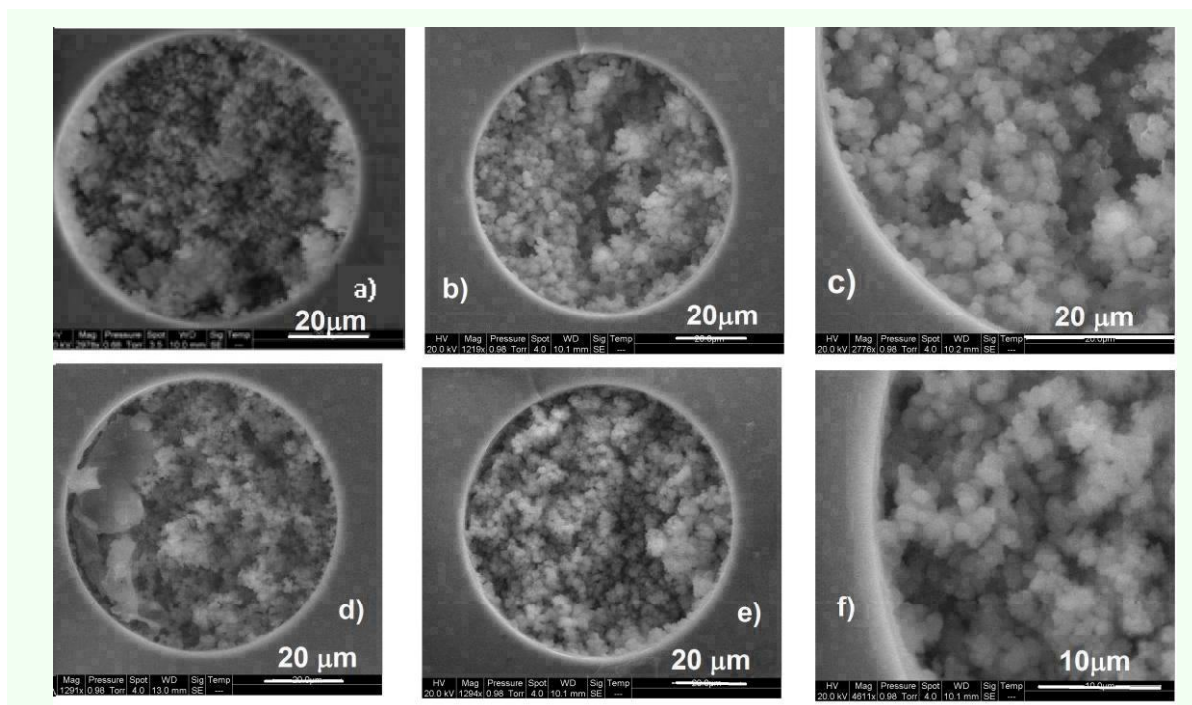


Figure 2. 11 : Clichés MEB de colonnes monolithiques dont les compositions sont a) 35% EDMA, b) 37% EDMA, c) 37% EDMA (vue agrandie), d) 39% EDMA, e) 40% EDMA, f) 40% EDMA (vue agrandie).

La taille des nodules pour les monolithes préparés avec différentes concentrations en EDMA a été estimée manuellement en ajustant à des cercles 50 nodules pris au hasard sur les clichés MEB. Les diamètres de ces cercles ont été reportés sur les histogrammes de la Figure 2. 12. On note une faible distribution de la taille des nodules avec des diamètres au maximum de la distribution situés entre $0.94 \mu\text{m}$ pour la colonne à 35% EDMA et $1.75 \mu\text{m}$ pour la colonne à 37% EDMA.

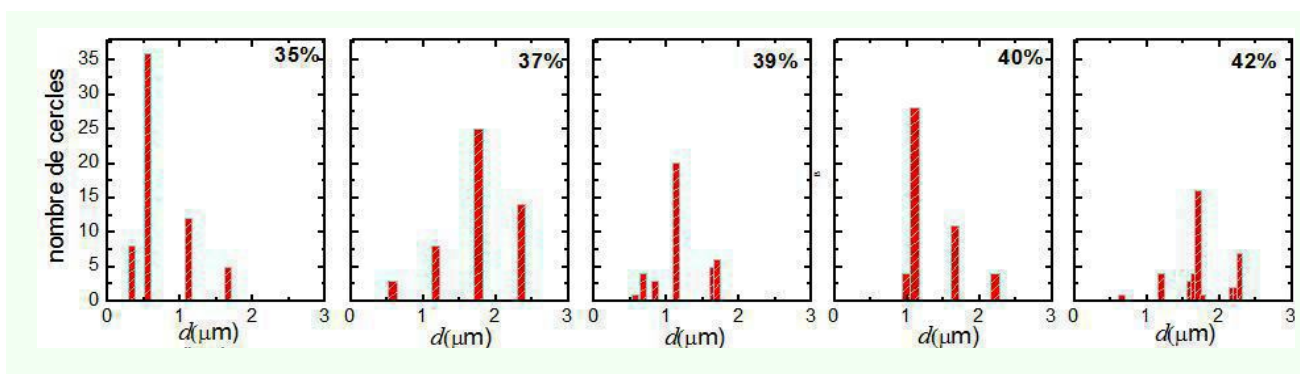


Figure 2. 12 : Distribution des diamètres des nodules estimés manuellement sur les clichés MEB de monolithes à base de LMA/EDMA ayant les pourcentages en EDMA indiqués sur la figure.

2. 2. 2. Effet de la composition du mélange porogène

Pour étudier l'effet de la composition du mélange porogène cyclohexanol/éthylène glycol, trois colonnes ayant des compositions différentes du mélange porogène. La colonne 1 est riche en bon solvant (cyclohexanol), le rapport CyOH /Et(OH)₂ est de 80/20, il est de 75/25 dans la colonne 2, et de 60/40 dans la colonne 3.

Colonne	Col1	Col2	Col3
Vol. % CyOH/Et(OH) ₂	80/20	75/25	60/40

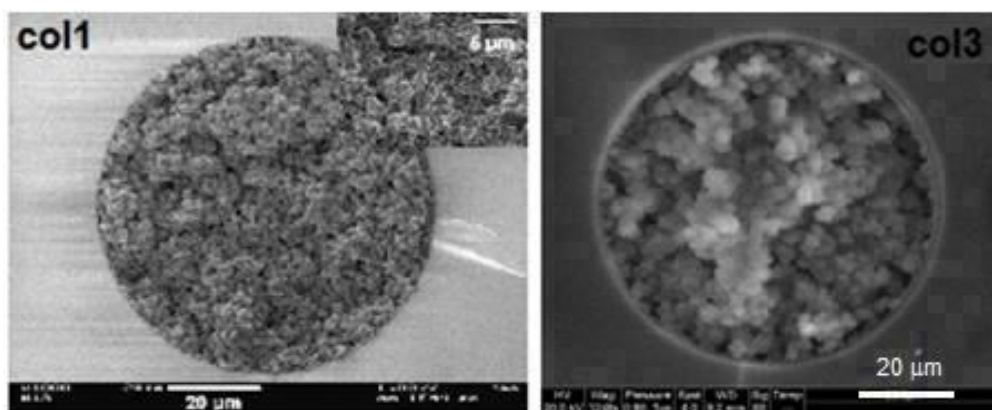


Figure 2. 13 : Images MEB des colonnes 1 et 3 montrant l'effet de la composition du porogène sur la morphologie des monolithes préparés. La colonne 2 montre une morphologie similaire à celle de la colonne 1. La barre d'échelle est de 20 µ m.

La colonne 1 riche en bon solvant (80% de CyOH) présente une apparence homogène avec un grand nombre de nodules de petite taille et répartis de manière régulière sur toute la section du capillaire. Les photos de la colonne 2 ne sont pas montrées ici parce qu'elles montrent la même morphologie que celle de la colonne 1. La colonne 3 correspondant au porogène CyOH/Et(OH)₂ 60/40 montre de gros globules séparés par de larges vides. La taille des globules a visiblement augmenté par rapport à ceux de la colonne 1.

L'éthylène glycol est un mauvais solvant pour le polymère en croissance, tandis que le cyclohexanol est un bon solvant. Il est ainsi possible de modifier la cinétique de précipitation

des nodules et la cinétique de polymérisation en faisant varier la fraction volumique du bon solvant.

Une augmentation du pourcentage de cyclohexanol par rapport à celui de l'éthylène glycol provoque une augmentation de la surface spécifique du polymère. De plus, une augmentation du pourcentage en bon solvant retarde la séparation des phases. Une compétition existe entre la solubilité du monomère dans le solvant et dans les nodules. La concentration de monomère dans les nodules tend à diminuer et par conséquent l'augmentation de la taille des nodules est plus limitée. Il en résulte alors un plus grand nombre de nodules et la distribution poreuse se déplace vers les plus faibles valeurs de taille de pores.

Il est ainsi possible de contrôler la distribution poreuse d'un monolithe par modification du rapport des solvants porogènes. Ce contrôle de la taille des pores permet alors de jouer sur le flux de la phase mobile. Ces observations sont en accord avec celles reportées par Trojer et al.¹⁰ qui étudièrent l'effet de la composition du mélange porogène sur la la taille des pores.

2. 3. ETUDE MICROFLUIDIQUE

Dans cette partie, nous présentons quelques résultats préliminaires obtenus sur les colonnes préparées. Nous mettons l'accent sur les trois effets suivants : effet de la concentration en agent réticulant (EDMA), effet de la composition du porogène et effet de la nature et composition de l'éluant. Nous examinerons à la fois la morphologie à sec obtenue par microscopie électronique et la porosité à l'état humide tenant compte du phénomène de gonflement et des interactions éluant/matrice polymère (interactions de type hydrophile/hydrophobe).

2. 3. 1. Effet de l'agent réticulant

2. 3. 1. 1. Identification des colonnes préparées

Dix colonnes monolithiques ont été préparées selon le procédé décrit au paragraphe 2. 1 de ce chapitre en variant le pourcentage de l'agent réticulant de 31% à 44% EDMA dans le mélange de polymérisation comme indiqué dans le Tableau 2. 3.

La composition du porogène pour les dix colonnes a été fixée à 80% de cyclohexanol (CyOH, bon solvant) et 20% d'éthylène glycol (Et(OH)₂, mauvais solvant).

Tableau 2. 3 : Identification des dix colonnes préparées

Colonne	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Longueur (cm)	30.2	27	21.5	26.9	30	28.2	26.5	22.8	21.3	25.5
% LMA	69	67	66	64	63	62	61	60	59	58
% EDMA	31	33	35	36	37	38	39	40	42	44

2. 3. 1. 2. Etude fluïdique en mode statique

Pour accéder aux propriétés microfluidiques des colonnes monolithiques préparées, nous avons mesuré la chute de pression en utilisant un gradient d'étape tout en maintenant le débit constant à 200 nL/mn. Nous utilisons la même série de colonnes monolithiques préparées à base de LMA/EDMA pour les deux études (statiques et dynamiques). Leurs longueurs sont indiquées dans le Tableau 2. 1. L'ultimate U3000 nano LC maintient la pression constante en compensant automatiquement la chute de pression dans une des branches du T-séparateur.

Dans ce protocole, nous avons utilisé trois éluants de compositions différentes : l'eau pure, un mélange eau/ACN communément utilisé comme phase éluante : (de composition 25% eau, 75 % acétonitrile) noté ici 75ACN et le mélange ayant une viscosité maximale noté ACN(η_{max}). Le protocole utilisé est schématisé sur la Figure 2. 14.

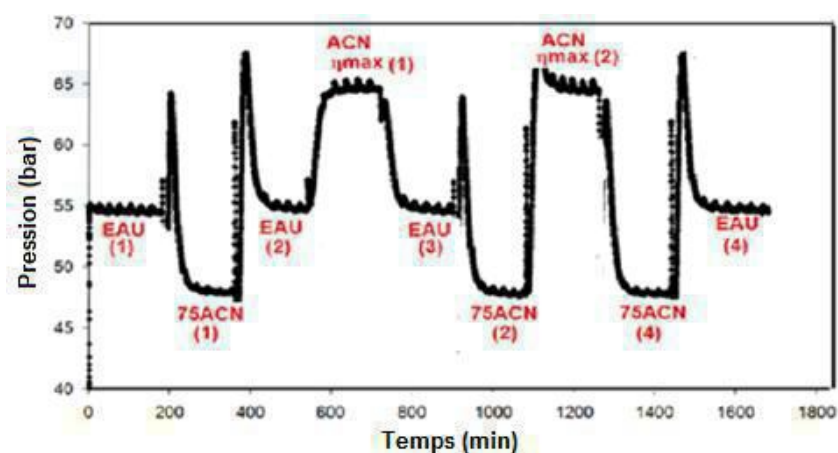


Figure 2. 14 : Variation de la pression en fonction du temps à un débit constant de 200 nL/min sur une colonne monolithique LMA/EDMA de composition 44% EDMA lors de l'injection successive des éluants indiqués sur cette figure.

La Figure 2. 14 montre que le protocole commence par l'injection de l'eau pure pendant 200 minutes noté EAU(1), puis une injection du mélange eau/ACN à 75 % ACN noté 75ACN (1) pendant le même temps, une deuxième injection de l'eau pure sera notée EAU(2), suivie d'une injection du mélange eau/ACN à viscosité maximale noté ACN η_{\max} (1). La suite du protocole d'injection de l'éluant est indiquée clairement sur la Figure 2. 12. Ce programme d'éluant est réalisé en mesurant la perte de charge ou chute de pression obtenue lors des injections successives des différents éluants dans une colonne monolithique et en maintenant le débit constant. Le même protocole a été utilisé pour toutes les colonnes préparées. Ces colonnes diffèrent par leur concentration en réticulant EDMA.

Nous avons choisi de donner quelques courbes de la perte de charge en fonction du temps de rétentions obtenus pour certaines colonnes seulement sur la Figure 2. 15. Le calcul des moyennes des pressions obtenues lors des passages successives des trois différents éluant ainsi que les écarts type correspondant montrent une bonne reproductibilité des résultats pour les différentes colonnes et les trois éluants. Ce qui pourrait indiquer la bonne stabilité de ces monolithes. La totalité des résultats est regroupée sous forme numérique dans les Tableaux 2. 5. et 2. 6.

Lorsque l'eau est utilisée comme éluant, la valeur de la pression varie de 50 à 84 bars environ pour toutes les colonnes testées, si c'est le mélange Eau/ACN à 75% ACN, elle varie entre 50 et 69 bars et enfin pour le mélange ayant une viscosité maximale EAU/ACN(η_{\max}), la pression varie de 61 à 167 bars, pour des longueurs de colonnes allant de 24 à 29 cm, comme indiqué sur le Tableau 2. 3. Ces valeurs de pressions sont nettement inférieures à celles obtenues pour une colonne commerciale PepMap[®] d'une longueur de 15 cm remplie de billes de silice. Pour toutes les colonnes préparées à différents % EDMA, les pressions obtenues lorsque le mélange 75 ACN est utilisé comme éluant sont toujours inférieures à celles obtenues pour les deux autres éluants EAU et ACN(η_{\max}).

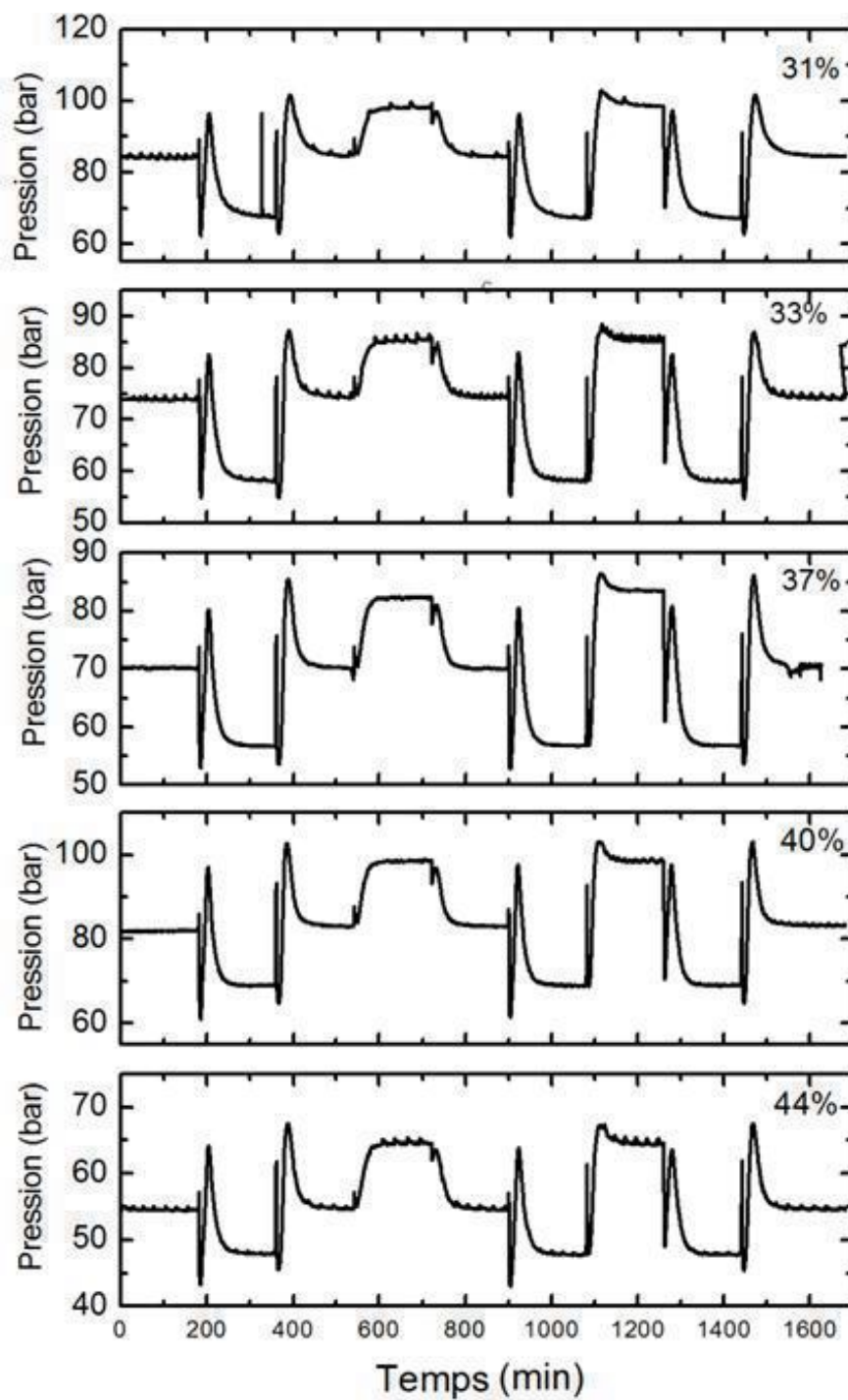


Figure 2. 15 : Variation de la pression en fonction du temps à un débit constant égal à 200 nL/min sur des colonnes monolithiques à base de LMA/EDMA différentes par leurs pourcentages en EDMA (indiqués sur la Figure) lors de l'injection successive de plusieurs éluants selon le protocole décrit sur la Figure 2. 14.

Tableau 2. 4 : Moyennes des pertes de charge obtenues sur chaque passage des trois éluants pour les dix colonnes monolithiques préparées et pour une colonne conventionnelle constituée de particules tassées de type PepMap[®]. Les longueurs des colonnes et les pourcentages d'EDMA sont précisés sur ce tableau.

% EDMA	L (cm)	Pression (bar)								
		Eau (1)	75ACN (1)	Eau (2)	ACN η max (1)	Eau (3)	75ACN (2)	ACN η max (2)	75ACN (3)	Eau (4)
31	24,8	84,7	67,75	84,81	98,35	84,82	67,82	99,26	67,75	84,84
33	27,7	74,26	58,28	74,42	86,15	74,48	58,2	86,12	58,18	74,39
35	25	60,6	50,18	60,21	69,06	60,37	50,07	69,03	50,09	60,17
36	26,9	77,64	68,89	79,95	91,98	79,19	68,6	92,5	68,87	79
37	26,1	70	56,79	70,26	82,25	70,14	56,78	83,57	56,89	70
38	28,3	52,34	49,85	52,89	61,18	52,9	49,53	61,73	49,37	52,93
39	26,4	57,9	49,34	58,59	68,67	58,62	49,54	68,75	49,74	58,55
40	22,8	89,14	71,6	89,64	107,54	89,79	71,54	107,64	71,4	89,4
42	23,1	60,6	52,45	61,62	71,95	61,32	52,26	71,7	51,7	61,54
44	25,5	54,95	47,89	54,92	64,64	54,59	47,65	64,85	47,85	54,73
PepMap	15	153,71	101,9	156,56	176,18	156,32	102,01	174,93	101,9	153,79

Tableau 2. 5 : Moyennes des pertes de charge obtenues sur les différents passages des trois éluants et les dix colonnes monolithiques préparées. Les écarts types calculés sont également reportés.

% EDMA	Moyenne EAU	Ecart type EAU	Moyenne 75ACN	Ecart type 75ACN	Moyenne ACN (η max)	Ecart type (η max)
31	84,79	0,06291	67,77	0,04041	98,805	0,64346
33	74,38	0,09287	58,22	0,05292	86,135	0,02121
35	60,33	0,19602	50,11	0,05859	69,045	0,02121
36	78,94	0,96195	68,786	0,16196	92,24	0,36769
37	70,10	0,12543	56,82	0,06082	82,91	0,93338
38	52,76	0,2838	49,58	0,24440	61,455	0,38890
39	58,415	0,34453	49,54	0,2	68,71	0,05656
40	89,49	0,28464	71,51	0,10263	107,59	0,07071
42	61,27	0,464327	52,13	0,53033	71,825	0,17677
44	54,79	0,16919	47,79	0,12858	64,745	0,14849

Nous nous sommes intéressés à la perméabilité des phases monolithiques présentées ici. A cette fin, nous avons calculé pour les dix colonnes monolithiques dans différents solvants, la perméabilité B_0 de la phase stationnaire en utilisant la loi de Darcy.

$$B_0 = \frac{\eta L Q}{\Delta P L} \quad (2. 2)$$

où η est la viscosité de l'éluant, L la longueur de la colonne, Q le débit de fluide à travers la colonne, A l'aire de la section de la colonne et ΔP correspondant au plateau observé sur la courbe de la chute de pression (exprimée en Pascal). Les valeurs de η utilisées pour calculer B_0 sont données dans la Tableau 2. 4 et les résultats regroupés dans le Tableau 2. 6.

Les valeurs de B_0 calculées ont servi à estimer le diamètre moyen des pores d_p en utilisant l'équation de Kozeny -Carman¹¹ et en supposant que le monolithe est constitué d'une distribution homogène de particules sphériques¹²

$$d_p = 2 \times \sqrt{\frac{5 \times B_0}{\varepsilon_T}} \quad (2. 3)$$

$$d_s = 6 \times \sqrt{\frac{5 \times B_0}{\varepsilon_T}} \times \frac{1 - \varepsilon_T}{\varepsilon_T} = 3 \times d_p \times \frac{1 - \varepsilon_T}{\varepsilon_T} \quad (2. 4)$$

où d_s est le diamètre moyen équivalent d'une particule sphérique qui tient compte de la porosité totale de la colonne notée ε_T . Cette quantité qui représente la fraction volumique poreuse est prise, en première approximation, égale, pour les colonnes monolithiques, à la fraction volumique de porogène introduit dans le mélange réactionnel, i.e. 0.6 ou 0.65 selon que la colonne est préparée avec 60% ou 65% de fraction volumique de porogène. Dans l'Equation 2. 3, le coefficient 2 est lié à la géométrie des pores, qui sont supposés cylindriques alors que le facteur 5 est un coefficient empirique dit de Kozeny. Ce facteur reflète une structure composée de particules sphériques tassées. Les valeurs de d_p et d_s calculées pour les différentes colonnes sont rassemblées dans les Tableaux 2. 7 et 2. 8.

Tableau 2. 6 : Comparaison de la perméabilité des dix colonnes monolithiques entre elles et avec une colonne conventionnelle PepMap constituée de particules de silices tassées. Les valeurs de B_0 ont été calculées selon l'Eq. 2. 2. L'aire de la section des colonnes monolithiques ainsi que celle de la colonne PepMap est $A = 2,4 \times 10^{-9} \text{m}^2$. Le débit utilisé était de 200nLmin^{-1} .

% EDMA	L (cm)	Perméabilité $B_0 (\times 10^{-14} \text{m}^2)$								
		Eau (1)	75ACN (1)	Eau (2)	ACN η_{max} (1)	Eau (3)	75ACN (2)	ACN η_{max} (2)	75ACN (3)	Eau (4)
31	24,8	1,97	1,53	1,96	1,85	1,96	1,53	1,83	1,53	1,96
33	27,7	2,50	1,98	2,50	2,35	2,50	1,99	2,36	1,99	2,50
35	25	2,77	2,08	2,79	2,65	2,78	2,08	2,65	2,08	2,79
36	26,9	2,33	1,63	2,23	2,14	2,28	1,64	2,12	1,64	2,28
37	26,1	2,50	1,92	2,49	2,32	2,50	1,92	2,29	1,91	2,50
38	28,3	3,80	2,37	3,59	3,39	3,59	2,38	3,36	2,39	3,59
39	26,4	3,06	2,23	3,03	2,82	3,02	2,22	2,81	2,22	3,03
40	22,8	1,72	1,33	1,71	1,55	1,71	1,33	1,55	1,33	1,71
42	23,1	2,56	1,84	2,52	2,35	2,53	1,84	2,36	1,86	2,52
44	25,5	3,12	2,22	3,12	2,89	3,14	2,23	2,88	2,22	3,13
Pepmap	15	0,655	0,614	0,643	0,623	0,644	0,614	0,628	0,614	0,655

Tableau 2. 7 : Comparaison des diamètres des pores d_p des dix colonnes monolithiques entre elles et avec une colonne conventionnelle PepMap constituée de particules de silices tassées. Les diamètres ont été calculés en utilisant l'Eq. 2. 1. Les valeurs de ε_T utilisées étaient de 0.65 pour les colonnes monolithiques et de 0.3 pour la colonne PepMap.

% EDMA	L (cm)	d_p (μ m)								
		Fan (1)	75ACN (1)	Fan (2)	ACN η max (1)	Fan (3)	75ACN (2)	ACN η max (2)	75ACN (3)	Fan (4)
31	24,8	0,778	0,686	0,777	0,754	0,777	0,685	0,750	0,686	0,777
33	27,7	0,878	0,781	0,877	0,851	0,877	0,782	0,851	0,782	0,877
35	25	0,923	0,800	0,926	0,903	0,925	0,801	0,903	0,801	0,927
36	26,9	0,846	0,709	0,827	0,812	0,838	0,710	0,808	0,710	0,837
37	26,1	0,878	0,768	0,876	0,846	0,877	0,768	0,839	0,768	0,878
38	28,3	1,08	0,854	1,05	1,02	1,05	0,857	1,02	0,858	1,05
39	26,4	0,970	0,829	0,965	0,931	0,965	0,827	0,930	0,826	0,965
40	22,8	0,727	0,639	0,725	0,691	0,724	0,640	0,691	0,640	0,726
42	23,1	0,887	0,752	0,880	0,851	0,882	0,753	0,852	0,757	0,881
44	25,5	0,979	0,827	0,979	0,943	0,982	0,829	0,941	0,827	0,981
Pepmap	15	0,661	0,640	0,655	0,645	0,655	0,640	0,647	0,640	0,661

Tableau 2. 8 : Comparaison des diamètres moyens équivalents pour les dix colonnes monolithiques entre elles et avec une colonne conventionnelle PepMap constituée de particules tassées. Les valeurs de d_s ont été calculées en utilisant l'Eq. 2. 2.

% EDMA	$d_s(\mu\text{ m})$								
	Eau (1)	75ACN (1)	Eau (2)	ACN η_{max} (1)	Eau (3)	75ACN (2)	ACN η_{max} (2)	75ACN (3)	Eau (4)
31	1,26	1,11	1,26	1,22	1,26	1,11	1,21	1,11	1,26
33	1,42	1,26	1,42	1,37	1,42	1,26	1,38	1,26	1,42
35	1,49	1,29	1,50	1,46	1,49	1,29	1,46	1,29	1,50
36	1,37	1,14	1,34	1,31	1,35	1,15	1,31	1,15	1,35
37	1,42	1,24	1,42	1,37	1,42	1,24	1,36	1,24	1,42
38	1,75	1,38	1,70	1,65	1,70	1,38	1,64	1,39	1,70
39	1,57	1,34	1,56	1,50	1,56	1,34	1,50	1,33	1,56
40	1,17	1,03	1,17	1,12	1,17	1,03	1,12	1,03	1,17
42	1,43	1,21	1,42	1,37	1,43	1,22	1,38	1,22	1,42
44	1,58	1,34	1,58	1,52	1,59	1,34	1,52	1,34	1,58
Pepmap	4,63	4,48	4,58	4,51	4,59	4,48	4,53	4,48	4,63

Les résultats donnés sous forme numériques dans ces tableaux sont mieux visualisés sous forme graphique comme le montre la Figure 2. 16.

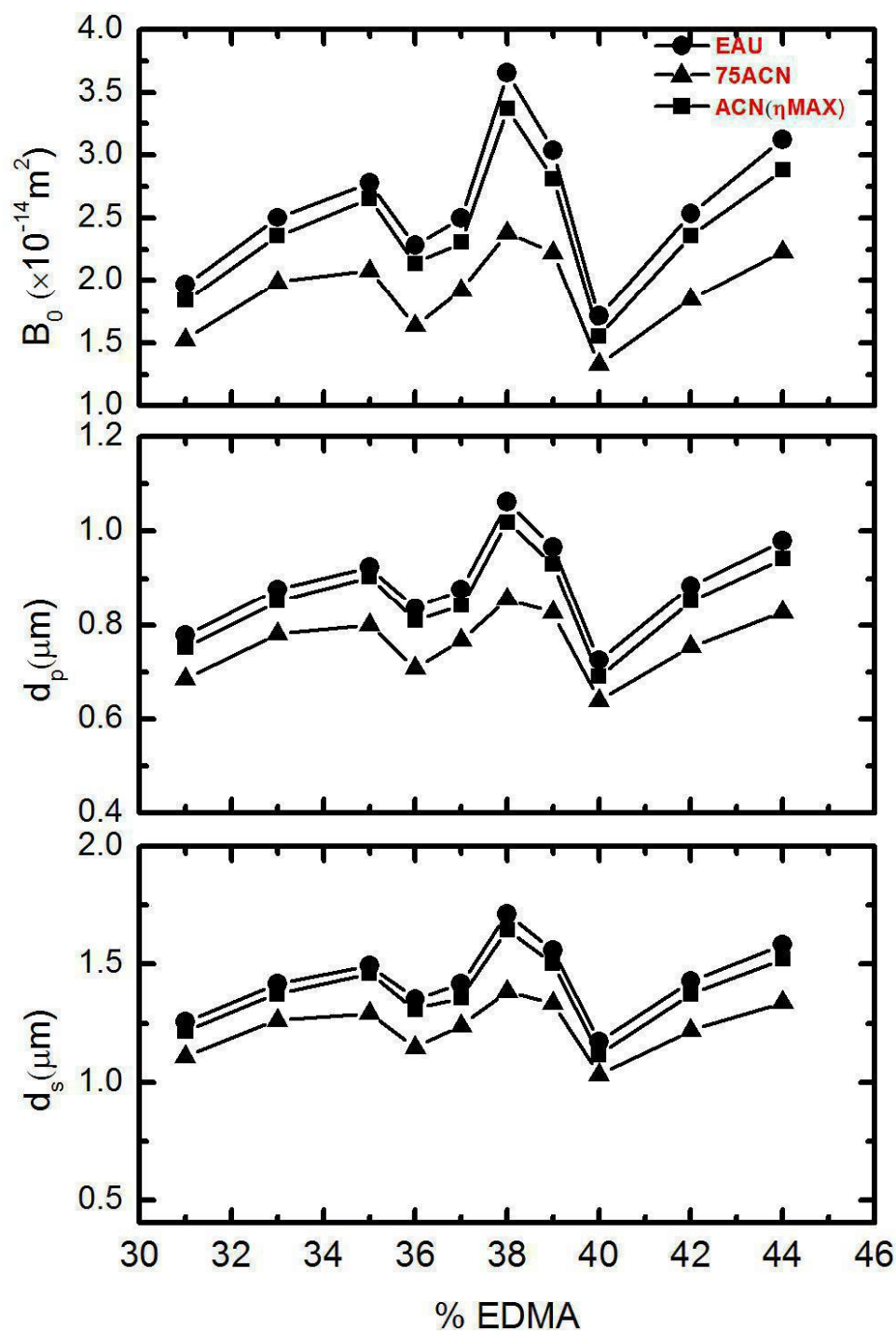


Figure 2. 16 : a) Perméabilité B_0 moyenne en fonction du pourcentage en EDMA pour les trois éluants EAU/AC η_{\max} , EAU, 75ACN. b) Diamètres moyens des pores des dix colonnes monolithiques c) Diamètres moyens équivalents des particules pour les dix colonnes monolithiques.

Nous notons une bonne corrélation entre les valeurs de la perméabilité B_0 , les diamètres moyens des pores d_p et les diamètres moyens équivalents des pores d_s , ce qui est naturel puisque la valeur de B_0 conditionne celle de d_p d'une part et celle de d_s , d'autre part. Nous observons aussi que l'ordre de grandeur est le même pour les trois paramètres.

Si l'eau est utilisée comme éluant, la perméabilité B_0 est la plus élevée pour les dix colonnes préparées. Les valeurs de la chute de pression ΔP mesurées confortent ces résultats (Tableau 2. 5) puisque celle-ci est inversement proportionnelle à la perméabilité comme le prédit la loi de Darcy (Equation 2. 2). Le mélange à 75ACN donne la perméabilité la plus faible par rapport aux autres mélanges. La Figure 2. 16 montre que la perméabilité est systématiquement dans l'ordre $B_0(\text{ACN}) < B_0(75\text{ACN}(\eta_{\text{max}})) < B_0(\text{EAU})$.

Parmi les dix colonnes préparées, celle qui contient 38% de EDMA dans le mélange de polymérisation donne les perméabilités les plus élevées pour les trois éluants utilisés 75ACN, ACN(η_{max}) et EAU, ($2.38 \times 10^{-14} \text{ m}^2$, $1.37 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ et $1.65 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ respectivement). Les diamètres des pores et des particules équivalents sont aussi les plus élevés pour cette colonne. Les valeurs de B_0 , et d_p calculées pour la colonne commerciale PepMap[®] sont beaucoup plus faibles que celles des colonnes monolithiques préparées. Ceci est dû à la taille (plus courte que les colonnes monolithiques préparées), à la composition et la nature de la colonne commerciale faite de particules de silices tassées.

2. 3. 1. 3. Etude microfluidique en mode dynamique

Dans cette partie, nous étudions les propriétés hydrodynamiques des colonnes monolithiques à la base de lauryl de méthacrylate LMA en fonction de la composition en agent réticulant EDMA à différents débits en faisant varier le pourcentage de l'agent réticulant EDMA dans le mélange de polymérisation. Les colonnes capillaires ont une longueur de 20-30 cm pour mimer les colonnes commerciales et faciliter la comparaison de performances.

Le gradient d'éluant utilisé est un gradient classique en chromatographie liquide phase inverse. Il commence par l'eau acidifiée et se termine par l'acétonitrile, afin d'élué les échantillons retenus par des interactions hydrophobes à l'intérieur de la colonne.

Dans le cas présent, nous avons utilisé deux types de phases mobiles, la phase mobile A constituée de 100% d'eau acidifiée avec 0,1% d'acide formique, et la phase mobile B

constituée de 80% d'acétonitrile et de 20% d'eau. L'acide formique permet de contrôler la charge -et donc l'hydrophobicité - des peptides qui varie selon le pH.

Afin de vérifier la stabilité mécanique de la colonne, nous avons dans un premier temps, examiné la variation de la perte de charge ΔP en fonction du temps pour différents débits variant de 50 à 200 nL min^{-1} pour la colonne à 37% d'EDMA. Les résultats obtenus sont regroupés sur la Figure 2. 17.

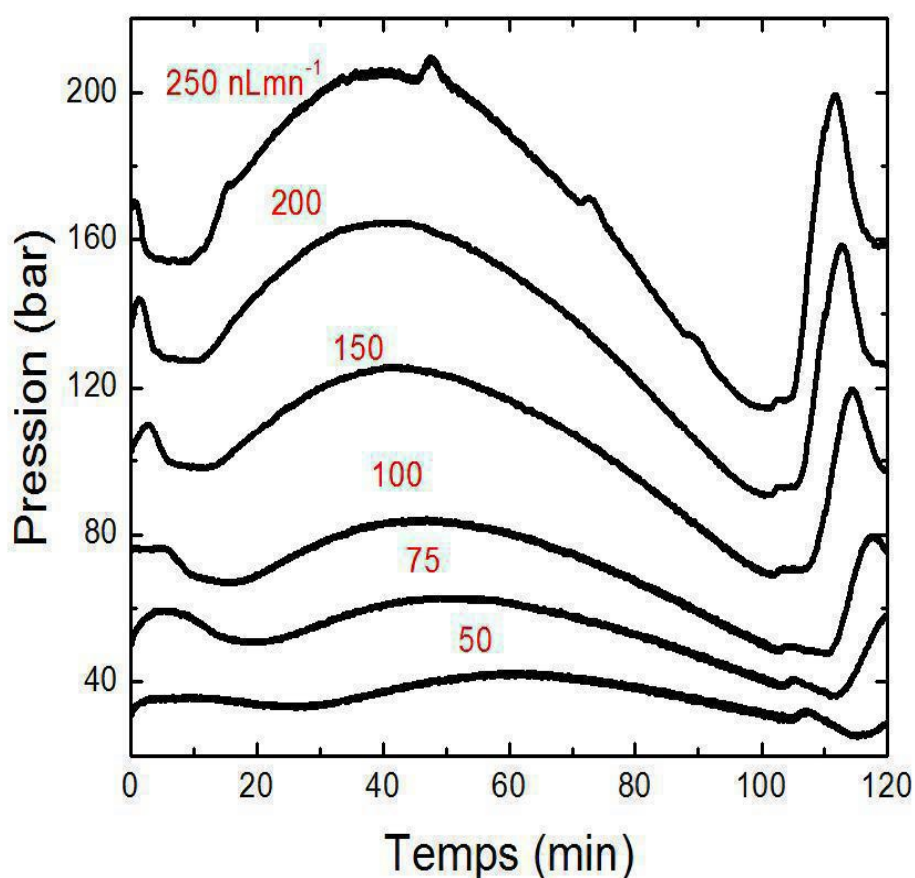


Figure 2. 17 : Evolution de la pression à différents débits lors d'un gradient d'élution eau/ACN sur une colonne monolithique à base de méthacrylate à 37% EDMA.

Toutes ces courbes ont la même allure. Elles se caractérisent par une baisse de pression au début et à la fin du gradient et par une augmentation de pression lorsque la teneur en ACN augmente. Les valeurs de pression mesurées varient entre 25 et 205 bars environ pour cette colonne. Ces courbes ont permis d'obtenir les variations de pression en fonction du débit pour les éluants : EAU, ACN et ACN(η_{\max}) représentées sur la Figure 2. 18.

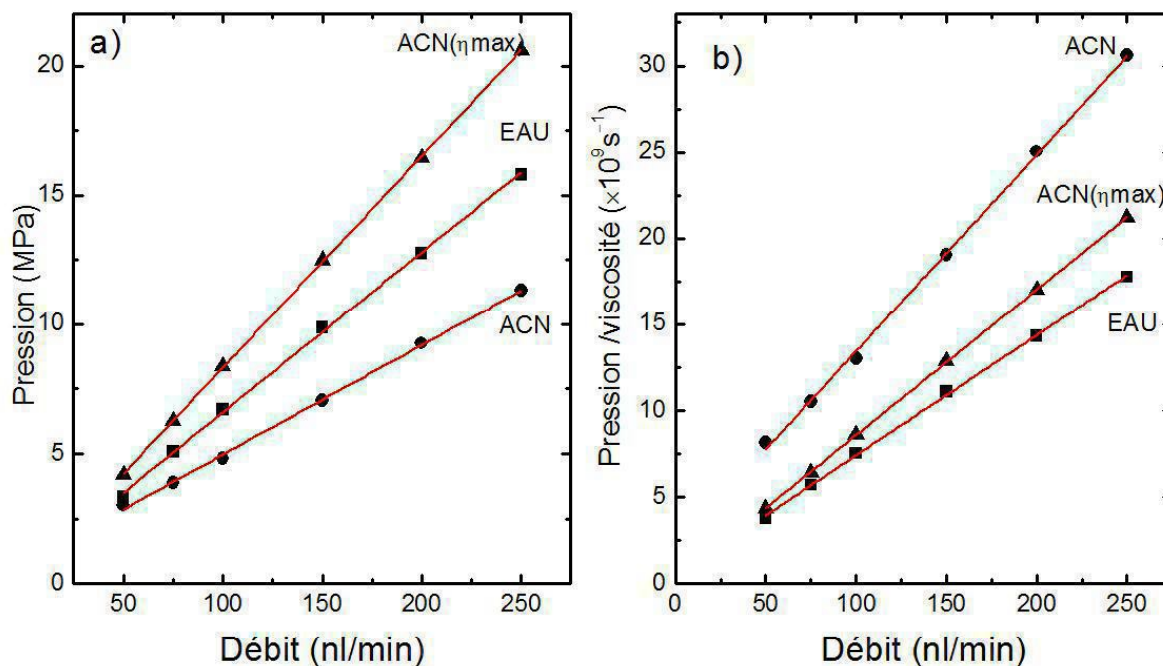


Figure 2. 18 : a) Perte de charge ΔP en fonction du débit pour la colonne préparée avec une concentration de réticulant EDMA de 37% dans le mélange LMA/EDMA. Cette figure regroupe les résultats obtenus pour les trois éluants ACN, EAU et ACN(η_{\max}). Les droites représentent un ajustement linéaire. b) Pression normalisée à la viscosité de l'éluant. Les droites représentent un ajustement linéaire.

La Figure 2. 18 montre une dépendance linéaire entre le débit et la perte de charge ΔP pour les trois solvants. Cette linéarité atteste de la grande stabilité mécanique du monolithe capable de résister à des pressions aussi élevées que 20 MPa.

Comme pour les résultats obtenus en statique, les pressions obtenues dans l'ACN pur sont toujours inférieures à celles obtenues pour les deux autres éluants EAU et ACN(η_{\max}). Pour vérifier si ce comportement est dû seulement à la différence de viscosité entre les trois solvants, nous avons représenté la variation de la perte de charge normalisée à la viscosité en fonction du débit. Effectivement, l'ordre des droites change mais les résultats demeurent différents pour les trois éluants probablement à cause de la différence de solvation dans le polymère. Nous constatons que les pentes ont tendance à diminuer systématiquement dans l'ordre suivant : ACN(η_{\max}), EAU, ACN, correspondant à un ordre décroissant des viscosités. Ces résultats sont qualitativement cohérents avec ceux obtenus par d'autres auteurs dans des conditions similaires.^{13,14}

Le gonflement du polymère dans l'ACN qui est un bon solvant (par rapport à l'eau et à l'ACN(η_{\max})) donne lieu à une diminution de la taille des pores et donc une réduction de la perméabilité B_0 . C'est effectivement le phénomène observé ici puisque comme le montre la Figure 2. 18, la perméabilité est systématiquement dans l'ordre suivant : $B_0(\text{ACN}) < B_0(\text{ACN}(\eta_{\max})) < B_0(\text{EAU})$. Ce résultat est également cohérent avec celui obtenu par Le Gac et al. dans des conditions similaires.¹

Les variations de pression en fonction du temps ont été mesurées selon la même procédure pour quatre autres colonnes correspondant à des concentrations en EDMA différentes et fixant le débit à 100 nL/min. Les résultats sont donnés sur la Figure 2. 19.

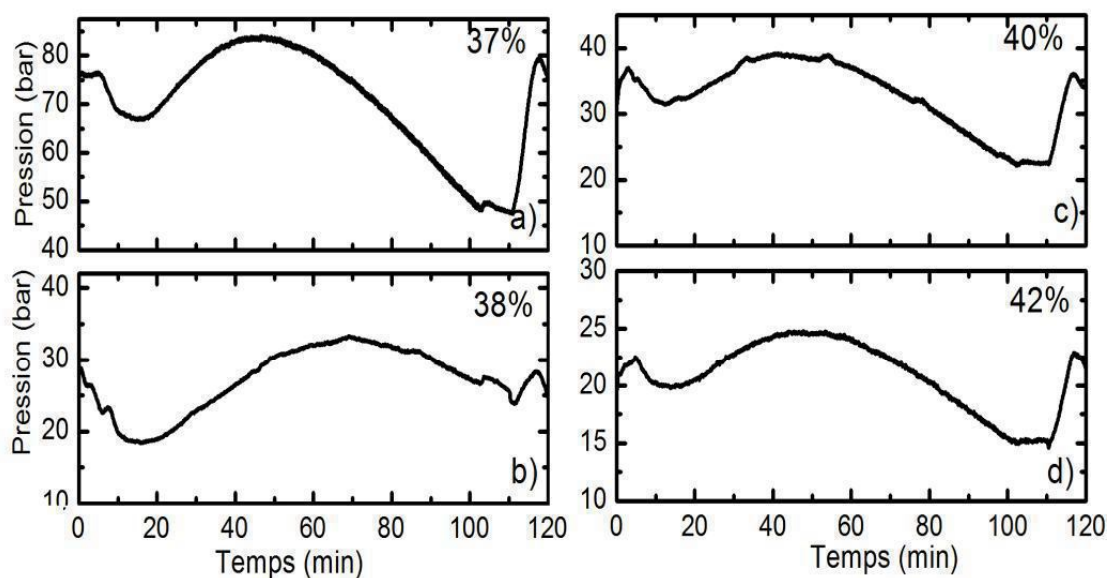


Figure 2. 19 : Evolution de la pression pour quatre colonnes monolithiques de diamètre interne $75 \mu\text{m}$, à base de LMA/EDMA préparées avec différentes concentrations en EDMA en fonction du temps. Le débit était de 100 nL/min.

Nous remarquons que toutes les courbes donnant les variations de la pression en fonction du temps ont la même allure générale et sont également qualitativement comparables à celles de la Figure 2. 17. Il y a toujours une baisse de pression au début (eau pure) et à la fin du gradient (ACN pur) ainsi qu'une augmentation de pression lorsque la teneur en ACN augmente (pour atteindre la composition qui a une viscosité maximale). La pression varie de 15 à un peu plus de 80 bars environ pour les différentes colonnes.

2. 3. 2. Effet de la composition du porogène

2. 3. 2. 1. Identification des colonnes selon la composition du porogène

Le porogène est constitué d'un ou de plusieurs solvants, il constitue un élément essentiel dans la formulation du système initial. Son rôle est de dissoudre tous les monomères et l'initiateur dans la solution à polymériser. Il sert aussi à contrôler la cinétique de séparation de phases et de réaliser la morphologie souhaitée du matériau final et en particulier la bonne taille des pores.

Le comportement de ces solvants vis-à-vis des chaînes de polymère en formation joue sur le processus de polymérisation. La formation de la structure poreuse est conditionnée par la séparation de phase, conduisant à la précipitation des noyaux réticulés.

Dans le cas présent, le porogène utilisé est un mélange de cyclohexanol (CyOH) et d'éthylène glycol (Et(OH)₂). La fraction volumique du porogène dans le mélange réactionnel est maintenue constante et égale à 65%.

Afin d'étudier l'effet de la composition du mélange porogène nous avons considéré trois colonnes caractérisées par des compositions de porogène différentes (voir Tableau 2. 8), et analysé les propriétés microfluidiques, dans les trois éluants (EAU, ACN(1 max) et ACN).

Le même type de capillaire a été utilisé avec un diamètre externe de 360 µm et un diamètre interne de 75 µm. L'amorceur, l'azobisisobutyronitrile (AIBN), est introduit à raison de 1,2% par rapport à la masse totale en monomères.

Tableau 2. 8 : Identification des trois colonnes permettant l'étude de l'effet de la composition du porogène.

Colonne	Col1	Col2	Col3
Longueur (cm)	30	29.5	30
Monomère (V/V) LMA/EDMA	65/35	65/35	65/35
Porogène (V/V) CyOH/Et(OH) ₂	80/20	75/25	60/40

2. 3. 2. 2. Influence du porogène sur les propriétés microfluidiques

La Figure 2. 20 montre les variations de la pression en fonction du débit pour les éluants ACN(η_{\max}), EAU, ACN et pour les trois colonnes monolithiques décrites précédemment.

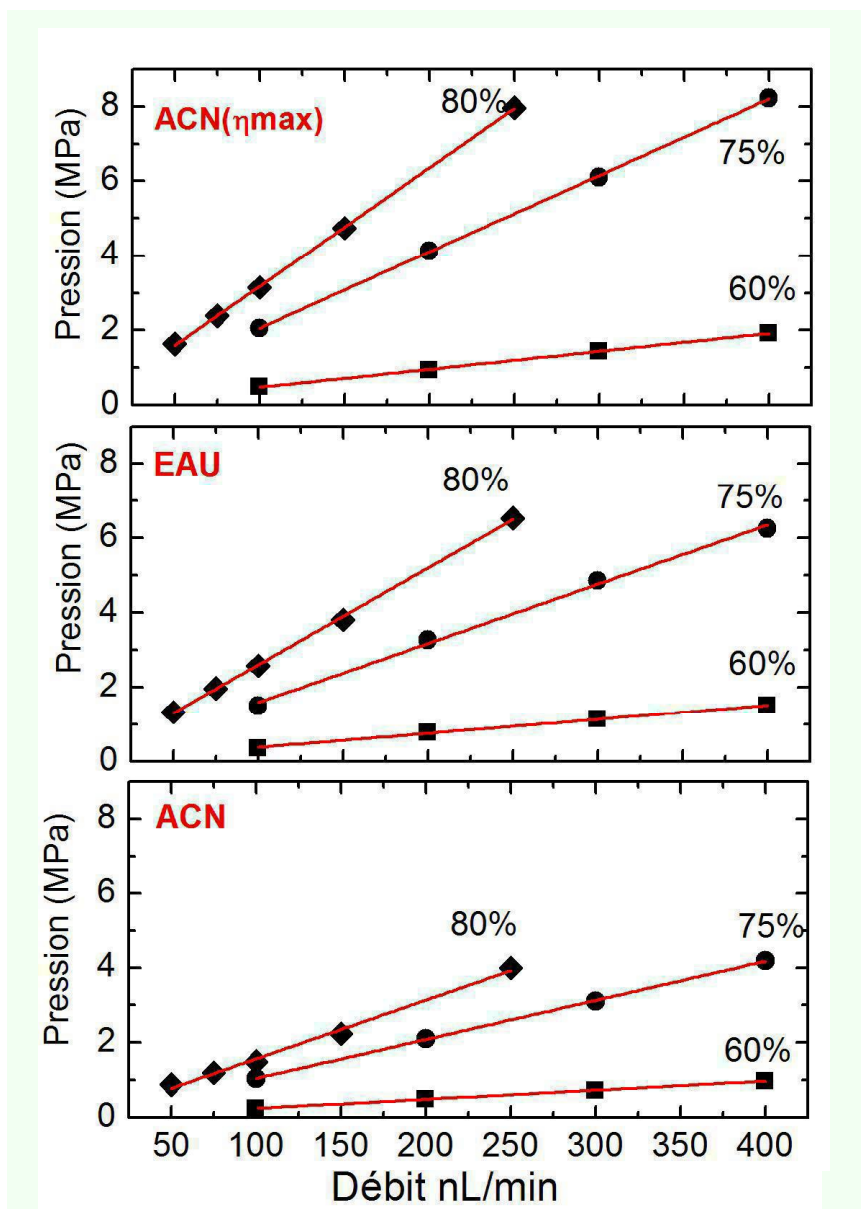


Figure 2. 20 : Perte de charge en fonction du débit pour les trois colonnes 80%, 75% et 60% de cyclohexanol et les trois éluants, a) ACN (η_{\max}). b) EAU, c) ACN.

Cette figure montre que la perte de charge augmente linéairement avec le débit pour les trois colonnes ce qui atteste de la bonne tenue mécanique des colonnes puisqu'elles résistent à des pressions allant jusqu'à environ 8 MPa. La pente augmente systématiquement avec la fraction

volumique du bon solvant dans le porogène parce que la taille des nuclei demeure faible nécessitant des pressions plus élevées. Ces résultats sont attendus et cohérents avec ceux décrits dans la littérature.¹⁵

La Figure 2. 21 représente les mêmes résultats sous une autre forme en comparant pour chaque colonne les effets des éluants déterminés par leur viscosité L'éluant de plus grande viscosité donne systématiquement la pente la plus élevée confirmant la résistance à l'écoulement .

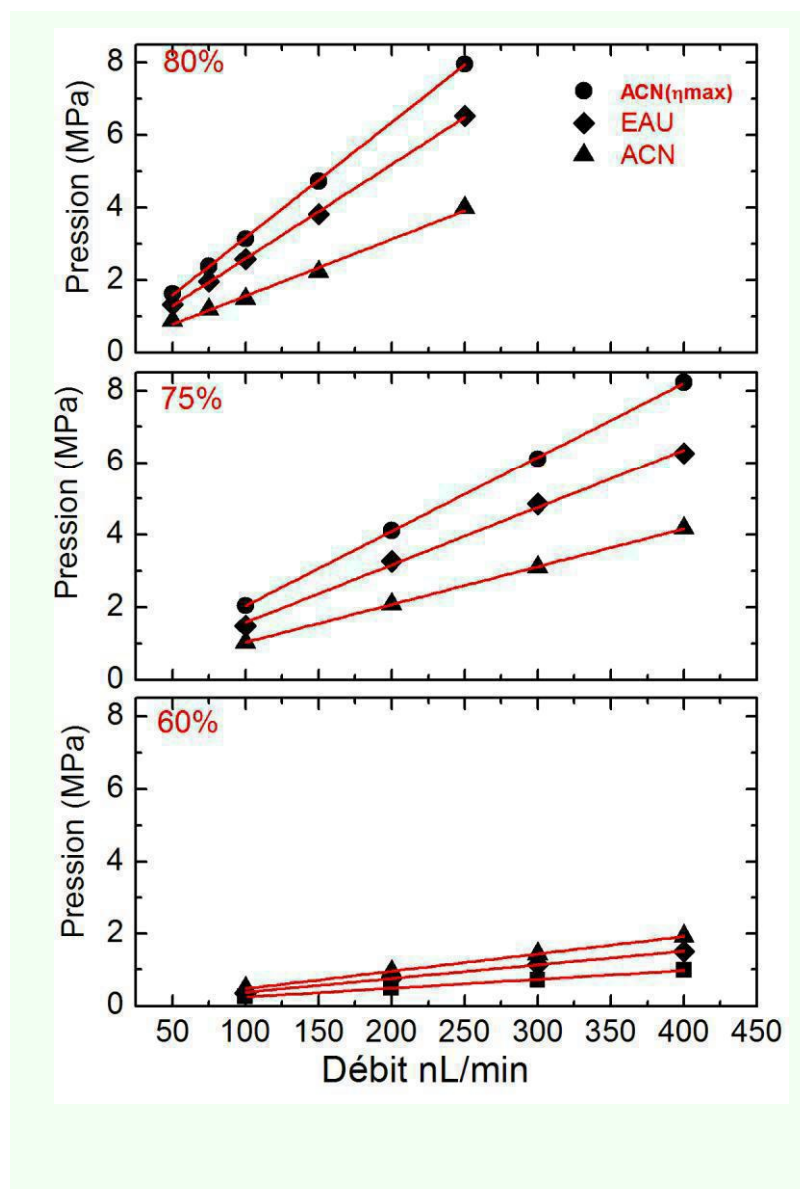


Figure 2. 21 : Perte de charge en fonction du débit pour les éluants ACN(η_{max}), EAU et ACN, a) 80% b) 75% c) 60% de cyclohexanol.

Dans le but de mettre en évidence l'effet de la viscosité de l'éluant sur la courbe de la perte de charge en fonction du débit, nous représentons sur la Figure 2. 22 la variation de $\Delta P/\eta$ en

fonction du débit. Pour chacune des trois colonnes, nous montrons les résultats correspondants aux trois éluants ACN(η max), EAU et ACN.

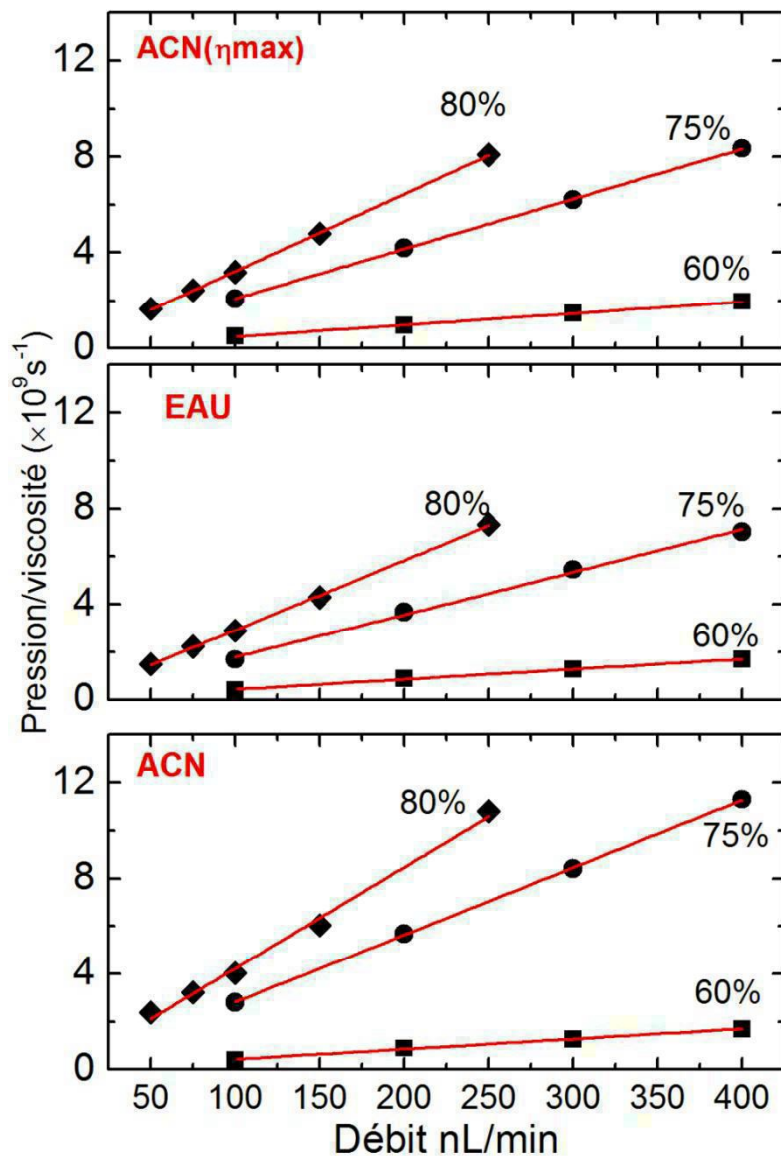


Figure 2. 22 : Pression normalisée à la viscosité de l'éluant. Les droites représentent un ajustement linéaire.

On constate que l'effet de la viscosité est important puisqu'il y a un changement significatif dans les pentes. Les trois droites sont plus rapprochées que dans la représentation précédente, mais si la loi de Darcy s'appliquait à ce système et la perméabilité ne dépendait que de la colonne et pas de l'éluant, alors les trois droites seraient confondues. Le fait que ce

ne soit pas le cas peut être attribué au gonflement du polymère qui doit dépendre de la qualité du solvant. En effet, la pente des droites $\Delta P/\eta$ vs Q suit le même ordre et par conséquent, la perméabilité de la colonne vis-à-vis de l'ACN est la plus faible. On pourrait penser que la qualité de solvation de l'éluant et donc le gonflement du polymère serait à l'origine de cette différence. Cependant, ce n'est pas le cas puisqu'il est clair que la qualité de solvation des trois éluants suit l'ordre $ACN > (ACN \eta_{max}) > EAU$, et la perméabilité B_0 déduite de la pente des droites ΔP vs Q ne suit pas le même ordre. Ces résultats sont attendus et comparables avec ceux reportés dans la littérature.¹⁴

La nature et la proportion de l'agent porogène sont des paramètres essentiels pour la préparation et le design de monolithes possédant des caractéristiques morphologiques (porosité) et hydrodynamiques (perméabilité) adaptées à la chromatographie.

Le choix de l'agent porogène pour la préparation de monolithes polymères reste empirique et dépend largement de la nature des monomères utilisés. L'idéal est donc de trouver un compromis, suivant l'application visée, entre les teneurs respectives en micro- et macropores qui vont respectivement donner soit une grande surface d'échange, soit des propriétés fluidiques intéressantes. Si l'écoulement est privilégié, la formation de macropores sera favorisée, en particulier, si la phase monolithique est destinée à des applications mettant en jeu de grosses molécules comme de longs brins d'oligonucléotides ou des protéines. Si, au contraire, la phase monolithique est dédiée à des applications de type chromatographiques, une forte teneur en micropores sera nécessaire afin de promouvoir les interactions entre les analytes en solution et la phase stationnaire via une surface d'échange étendue. Ce ratio entre micro- et macroporosité du matériau monolithique peut être affiné et ajusté en modulant la composition du mélange réactionnel et en changeant les conditions et les paramètres de polymérisation.

2. 4. TEMPS DE RETENTION

La détermination du comportement et des performances séparatives des colonnes monolithiques à base de monomères hydrophobes, synthétisées auparavant, a été effectuée à l'aide d'un test de séparation comportant deux molécules de structures chimiques très proches. En effet, ces molécules sont des marqueurs chimiques fluorophores, utilisées dans la technique dite 2D Differential Gel Electrophoresis (2D-DIGE) pour la quantification des protéines.

Deux solutions ont été préparées à base de Cye 3 et de Cye 5 (Figure 2. 6) dans le solvant DMF (diméthylformamide) à une concentration de 2 pmol/ μ L. Ces solutions ont été diluées dans l'eau à une concentration de 20 attomol/ μ L. Un mélange de 1 μ L de chaque solution a été mis dans un petit flacon, qui a été ensuite placé dans le passeur d'échantillon pour une injection automatique.

Le gradient d'éluion utilisé est un gradient classique en chromatographie liquide phase inverse. Il commence par l'eau acidifiée et se termine par l'acétonitrile, afin d'éluier les échantillons retenus par des interactions hydrophobes à l'intérieur de la colonne.

La Figure 2. 23 montre les pics détectés à partir de l'injection de 2 attomol du marqueur Cye5 sur deux colonnes monolithiques différentes, comme l'indique la légende. Les temps de rétention sont très distincts puisque pour la première colonne (39 % EDMA) il est de 28 min alors que pour la deuxième colonne (39 % EDMA), il est de 64 min.

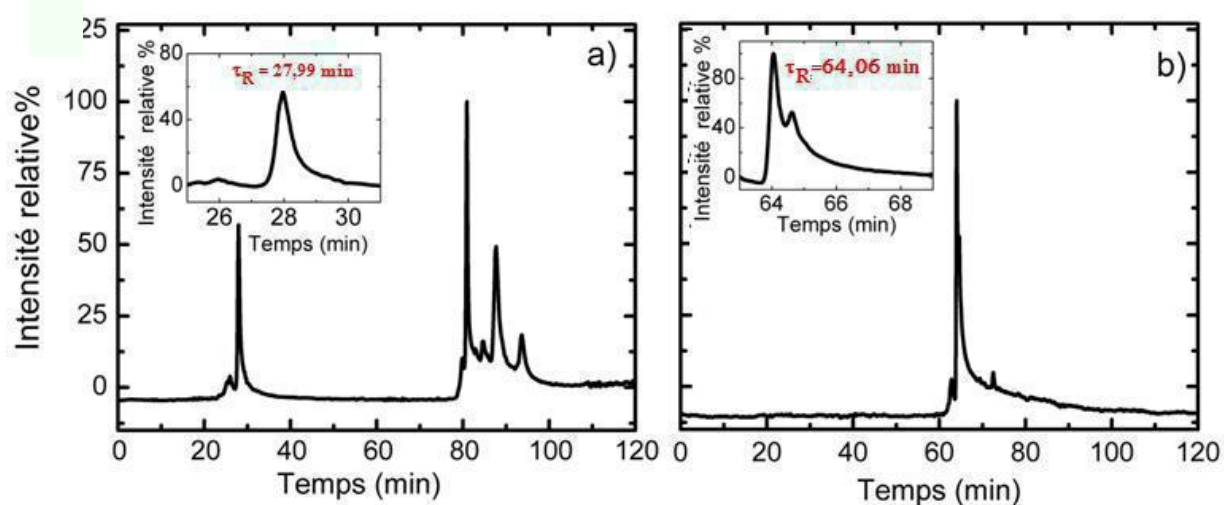


Figure 2. 23 : a) Pic détecté pour une injection de 2 attomol de marqueur Cye5 sur la colonne avec 61% LMA 39 % EDMA, Le porogène est un mélange de cyclohexane/éthylène glycol (80/20), le débit est de $Q = 75$ nL/min. b) Mêmes conditions que pour la figure a) pour une colonne avec 58% LMA et 42% EDMA, $Q = 100$ nL/min. Le temps de rétention τ_R est indiqué dans chaque cas.

Une étude détaillée sur la comparaison du pouvoir séparatif des différentes colonnes préparées et des performances est en cours.

La Figure 2. 24 montre la variation du temps de rétention avec le débit pour les deux marqueurs Cye3 et Cye5 obtenue lors d'un test de séparation sur deux colonnes monolithiques à base de LMA/EDMA préparées avec deux compositions en EDMA différentes. Rappelons que le temps de rétention est par définition le temps écoulé entre l'injection du fluide éluant et l'apparition du premier pic dans le spectre de détection. On voit bien que débits élevés conduisent à des temps de rétention plus courts.

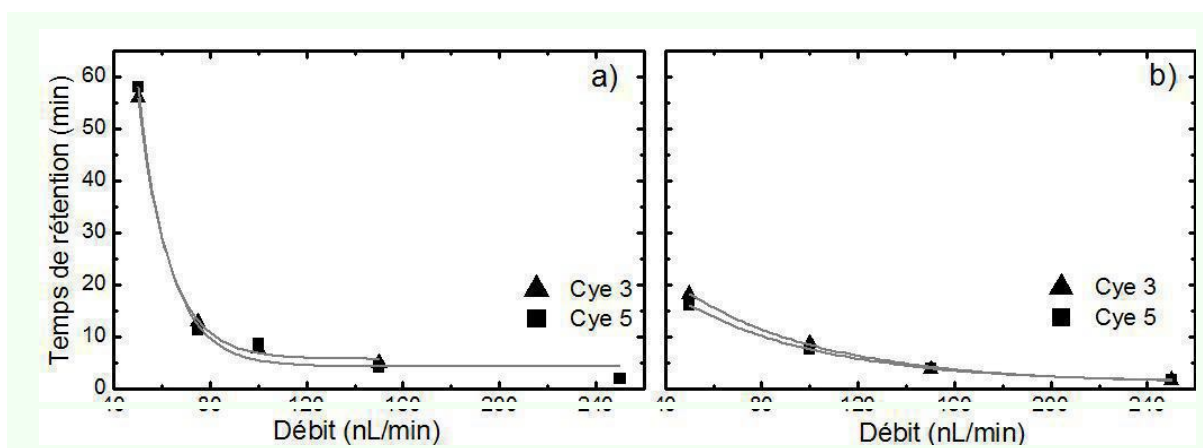


Figure 2. 24 : a) Temps de rétention en fonction du débit pour les deux marqueurs Cye 3 et Cye 5 mesuré lors d'un test de séparation sur une colonne monolithique LMA/EDMA avec 35 % EDMA. b) Mêmes conditions sur une colonne à 40 % EDMA. Les lignes continues sont un guide pour les yeux.

Nous avons analysé la relation entre le débit et le temps de rétention pour quatre colonnes différentes par leur composition en réticulant EDMA, selon une relation exponentielle du type

$$\frac{Q - Q_{\infty}}{Q_0 - Q_{\infty}} = \exp(-t/\tau_s) \quad (2. 5)$$

Dans cette méthode d'analyse, qui, notons le, n'a pas été utilisée epar d'autres chercheurs, Q , Q_0 et Q_{∞} sont respectivement les débits au temps t à l'origine $t = 0$ et à la fin de l'expérience

pour un temps infiniment long; t est le temps de rétention alors que τ_s représente un temps caractéristique du processus de rétention (ou de résidence) du marqueur dans la colonne. Les résultats obtenus sont rassemblés sur la Figure 2. 25a pour les quatre colonnes en question.

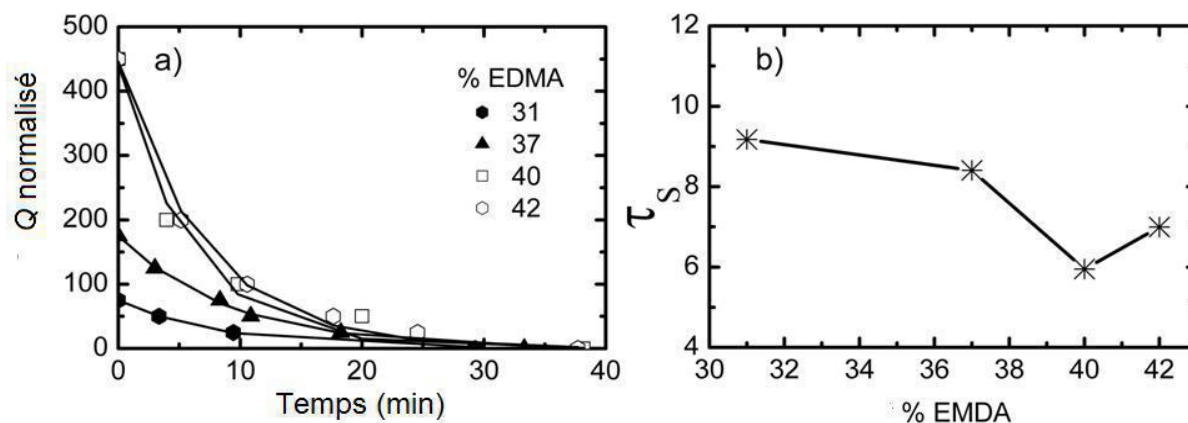


Figure 2. 25 : a) Variation du débit normalisé en fonction du temps de rétention mesuré lors d'un test de séparation sur quatre colonnes monolithiques à base de LMA/EDMA différentes par leurs pourcentages en réticulant. Les lignes continues sont un ajustement selon l'Equation 2. 5. b) Temps de rétention caractéristiques τ_s en fonction du pourcentage en agent réticulant.

Les symboles représentent les données expérimentales alors que les courbes désignent l'équation selon une exponentielle décroissante. La Figure 2. 25b. représente la variation du temps caractéristique de cette décroissance noté τ_s en fonction de la concentration de réticulant. Cette variation suit une tendance comparable aux résultats obtenus au paragraphe précédent. Le temps de rétention caractéristique τ_s montre une chute significative pour la colonne monolithique à 39% EDMA conformément aux observations faites précédemment. Ce phénomène a été observé dans notre étude de façon systématique corroborant l'existence d'une transition de phase à une concentration en EDMA proche de 39%.

Il serait très utile de poursuivre cette étude et compléter ces données par d'autres observations indépendantes permettant d'une part de valider cette transition, et de trouver le mécanisme physique qui est à son origine. Une telle étude est en cours avec l'analyse de résultats complémentaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-
- [1] Le Gac, S.; Carlier, J.; Camart, J.-C.; Cren-Olivé, C.; Rolando, C. *J. of Chromatog. B*, **2004**, 808, 3.
- [2] Ngola, S.M.; Fintschenko, Y.; Choi, W.Y.; Shepodd, T.J. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 849.
- [3] Rohr, T. Yu, C.; Davey, M.H.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J., *Electrophoresis*, **2001**, 22, 3959.
- [4] M. Lämmerhofer, E.C. Peters, C. Yu, F. Svec, J.M.J. Fréchet, W. Lindner, *Anal.Chem.*, **2000**, 72, 4614.
- [5] Yu, C.; Davey, M.H.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5088.
- [6] Viklund, C.; Pontén, E.; Glad, B.; Irgum, K.; Hörstedt, P.; Svec, F. *Chem. Mat.*, **1997**, 9, 463.
- [7]. Bertoncini, N.D.; Demesmay, C.; Rocca, J.L. *Electrophoresis* **2004**, 25, 3204.
- [8] Buszewski, B.; Szumski, M.; Sus, S. *LC-GC Europ*, December, **2002**, 2.
- [9] Grande, M.C.; Juliá, J.A.; Fresco, J.; Barrero, C.R.; Marschoff, C.M.; Bianchi, H.L. *J. Chem. Thermodynamics* **2006**, 38, 760.
- [10] Trojer, L.; Lubbad, S.H; Bisjak, C.P.; Bonn, G.K. *J. Chromatog. A* **2006** 1117, 56.
- [11] Carman, P.C. *Trans. Inst. Chem. Engrs., Lond.* **1937**, 15, 150.
- [12] Gusev, I.; Huang, X.; Horvath, C. *J. Chromatogr. A* **1999**, 855, 273.
- [13] Jiang, Z.; Smith, N.W.; Ferguson, P.D.; Taylor, M.R. *J. Biochem. Bioph. Methods*, **2007**, 70, 39.
- [14] Levkin, P.A.; Eeltink, S.; Stratton, T.R.; Brennen, R.; Robotti, K.; Yin H., Killeen, K.; Svec F.; Fréchet, J.M.J. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1200, 55.
- [15] Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1168, 101.

CHAPITRE 3

GELS DE POLYACRYLAMIDE RENFORCES AU DEXTRAN

3. 1. INTRODUCTION

Les gels sont formés d'une matrice polymère gonflée par un solvant organique ou une solution aqueuse. Leurs applications dépendent de leur qualité optique, de leur élasticité et leur résistance lors d'utilisations répétées ainsi que de leur comportement viscoélastique. En présence de protéines, il apparaît un phénomène de partage entre le gel et la solution résultant d'effets majeurs comme l'exclusion de taille et l'attraction / répulsion moléculaire.

La température du milieu, la nature du monomère et du réticulant, la concentration et la fonctionnalité de chaque constituant définissent la structure du gel et sa porosité. La mise au point d'un gel possédant des caractéristiques précises nécessite de pouvoir corréler entre d'une part la composition initiale, la méthode et les conditions de préparation et d'autre part, la structure du gel comme le nombre moyen de monomères entre points de réticulation et les caractéristiques physiques tels que le gonflement et les propriétés mécaniques. Des méthodes complémentaires permettent d'établir la corrélation entre la formation du gel et ses propriétés.

Ce chapitre est consacré à l'étude de gels de PAAm modifiés en présence d'un polysaccharide, le dextran. Nous nous intéressons à la cinétique de polymérisation, au gonflement des gels synthétisés et à leurs applications de séparation de protéines en mode électrophorèse de type SDS-PAGE.

La synthèse des gels de PAAm et leurs modifications sont relativement faciles. Le couple rédox standard Peroxydisulfate (PDS) et Tétraméthylènediamine (TEMED) est généralement utilisé pour initier la polymérisation du mélange (AAm / Bis). Les polysaccharides comme le dextran sont des polymères naturels utiles dans la fabrication des produits pharmaceutiques (vecteurs de médicaments, pansements) et dans le développement des produits biodégradables. Ils trouvent des applications en médecine surtout pour leur

biocompatibilité et biodégradabilité. Ils comportent des groupements hydroxyles qui leur permettent d'être transformés en hydrogels.

En particulier, le dextran est un polysaccharide amorphe soluble dans l'eau qui peut être utilisé comme agent de réticulation de gélatines biocompatibles et biodégradables aux propriétés rhéologiques favorables à la libération contrôlée dans le temps.^{1,2,3}

Le DuracrylTM est une matrice d'acrylamide forte et élastique, utile pour des applications en électrophorèse. En présence d'un catalyseur approprié, le DuracrylTM forme un gel renforcé supérieur aux gels de PAAm en termes de résistance mécanique et de coloration des protéines. Jusqu'à présent, le DuracrylTM (Genomic Solutions) reste l'unique polymère renforcé de matrice à base de PAAm commercialisé et disponible pour les applications en électrophorèse. Il montre cependant des inconvénients majeurs : il peut devenir trouble et contribuer au bruit de fond en fluorescence par suite de dispersion de la lumière. En électrophorèse, une distorsion des bandes de haut poids moléculaire et un dédoublement des spots protéiques peuvent apparaître. Cette tendance à fausser les bandes protéiques est devenue un sujet de préoccupation ces dernières années.

De nombreuses tentatives d'amélioration de la qualité des gels basées sur le choix d'un bon réticulant ont été proposées. Notons qu'un gel de PAAm peut avoir un caractère polyélectrolyte dans certaines conditions de préparation en présence d'ions. La distribution de taille des pores est fonction de la charge. L'influence du sel sur le gonflement des gels chargés dépend de l'écrantage des interactions électrostatiques et de l'effet Donnan dû aux petits ions.^{4,5,6}

3. 2. PARTIE EXPERIMENTALE

3. 2. 1. Produits utilisés

Le monomère acrylamide (AAm) et le réticulant (Bis) N,N'-méthylènebisacrylamide ont été achetés chez Polyscience (France), le dextran et les autres réactifs chez Aldrich, Fluka (Allemagne). Les marqueurs de protéines (HMW et LMW) ont été achetés chez Amersham Biosciences (Uppsala, Suède), le DuracrylTM chez Genomic Solutions (Steinheim, Allemagne). Tous ces produits ont été utilisés sans modification ou purification préalable. La Figure 3. 1 donne les formules chimiques des monomères (AAm, N,N'-méthylène bis-acrylamide (Bis)) et du polysaccharide dextran

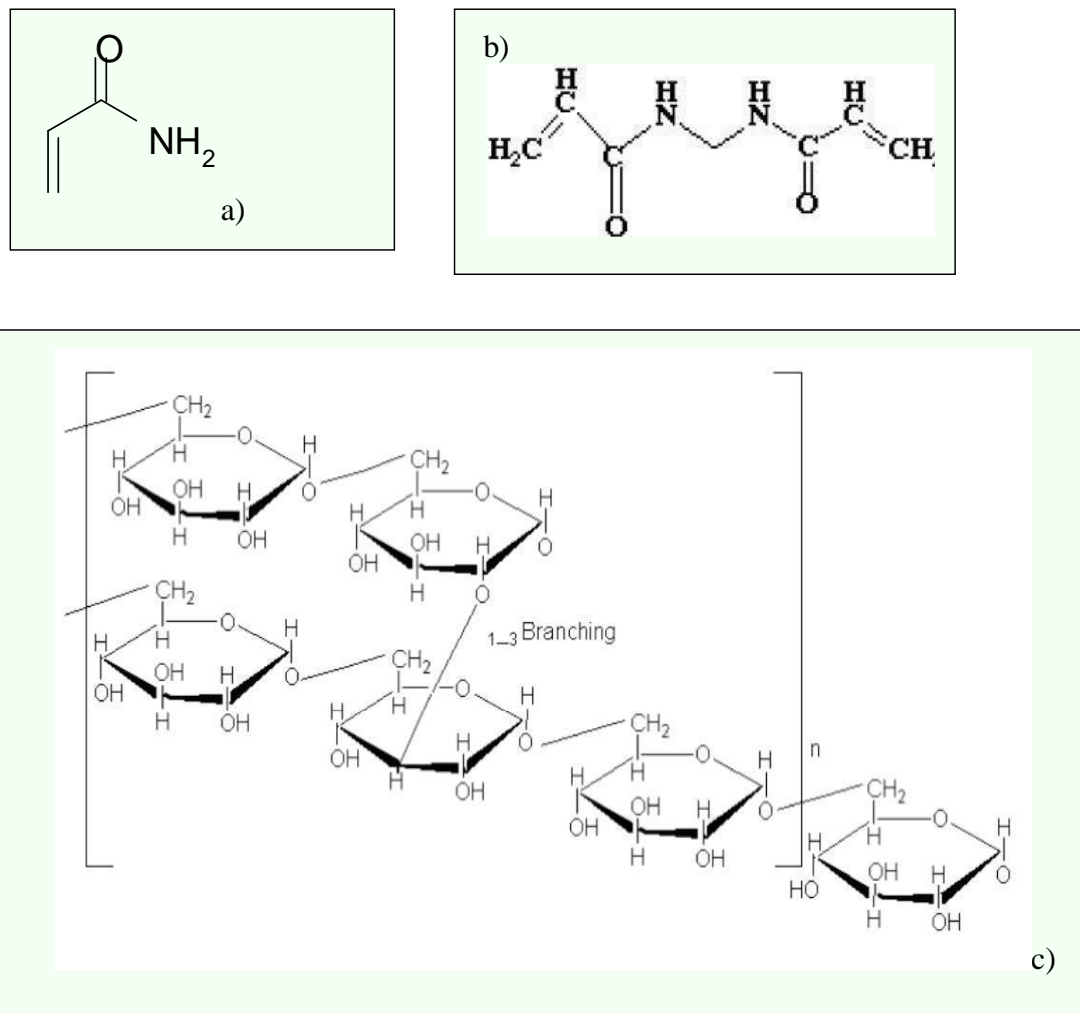


Figure 3. 1 : Monomères utilisés :a) Acrylamide AAm, b) N,N'-méthylène bis-acrylamide(Bis), c) Dextran.

Le dextran a une masse comprise entre 6×10^3 et 2×10^6 Da (g mol^{-1}). Les protéines (marqueurs) utilisées sont caractérisées sur le Tableau 3. 1.

Tableau 3. 1 : Caractéristiques des protéines utilisées. LMW = Low Molecular Weight pour bas poids moléculaire. HMW = High Molecular Weight pour haut poids moléculaire.

	Protéine	Masse Molaire (gmol ⁻¹)	Source	Quantité (µg)
LMW	Phosphorylase β	97 000	Muscle de lapin	67
	Albumine	66 000	Sérum de bovin	83
	Ovalbumine	45 000	Blanc d'œuf de poulet	147
	Anhydrase carbonique	30 000	Erythrocyte bovin	83
	Trypsine inhibiteur	20 100	Grain de soja	40
	α -Lactalbumine	14 400	Lait de bovin	116
HMW	Myosine α -2-	220 000	Muscle de lapin	25
	Macroglobuline β -	170 000	Plasma de bovin	100
	Galactosidase	116 000	Escherichia coli	16
	Transferrine	76 000	Humain	17
	Glutamate déshydrogénase	53 000	Foie de bovin	18

3. 2. 2. Préparation des échantillons

Le processus de formation du gel est initié par la formation d'un radical libre du N,N,N',N''-tétraméthyléthylène diamine (TEMED) par réaction avec le persulfate d'ammonium (APS). Ensuite la réaction entre le radical libre et le monomère d'AAM produit un monomère AAM activé qui réagit avec un autre monomère AAM. Cette séquence continue jusqu'à épuisement total du monomère et obtention du PAAm. Le réticulant Bis renforce le gel proportionnellement à sa concentration.

D'une manière générale, la préparation d'un gel se fait à partir d'une solution d'AAM, Bis, tris base (pH 8,8), dodécyl sulfate de sodium (SDS) et eau dé-ionisée. Cette solution est

conservée à 4°C pendant 12h (la nuit), dégazée sous pression réduite pendant 40 mn et mise sous atmosphère inerte avant chaque utilisation.

La polymérisation est initiée par le couple redox APS/TEMED. Le TEMED est une amine tertiaire qui fournit les électrons nécessaires à partir de son atome d'azote pour la décomposition de l'APS en radicaux sous forme d'ions sulfates. En même temps, les radicaux de TEMED sont formés et peuvent initier une nouvelle chaîne de polymérisation en s'attachant entre eux comme groupes de terminaison. Le TEMED peut également réagir comme agent de transfert par donation d'hydrogène au polymère radicalaire en stoppant la croissance de la chaîne et commençant une nouvelle chaîne (Figure 3. 3.).

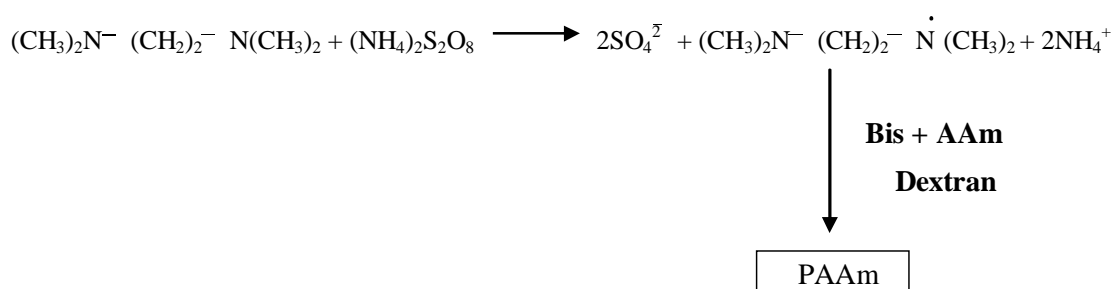


Figure 3. 2 : Processus de polymérisation du gel de polyacrylamide.

3. 3. 1. Techniques expérimentales

3. 3. 1. 1. Spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie UV-Visible peut être utilisée pour étudier la cinétique de polymérisation à travers la variation d'absorbance en fonction du temps. La spectrométrie d'absorption moléculaire dans le domaine ultra-violet (UV, de 185 à 380 nm) et dans le visible (VIS, de 380 à 800 nm) est une technique courante de contrôle et d'analyse de composés chimiques^{7,8}. Ainsi nous avons obtenu les spectres de nos échantillons (i.e., Abs = f(t)) à 300 nm pendant 900 secondes. Pour les molécules comme pour les atomes l'absorption est due aux transitions électroniques entre différents niveaux d'énergie. Un électron à l'état fondamental absorbe des radiations d'une énergie suffisante pour l'élever à un niveau d'énergie supérieur d'un état excité, ce qui détermine la longueur d'onde λ . Le retour à l'état fondamental se produit par perte d'énergie (chaleur) ou par émission de radiation (fluorescence ou phosphorescence). Dans l'UV-VIS, les transitions électroniques sont accompagnées par des transitions de vibration entre les niveaux électroniques donnant la

structure fine vibrationnelle. L'environnement chimique de l'échantillon comme la nature du solvant affecte la position et la forme de la bande d'absorption. L'analyse quantitative est réalisée sur la base des lois de Beer - Lambert⁹.

Les éléments de base des spectromètres sont: une source, un porte-échantillon, un monochromateur, un détecteur et un appareil de lecture. En « UV-VIS », le porte échantillon est placé à la sortie du monochromateur et les sources employées sont soit au deutérium qui émettent surtout dans l'UV soit les lampes au tungstène qui émettent surtout dans le VIS.

Elles émettent un spectre continu et des raies atomiques permettant de faire un calibrage de longueur d'onde. Le monochromateur est composé d'une fente de sortie. Une lumière polychromatique est focalisée sur la fente d'entrée du monochromateur qui transmet sélectivement une bande étroite. Ce faisceau traverse l'échantillon avant d'atteindre le détecteur, photomultiplicateur ou photodiode. La mesure d'absorbance est faite à blanc (sans échantillon) et après avoir traversé l'échantillon. La première étape de notre étude a permis d'optimiser la composition du gel en essayant plusieurs concentrations (0,5 -1-1,5-2-5)% de dextran. L'addition d'un dextran de masse moléculaire donnée (6, 40, 100, 500, 2000 kDa) à une concentration de 2% (g cm⁻³) dans le gel n'affecte ni son homogénéité, ni la migration des protéines. La variation de la densité optique en fonction du temps est étudiée à l'aide de la technique de spectroscopie UV-Visible.

3. 3. 1. 3. Cinétique de polymérisation: variation de la température

La formation d'un réseau de polymérisation radicalaire libre est un processus exothermique cinétiquement contrôlé, la mesure de température permet de suivre cette cinétique. Pour cela, les gels préparés ont été introduits dans de petites cuves ayant été soumises auparavant à un courant d'azote. Une sonde fine de température de type ORGANO SCIENTIFIC, Model SA880SSX a été placée dans ces cuves pour le suivi de la variation de température durant la polymérisation. La lecture de température est faite chaque minute pendant 2 heures. Les profils de température pour les gels de PAAm et dextran (500 et 2000 kDa) jugés bons selon les analyses UV- Visible ont été pris ainsi que pour les gels de PAAm et Duracryl pris comme références. Le taux de conversion était toujours supérieur à 90%.

3. 3. 1. 1. Cinétique de gonflement

Les gels de séparation caractérisés par les concentrations (%T = 10, %C = 2,6) ont été découpés sous forme de carrés de 5 cm de côté et 1mm d'épaisseur en vue des mesures de gonflement. Dès que l'initiateur est introduit dans la solution, la gélification a lieu en moins d'une minute alors que pour d'autres systèmes, on a généralement des temps de gélification de l'ordre d'une demi-heure^{10,11}. Les gels sont séchés à l'étuve (60°C) pendant 24h après leur préparation et avant d'être mis dans le solvant.

3. 3. 1. 2. Electrophorèse (SDS-PAGE)

Pour les mesures d'électrophorèse, le gel est mis entre deux plaques de verre désinfectées et fixées sur un support. Un peigne est enchâssé entre les deux plaques. Le gel de séparation est posé en premier et sa gélification dure environ une heure, ensuite le gel de concentration est mis sur le premier après avoir placé un peigne désinfecté pour former les puits où les protéines seront déposées. Cette préparation dure environ une demi-heure.

Une concentration de monomère élevée est adaptée aux protéines de bas poids moléculaire alors qu'une faible concentration est plutôt adaptée aux protéines de haut poids moléculaire. Les différentes bandes des protéines sont visibles et la masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs représentés par des protéines standards de masses molaires connues.

3. 3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3. 3. 1. Cinétique de polymérisation

Quoique de nombreux travaux aient été consacrés à l'étude des propriétés physiques des gels de PAAm, leur mécanisme de formation reste encore obscur dans de nombreux cas. La croissance de la masse de polymère conduit à une séparation de phase et la température de polymérisation joue un rôle important sur la réactivité, le taux de dissociation de l'initiateur (APS) en radicaux libres, la propagation et la cinétique de polymérisation. Une diminution d'élasticité est obtenue lorsque la température augmente.

Une élévation brutale de la température a lieu au point de gel et porte le nom d'effet Trommsdorf.¹² En ce point, la mobilité des chaînes est inhibée par la croissance du nombre de points de réticulation et l'incapacité des radicaux à se terminer. La croissance continue

jusqu'à consommation totale des monomères. La hausse de température durant la polymérisation est liée au taux de conversion tandis que l'effet Trommsdorf représente le point où la mobilité chute à un degré avancé du taux de réticulation. La cinétique chimique a pour but d'élucider les chemins et mécanismes réactionnels et de déterminer les taux de réaction. Différentes méthodes peuvent être utilisées à cette fin comme les méthodes spectroscopiques (UV-VIS, IR, RAMAN), la polarimétrie à travers la mesure du pouvoir rotatoire ainsi que les méthodes couplées de chromatographie et de spectrométrie de masse.

L'élévation rapide de la viscosité diminue la constante de réaction et entraîne une augmentation de la concentration en radicaux sans limiter la diffusion de monomères. On a alors une augmentation de la vitesse de polymérisation. A l'approche de la vitrification du réseau, les réactions de propagation sont contrôlées par la diffusion des monomères et la vitesse de polymérisation diminue. Il y a un processus d'auto-décélération.

La gélification est une transition irréversible à un certain taux de conversion décrivant le passage d'un état liquide à un état viscoélastique et la relation entre le temps de gel τ_{gel} et la température est souvent exprimée par une loi de type Arrhenius.

3. 3. 1. 1. Spectroscopie UV-Visible : cinétique de gélification

Les mesures d'absorbance par spectroscopie UV-Vis sont regroupées sur les Figures 3. 3 et 3. 4 pour tous les systèmes considérés. Les effets de la masse moléculaire et de la concentration du dextran sont illustrés sur ces résultats. Les mesures faites sur le PAAm pur et Duracryl™ permettent une comparaison. L'absorbance augmente d'abord lentement puis brusquement pour tous les systèmes. Le gel devient turbide dû à la présence d'agrégats à la transition sol / gel. Le maximum d'absorbance est obtenu pour le PAAm / dextran à la plus grande masse (2×10^6) suivi de 5×10^5 , Duracryl™, et dextran 10^5 . Les résultats obtenus pour les autres masses sont rassemblés en bas la de figure (Fig. 3. 3a). Le PAAm / Dextran (5×10^5) et Duracryl™ ont des comportements proches l'un de l'autre. Les résultats sont aussi donnés en fonction de $M^{1/2}$ pour mettre en évidence la loi d'échelle relative à la masse du dextran. Nous pensons qu'il est nécessaire de conforter ces résultats par des mesures complémentaires.

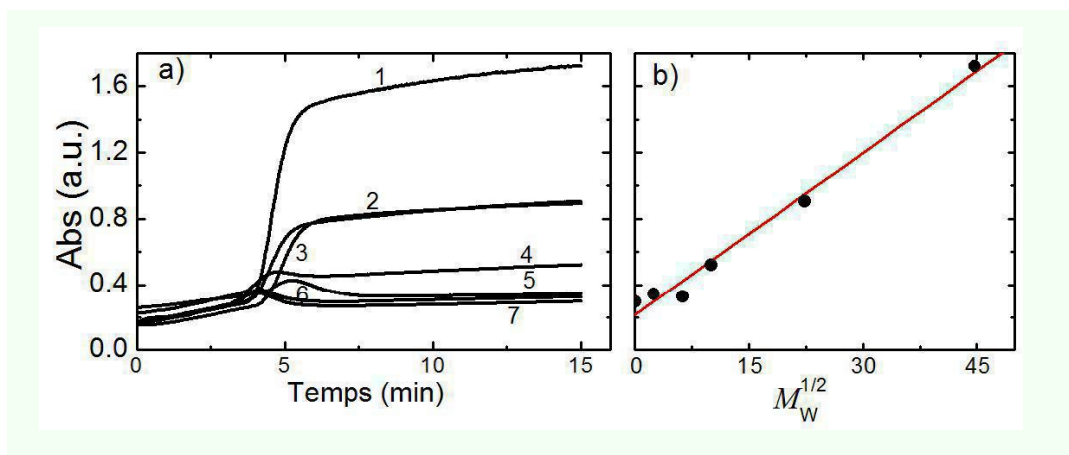


Figure 3.3 : a) Absorbance à 300 nm en fonction du temps. **1.** PAAm/Dextran2000; **3.** PAAm/Dextran500; **3.** Duracryl™; **3.** PAAm/Dextran100; **5.** PAAm/Dextran40; **6.** PAAm/Dextran5; **7.** PAAm pure. b) Variation linéaire de l'absorbance en fonction de $M_w^{1/2}$.

Les mesures montrent que le système le plus concentré en dextran donne le plus haut niveau d'absorbance. Le PAAm pur donne le plus bas niveau d'absorbance à cause de sa clarté optique. On observe une croissance linéaire sachant qu'au premier ordre l'intensité diffusée est proportionnelle à la concentration de polymère en solution diluée et c'est probablement ce phénomène qui donne lieu au comportement décrit ces résultats.

En supposant que le rayon hydrodynamique du dextran (R_H) peut être calculé à l'aide de la loi empirique, $R_H(\text{Å}) = 0.27M_w^{0.47}$, les effets de masse et de concentration du dextran peuvent être combinés selon une forme universelle de c/c^* , c^* étant la concentration de recouvrement selon de Gennes¹³, $c^* = M_w/[4\pi R_g^3/3]$. Les résultats peuvent être représentés à l'aide d'un seul paramètre regroupant les effets de la masse et de la concentration du dextran.

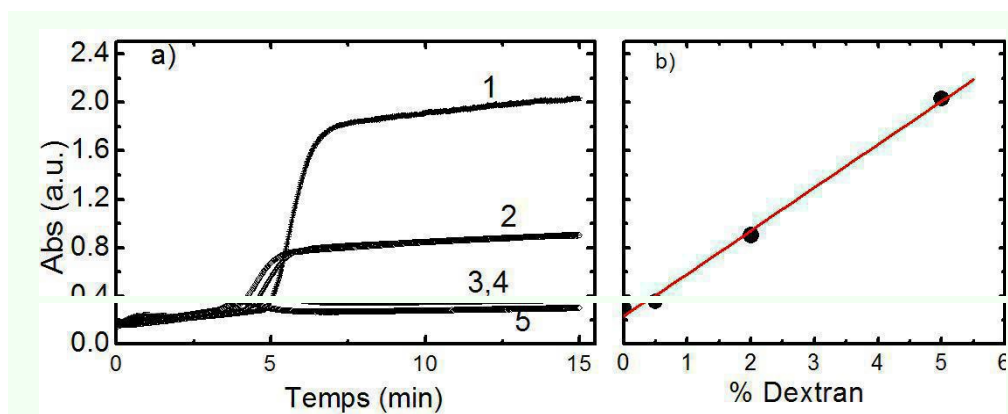


Figure 3.4 : Absorbance à 300 nm en fonction du temps à différentes concentrations de dextran. a) **1.** 5wt%; **3.** 2wt%; **3.** Duracryl™; **3.** 0,5wt%; **5.** PAAm pure. b) Variation linéaire en fonction du pourcentage de dextran.

Une légère déviation par rapport au comportement linéaire est observée probablement à cause de l'exposant critique inférieure à $1/2$ dans la loi d'échelle de (R_g) puisque (c/c^*) devrait être proportionnel à $(cM_w^{1/2})$. Nous avons également supposé que le rayon de giration R_g peut être remplacé par le rayon hydrodynamique en utilisant la loi empirique citée. Une telle loi d'échelle n'a pas encore été mise en évidence dans la littérature et devrait être confirmée par d'autres travaux.

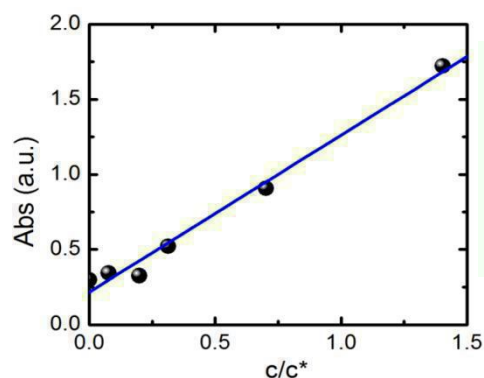


Figure 3. 5 : Variation de l'absorbance en fonction de c/c^* , où c^* est la concentration de recouvrement selon de Gennes. Cette loi d'échelle montre un comportement universel.

3. 3. 1. 2. Cinétique d'une polymérisation exothermique : profils de la température et effet Trommsdorf

La polymérisation radicalaire en question ici est exothermique¹⁴ et la cinétique de polymérisation peut être suivie à l'aide de la variation de la température en fonction du temps.

Les profils de température pour les différents gels sont regroupés dans la **Figure 3. 6.** sur toute la période de polymérisation et leur amplification au début du processus pour déceler les différences lors d'augmentations rapides de la température.

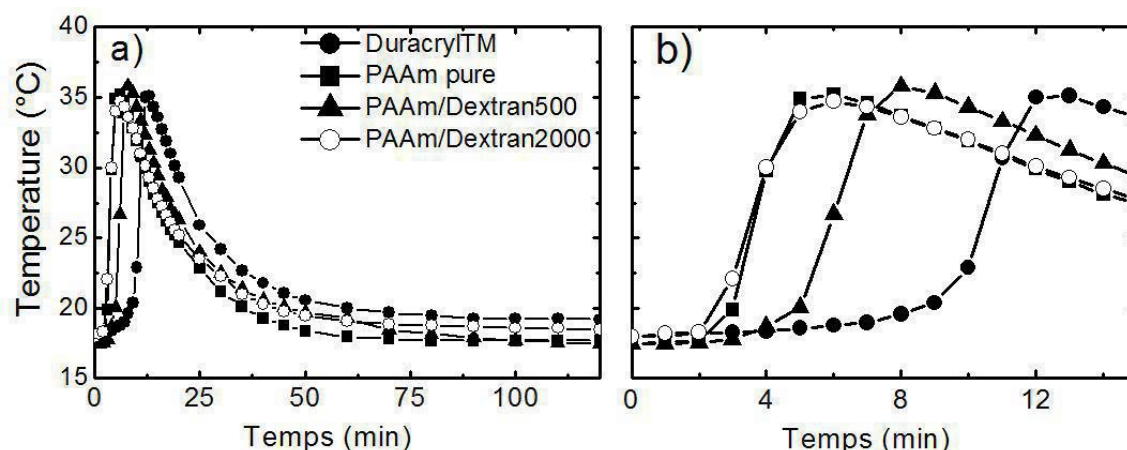


Figure 3. 6: a) Température de polymérisation en fonction du temps. b) Amplification au début des cinétiques.

Le maximum est atteint à des temps distincts et les courbes décroissent. L'effet Trommsdorf a lieu moins de 4mn après le démarrage de la polymérisation pour les gels de PAAm pure et du Dextran2000. Le saut brusque de la température est quelque peu retardé pour DuracrylTM puisqu'il n'a lieu que 10 mn après le lancement du processus. Le mélange PAAm/dextran500 montre la même cinétique que DuracrylTM. La présence du polysaccharide engendre des effets retard à cause de l'écran aux sites réactifs qui provoque l'inhibition partielle de la polymérisation / réticulation. Cet additif peut provoquer une séparation de phase avec le PAAm par l'incompatibilité thermodynamique et le paramètre d'interaction χ de Flory. Ainsi la cinétique de polymérisation est plus rapide dans les gels de PAAm en présence du polysaccharide que dans le cas du DuracrylTM. D'autres efforts sont nécessaires pour valider ces observations et les résultats.

3. 3. 2. Cinétique de gonflement

Les gels hydrophiles sont caractérisés par la présence de groupes fonctionnels hydrophiles tels que les acides carboxyliques, les amines, les amides et les alcools. En faisant varier certains paramètres comme la composition de solvant, la température, les liaisons ioniques, le pH, le volume peut subir un changement discontinu pouvant atteindre plusieurs ordres de grandeur. Ce changement de volume provient en partie d'une transition "pelote – globule" du polymère. Mais la transition "pelote –globule" est continue alors que dans un gel les chaînes sont toutes liées ensemble et le comportement collectif donne un changement de volume discontinu.

La majeure partie d'un gel gonflé est occupée par le solvant et donc ses propriétés sont proches de celles d'une solution de polymère avec la différence majeure qu'un réseau de chaînes chimiquement liées n'est pas complètement soluble dans le solvant. Ceci empêche le gel de couler comme un liquide et fait de lui un matériau utile dans de nombreuses applications. Les propriétés d'élasticité et de gonflement dépendent de la pression osmotique et la force élastique de rappel.

Les hydrogels ont été largement utilisés dans diverses applications pharmaceutiques et médicales. Le largage contrôlé des médicaments utilise le fait que le gonflement soit lent en solution aqueuse ce qui implique la possibilité de contrôler leur libération sur une longue durée.

Dans d'autres conditions, un gonflement rapide est souhaitable pour le développement des dispositifs de rétentions par exemple. Il est donc intéressant de bien comprendre le processus de transport d'eau dans les hydrogels pour améliorer leur performance.

Les gels de PAAm sont plus fragiles que ceux contenant le dextran, ils présentent des mailles (pores) plus grandes, des distributions plus larges et des formes plus irrégulières. Sur une surface hydrophile (où l'angle de contact $\theta < 90^\circ$), l'eau mouille bien la surface et minimise la présence de bulles d'air.

Si la surface est hydrophobe les bulles d'air viennent au contact de la surface et se développent. Le gonflement près du point isoélectrique entraîne une mesure de la pression osmotique due aux contre-ions présents dans la solution pour assurer l'électro-neutralité.

Un changement brusque du gonflement intervient près du point isoélectrique à un pH où la charge nette de la protéine est nulle. Une des raisons justifiant l'étude de la cinétique de gonflement est que lors des expériences d'électrophorèse, les gels peuvent subir un léger gonflement influençant les résultats.

3. 3. 2. 1. Gonflement dans l'eau dé-ionisée

Le taux de gonflement défini comme le rapport de la masse d'eau absorbée à la masse du gel sec a été mesuré dans l'eau dé-ionisée à un pH égal à 5.86.

Les résultats de la Figure 3. 7a montrent que le gel de PAAm pur a le gonflement le plus élevé. Les gels en présence de dextran ont un gonflement dans l'eau dé-ionisée proche de celui du DuracrylTM. Ces gels sont caractérisés par des réponses mécaniques similaires.

Le polysaccharide ne peut que renforcer la résistance du gel et à mesure que sa masse augmente, la résistance et la rigidité augmentent. Ces effets pourraient être mieux quantifiés par la mesure du paramètre d'interaction pour la partie solvatation et le module élastique pour la partie tenue mécanique et rigidité. De telles mesures pourraient faire l'objet d'une étude ultérieure.

Le gel qui contient le dextran2000 gonfle moins que les autres, il est donc plus favorable en électrophorèse et présente une bonne stabilité mécanique. Il permet une bonne migration des protéines en SDS-PAGE. La ligne continue représente un ajustement théorique.

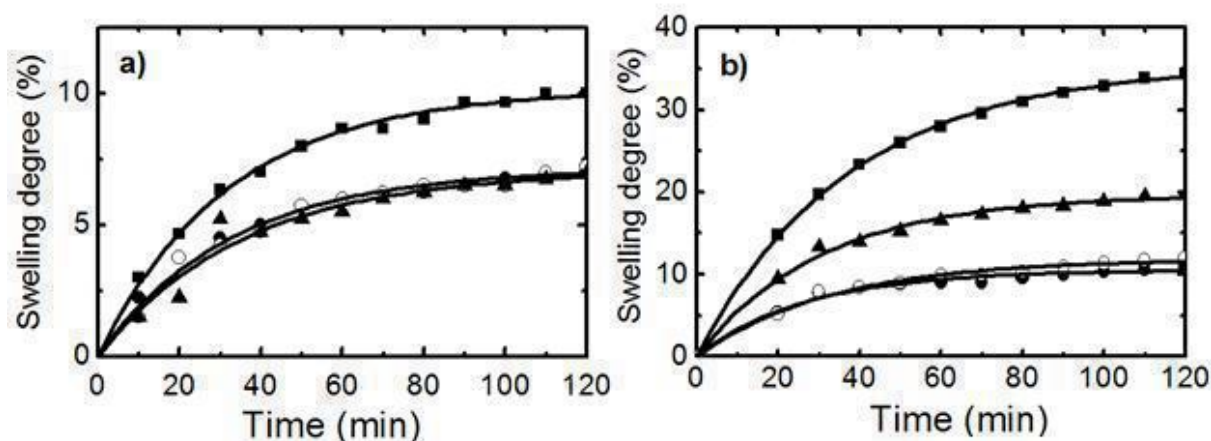


Figure 3. 7 : Degré de gonflement en fonction du temps dans a) l'eau dé-ionisée b) la solution tampon (Tank Buffer) utilisée dans les expériences d'électrophorèse de type SDS -PAGE. ■ : PAAm pure; ▲ : PAAm/Dextran500; ○ : PAAm/Dextran2000; ● : Duracryl™.

3. 3. 2. 2. Gonflement dans la solution tampon

La solution tampon à pH = 8,54 est le milieu d'éluion des protéines en mode SDS -PAGE. Dans ce cas aussi le PAAm / dextran2000 gonfle moins que les autres (Figure 3. 7b). Les gels gonflent plus dans la solution tampon que dans l'eau dé-ionisée. Dans le cas précédent, le gonflement provient de la compétition entre forces élastiques qui s'opposent au gonflement et la pression osmotique des petits ions mobiles. Le gonflement diminue lorsque la masse du dextran augmente et dans tous les cas, comme on l'a déjà signalé ci-dessus, le gonflement dans la solution tampon est nettement supérieur à celui observé dans l'eau dé-ionisée.

D'autres paramètres comme le pH, le degré d'ionisation et la force ionique influencent le gonflement. Ces effets interviennent dans la solution tampon. L'ajustement est réalisé selon l'expression $\gamma = \alpha [1 - \exp(-t/\tau)]$ où γ (%) représente le taux de gonflement au temps t et α la limite de saturation à un temps long par rapport à τ . Les valeurs de α et de la vitesse initiale de gonflement α/τ sont données pour les deux solvants sur la Figure 3. 8. Le gel de PAAm possède la plus grande capacité suivi par le PAAm/Dextran500 alors que Duracryl™ montre une plus faible capacité de gonflement.

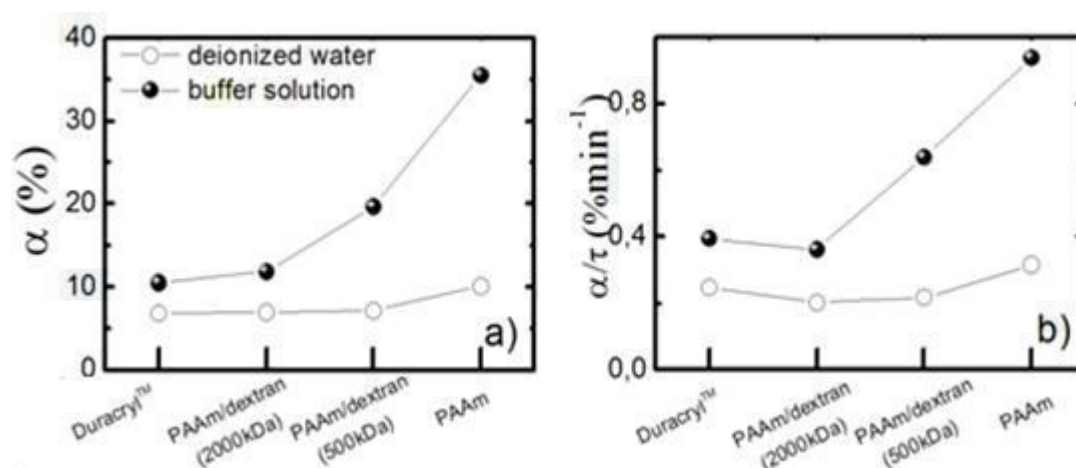


Figure 3. 8 : a) Valeurs du taux de gonflement α (%) utilisées dans l’ajustement des courbes théoriques des différents gels étudiés, b) Valeurs correspondantes du rapport α/τ (% mn⁻¹).

3. 3. 3. Séparation des protéines en mode SDS-PAGE

Le “ SDS-PAGE ” pour “ Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis ”, est une technique qui permet de séparer des protéines selon leur masse molaire. Les protéines migrent à travers les pores interconnectés sous l’effet d’un champ électrique. Les gels de PAAm sont largement utilisés comme milieu de migration et la résolution actuelles des gels 2D est insuffisante pour séparer toutes les protéines cellulaires à cause de leur grande diversité surtout pour les protéines à point isoélectrique (pI) élevé et grande masse moléculaire.

D’autres techniques sont nécessaires pour séparer des protéines à haut poids moléculaires (HMW) comme la myosine (200 kDa), la dystrophine (400 kDa) et la thyroglobuline (330 kDa) responsables de maladies et constituant donc de bonnes cibles thérapeutiques.

La taille des pores diminue avec la concentration d’AAm et les molécules de petites masses sont mieux séparées. La migration des protéines à travers le gel de PAAm est le prélude à une analyse protéomique détaillée permettant de déterminer la composition exacte d’une protéine. Il s’agit là d’une méthode dénaturante en raison de la présence du sulfate de sodium. Le SDS est un détergent fort qui possède une queue hydrophobe et une tête chargée négativement. Il interagit avec les protéines par sa partie hydrocarbonée en liant les régions

hydrophobes selon un rapport constant (1 molécule de SDS pour deux acides aminés). Le SDS empêche ainsi le repliement de la protéine et lui confère une charge négative. Ceci permet sa migration dans le gel à l'aide d'un courant électrique et la séparation des protéines en fonction du poids moléculaire. Cette migration est fonction de modifications post-traductionnelles des protéines comme la glycosylation ou la phosphorylation par exemple. Les protéines sont d'abord condensées dans un gel de concentration ensuite séparées dans le gel de séparation.

La visualisation des protéines séparées est effectuée à l'aide de colorants (Bleu de Coomassie, Rouge Ponceau ou nitrate d'argent) pour les protéines dont la concentration dépasse la limite de détection. Le gel coloré au bleu de Coomassie par exemple peut être décoloré par le mélange de solvants méthanol / acide acétique glacial / eau.

Les gels de PAAm ont connu une grande popularité comme tiges supports en électrophorèse due à leur transparence optique dans le visible et l'UV et la possibilité de synthèse avec un large intervalle de porosité. Cependant, plusieurs défauts ont été observés comme leur instabilité à pH alcalin sachant que la majorité des séparations de protéines et d'acides nucléiques ont lieu à ce type de pH.

Les gels à faible pourcentage d'AAM sont typiquement utilisés pour séparer les grandes protéines mais si cette concentration est inférieure à 5% les gels deviennent trop fragiles et très difficiles à manipuler, surtout dans les phases de coloration et de lavage.

Le SDS⁻ PAGE repose sur deux hypothèses. La première considère que toutes les protéines ont le même rapport charge sur masse, la deuxième suppose que le complexe SDS / protéine a la même conformation alors que la taille varie linéairement avec la masse. En utilisant la méthode dite de Ferguson,^{15,16} il est possible d'obtenir une bonne estimation de la masse en déterminant la migration relative des protéines en fonction de la concentration du gel de PAAm. Ferguson a observé que le logarithme de la mobilité d'une protéine varie linéairement avec la concentration du gel, la pente de cette variation donne accès au facteur de retardation (R_f) qui est proportionnel à la masse de la protéine.

Une représentation fréquente des courbes de Ferguson montrant le logarithme de la mobilité relative en fonction de la concentration du gel suggère que le coefficient de retardation est proportionnel au carré du rayon des protéines. Ainsi, des courbes standards peuvent être construites en portant le logarithme de la masse de protéines connues en fonction

de la racine carré du coefficient de retardation. Une telle procédure est largement utilisée dans la littérature spécialisée.

L'électrophorèse en gel bidimensionnel (2D-GE) est ainsi devenue le premier outil analytique pour la séparation des mélanges protéiques complexes extraits des systèmes biologiques. Après la visualisation par l'intermédiaire de coloration, les spots de protéines peuvent être excisés, décolorés, faire l'objet d'une digestion protéolytique en gel, et les peptides extraits peuvent être analysés par spectrométrie de masse (SM). L'ionisation électrospray (ESI) et la spectrométrie de masse MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization) sont souvent utilisées toutes les deux pour déterminer les masses des peptides protéolytiques ce qui permet de générer une carte des masses des peptides de la protéine. Les masses des peptides peuvent être utilisées pour compléter la base des données utile à l'identification des protéines.

Les tests présentés ici utilisent des protéines standards de masse définie dans la gamme des petites (LMW) et grandes masses (HMW) en notant que la charge de la protéine dépend du pH. Le tracé de Fergusson permet de mesurer la migration des protéines selon leur mobilité. Il fait intervenir le facteur de retardation R_f défini par le rapport de la distance de migration d'une fraction de protéines et la distance parcourue par l'éluant ou front de migration. L'intensité des bandes protéiques est calculée en fonction des distances parcourues à l'aide d'un logiciel qui donne la densité optique du gel en fonction de la distance de migration de la protéine et permet d'attribuer à chaque protéine une densité optique et un pic caractéristique de la séparation. Cette méthode permet de tracer les courbes de Fergusson sous la forme $\log M_w$ en fonction de R_f . (Figure 3. 9).

La mobilité des protéines est reliée à la structure du réseau polymère et donc de la taille des pores. Les protéines de petites masses (comprises entre 10 et 100 kDa) donnent le meilleur compromis en termes de résolution avec le système PAAm / Dextran500. Pour les protéines de grandes masses (50 à 2000 kDa), ce compromis est obtenu avec le système PAAm / dextran2000. Les courbes de Fergusson correspondant aux systèmes PAAm / dextran500 et PAAm / dextran2000 présentent les meilleures performances.

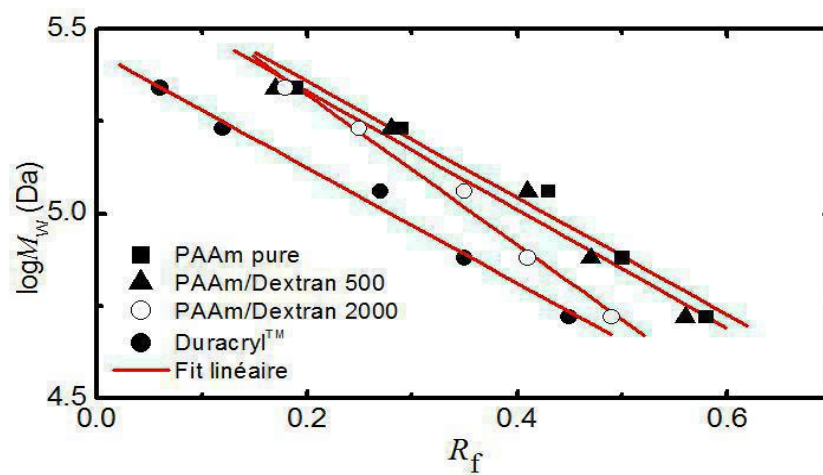


Figure 3. 9 : Courbes de Fergusson donnant $\log M_w$ en fonction du facteur de retardation R_f pour les différents systèmes analysés en SDS-PAGE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-
- [1] Arranz, K.; Sanchez-Chaves M., Ramirez., J.C.; *Polymer* **1993**, *34*, 1908.
- [2] Cadee, J.A.; De Kerf, M.; De Groot, C.J.; Den Otter, W.; Hennick, W.E. *Polym. Commun* **1999**, *40*, 6877.
- [3] Ramirez, J.C.; Sanchez-Chaves M.; Arranz F. *Polymer* **1994**, *35*, 2651.
- [4] Katchalsky, A.; Michaeli I.; *J. Polym. Sci.* **1955**, *15*, 69.
- [5] Ogawa, I., Yamano, H.; Miyagawa, K. *J. Appl. Polym.Sci.* **1993**, *50*, 35-40.
- [6] Funke, W.; Okay O.; Joos-Muller, B. *Adv. Polym. Sci.*, **1998**, *136*, 139.
- [7] Tokita, M., Tanaka, T. *Science*, **1991**, *253*, 1121.
- [8] Richards, E.G.; Temple, C.J. *Nature (Phys.Sci)* **1971**, *230*, 92.
- [9] Skoog, D.A.; West D.M.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 8th Edition, Thomson Brooks/Cole, Belmont, 710, **2004**.
- [10] Chiarelli, P.; De Rossi; D. *Prog. Colloid. Polym. Sci.* **1988**, *78*, 4.
- [11] Dusek, K.; Prins W.; *Adv. Polym. Sci.* **1969**, *6*, 1.
- [12] Fawcett, J.S; Morris, CJ; *Sep. Sci.* **1996** *1*, 9.
- [13] de Gennes, P G. *Scaling Concepts in Polymer Physics*; Ithaca University. Press Ithaca, NY, **1979**.
- [14] Moad, G.; Solomon, D.H. *The Chemistry of Free Radical Polymerization*, Elsevier Science Ltd., Oxford, 257, **1995**.
- [15] Hamauzu, Z.; Mabuchi, Y.; Matsutka, K. *Agric. Biol. Chem.* **1982**, *46* (11), 2841.
- [16] Ferguson, K.A. *Metabolism* **1964**, *13*, 21.

CHAPITRE 4

SYNTHESE DES GELS PAR LA METHODE DE SEPARATION DE PHASE INDUITE PAR LA POLYMERISATION: COMPORTEMENT THERMODYNAMIQUE ET EFFETS DES INTERACTIONS HYDRODYNAMIQUES

4. 1. INTRODUCTION

Le processus de séparation de phase induite par la polymérisation (PIPS) des gels est revisité dans ce chapitre du point de vue théorique. Les théories de Cahn-Hilliard Cook décrivant la décomposition spinodale sont adaptées à la cinétique de séparation de phase pendant la polymérisation des gels en examinant la dépendance en fonction du temps du facteur de structure (time resolved scattering function).

La cinétique de polymérisation est décrite selon le modèle dit de réaction double. Le couplage des deux processus cinétiques est fourni par la relation de Corother qui relie le taux de conversion de monomères $\alpha(t)$ à la masse moléculaire du polymère en croissance $M(t)$. Le comportement critique d'un système est décrit par le paramètre critique χ_c qui est différent du paramètre critique de décomposition spinodale χ_s déduit de la dérivée seconde de l'énergie libre. Alors que χ_s dépend de l'inverse $N^{-1}(t)$ du degré de polymérisation, χ_c dépend de son intégrale temporelle notée $\beta(t)$. Cette différence entraîne des conséquences significatives sur le comportement en phase durant la polymérisation par le procédé dit PIPS (pour Polymerization Induced Phase Separation). Les interactions hydrodynamiques ont un effet déterminant puisqu'elles permettent d'accélérer l'émergence de modes d'instabilité. Bien que les tendances qualitatives soient similaires au modèle de Rouse, les différences qualitatives sont mises en évidence par la présence des effets visqueux de longue portée.

4. 2. PROCESSUS DE SEPARATION DE PHASE INDUITE PAR POLYMERISATION OU PIPS

Le processus de séparation de phase induite par polymérisation ou PIPS est l'une des voies de synthèse des polymères les plus souvent utilisées. Elles sont en général adoptées dans la préparation des matériaux composites pour de nombreuses applications.^{1,2,3,4} A titre d'exemple, on peut citer le cas des matériaux composites polymères et cristaux liquides appelés PDLC (pour Polymer Dispersed Liquid Crystals) qui présentent une morphologie de type fromage suisse dans laquelle les pores sont remplis d'un cristal liquide comme E7, 5CB ou autre. De tels systèmes offrent une large gamme d'applications dans les domaines de technologie de pointes comme l'affichage numérique, les dispositifs de télécommunication ou les fenêtres commutables^{5,6,7,8} D'un autre côté, les gels utilisés en chromatographie (GPC pour Gel Permeation Chromatography) ou HPLC pour (High Performance Liquid Chromatography) et en électrophorèse (SDS-PAGE pour Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) peuvent être synthétisés selon des procédures similaires au PIPS.^{9,10,11} La technologie de micro chromatographie liquide (μ -LC pour micro Liquid Chromatography) utilisée dans la séparation de petits échantillons formés de bio macromolécules et de protéines rares^{12,13,14} se développe aussi selon les mêmes concepts de synthèse in-situ utilisant le processus PIPS. La réaction de polymérisation est enclenchée soit thermiquement, soit après une irradiation par l'intermédiaire d'un faisceau laser, UV, visible ou encore par rayonnement γ ou bombardement électronique EB (pour Electron Beam). Le choix est dicté par la nature du monomère, la présence d'un initiateur catalyseur de la réaction et aussi par le type d'application ciblée. Il est clair que tout le processus PIPS est compliqué et sa description minutieuse à travers des étapes de la polymérisation est assez élaborée. Par conséquent, des simplifications sont nécessaires pour ne retenir que les aspects essentiels qui caractérisent la conversion de monomères et le contrôle de la morphologie pour obtenir de bonnes propriétés selon l'application envisagée. La cinétique de polymérisation est elle-même compliquée puisqu'elle comporte plusieurs phases caractérisées par des paramètres cinétiques différents. Des difficultés supplémentaires sont introduites par le couplage fort et la compétition entre les cinétiques de polymérisation et de séparation de phase. A mesure que la polymérisation évolue, les chaînes de tailles croissantes sont formées donnant lieu à des tendances renforcées de séparation de phase par effets de manque de miscibilité et de démixtion. Pour faire face à la complexité de ce problème, une méthode simple est adoptée en faisant appel à un seul paramètre de polymérisation en même temps que le mécanisme classique de diffusion pour décrire le processus de séparation de phase.

4. 3. PROCESSUS DE DIFFUSION PAR LA METHODE DE L' EQUATION DE LANGEVIN

Un formalisme général de diffusion basé sur l'équation de Langevin pour les fluctuations de la concentration de monomères est décrit dans ce paragraphe. Ce formalisme sera complété par un modèle de cinétique de polymérisation et par la présence des effets hydrodynamiques de longues portées. Une formulation générale de la mobilité hydrodynamique sera proposée et des exemples d'application seront examinés pour l'étude du développement de la séparation de phase en fonction du temps. Les phénomènes de relaxation et de ralentissement critiques des fluctuations à travers les modes de croissance et d'instabilité seront élucidés.

Revenons maintenant à l'équation de Langevin qui exprime la loi de conservation de masse en ajoutant une fonction aléatoire dite de Langevin. Si $\phi(r,t)$ représente la fraction volumique de monomères au point repéré par le vecteur r au temps t , alors la loi de conservation de type Langevin s'écrit ^{15,16}

$$\frac{\partial \phi(r,t)}{\partial t} + \nabla \cdot J(r,t) = C \quad (4.1)$$

Le symbole ∇ représente le vecteur divergence ou dérivée vectorielle sur la variable d'espace r . La quantité $J(r,t)$ est le courant ou flux de monomères (nombre par unité de surface) résultant du gradient de potentiel chimique au point r au temps t . Pour un milieu isotrope, une fonction réponse notée $m(r-r')$ est introduite pour décrire la réponse du point r à une excitation qui se produit au point r' . C'est une suite de coefficient d'Onsager définissant la mobilité généralisée qui caractérise les effets d'écoulement visqueux à travers les interactions hydrodynamiques de longues portées et du phénomène de couplage des modes hydrodynamiques. ^{17,18,19,20} La relation entre $J(r,t)$ et $\nabla \mu(r',t)$ peut être écrite sous la forme

$$J(r,t) = - \int \frac{m(r-r')}{k_B T} \nabla \mu(r',t) d^3 r' \quad (4.2)$$

k_B représente la constante de Boltzmann et T la température absolue. Le potentiel chimique peut être déduit de la dérivée fonctionnelle de l'énergie libre selon une méthode proposée par les théories de Cahn-Hilliard-Cook pour décrire la thermodynamique des

alliages métalliques. L'énergie libre est formée essentiellement de deux contributions comme le montre l'équation suivante

$$\frac{F}{k_B T} = \int d^3 r \left\{ f[\phi(r,t)] + \frac{l^2}{3\phi(r,t)[1-\phi(r,t)]} |\nabla\phi(r,t)|^2 \right\} \quad (4.3)$$

Dans le cas des polymères, la première contribution venant de $f[\phi(r,t)]$ est obtenue dans le cadre de la théorie du réseau de Flory-Huggins.

$$f[\phi(r,t)] = \frac{\phi(r,t) \ln\phi(r,t)}{N(t)} + \frac{[1-\phi(r,t)] \ln[1-\phi(r,t)]}{N_0} + \chi\phi(r,t)[1-\phi(r,t)] \quad (4.4)$$

N et N_0 désignent respectivement les degrés de polymérisation du polymère et du solvant, respectivement. Après des manipulations mathématiques simples, le potentiel chimique est obtenu comme suit^{21,22}

$$\mu(r,t) = k_B T \left\{ \frac{\ln\phi(r,t) + 1}{N} - \frac{\ln[1-\phi(r,t)] + 1}{N_0} + \chi[1-\phi(r,t)] - \frac{l^2}{3\phi(r,t)[1-\phi(r,t)]} \nabla^2 \phi(r,t) \right\} \quad (4.5)$$

Dans la suite de ce chapitre, nous allons supposer que le nombre d'unités répétitives du solvant N_0 est égale à un et nous allons focaliser notre attention sur les fluctuations par rapport à la fraction volumique moyenne de monomères ϕ_0 définie de la façon suivante : $\delta\phi(r,t) = \phi(r,t) - \phi_0$. En nous limitant à l'ordre linéaire, les fluctuations $\delta\phi(r,t)$ satisfont à l'équation de Langevin dont la résolution est simplifiée en prenant les transformées de Fourier comme suit

$$\frac{\partial}{\partial t} \delta\phi(q,t) = -\gamma(q,t) \delta\phi(q,t) + \eta(q,t) \quad (4.6)$$

La variable d'espace q est la conjuguée de r dans la transformée de Fourier. La fonction dite de bruit qui apparaît au second membre de l'Eq. 4.6 est décrite par les trois propriétés statistiques.^{23,24} La première dit que la moyenne des fluctuations est nulle, la seconde utilise le

théorème dit de dissipation et de fluctuation alors que le troisième exprime la condition de causalité selon laquelle la cause doit précéder l'effet. La fréquence caractéristique $\gamma(q,t)$ dans l'Eq. 4. 6 peut être décrite comme suit

$$\gamma(q,t) = 2q^2 k_B T M(q) [\chi_s(t) - \chi] [1 + q^2 \xi_s^2(t)] \quad (4. 7)$$

où le paramètre d'interaction critique pour la décomposition spinodale $\chi_s(t)$ est obtenu à partir de la dérivée seconde de l'énergie libre de Flory -Huggins. Nous pouvons facilement vérifier que $\chi_s(t)$ est donnée par

$$\chi_s(t) = \frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{\phi_0 N(t)} + \frac{1}{1 - \phi_0} \right\} \quad (4. 8)$$

La longueur de corrélation correspondant aux fluctuations de composition $\xi_s(t)$ est donnée par

$$\xi_s^2(t) = \frac{l^2}{3\phi_0(1-\phi_0)\chi_s(t) - \chi} \quad (4. 9)$$

Dans l'équation 4. 7, la mobilité $M(q)$ représente la transformée de Fourier de $m(r)$ introduite dans l'Equation 4. 4. Aussi longtemps que $\gamma(q,t)$ reste positif, les fluctuations de la concentration des monomères relaxent dans le temps mais si $\gamma(q,t)$ s'annule puis devient négatif, alors les fluctuations montrent un ralentissement critique avant d'augmenter exponentiellement et entraîne le système vers des états instables, et de séparation de phase.

4. 4. EVOLUTION TEMPORELLE DE LA FONCTION DE DIFFUSION $S(q,t)$

On doit bien retenir que les fluctuations de concentration $\delta\phi(q,t)$ ne sont pas directement accessibles à la mesure expérimentale. Nous devons donc faire appel à une quantité représentative des fluctuations mais qui soit directement mesurable comme la fonction de diffusion $S(q,t)$. Cette fonction permet de suivre la cinétique de séparation de phase pendant le processus de polymérisation. Des manipulations mathématiques simples développées dans le

cadre des théories de Cahn-Hilliard-Cook pour la décomposition spinodale^{25,26,27,28} des alliages métalliques peuvent être appliquées aux mélanges de polymères. Le résultat final a une forme similaire qui peut être écrite comme suit

$$S(q, t) = \left\langle \left| \delta\phi(q, t) \right|^2 \right\rangle = S_0(q) e^{-2t\gamma(q, t)} \quad (4. 10)$$

Le temps caractéristique $\tau(q, t)$ a été obtenu comme suit

$$\tau^{-1}(q, t) = 2q^2 k_B T M(q) [\chi_c(t) - \chi] [1 + q \xi_c^2(t)] \quad (4. 11)$$

Alors que le paramètre critique pour la séparation de phase $\chi_c(t)$ a la forme

$$\chi_c(t) = \frac{1}{\phi_0} \int_0^t \frac{dt'}{N(t')} + \frac{1}{1 - \phi_c} \quad (4. 12)$$

La longueur de corrélation critique correspondante $\xi_c(t)$ est reliée à $\chi_c(t)$ selon l'équation

$$\xi_c^2 = \frac{l^2}{3\phi_0(1 - \phi_0)} \frac{1}{\chi_c(t) - \chi} \quad (4. 13)$$

Le premier facteur dans l'Eq. 4. 10 noté $S_0(q)$ représente le facteur de structure initial i.e., $S_0(q) = S(q, t = 0)$. Les deux fréquences caractéristiques $\gamma(q, t)$ et $\tau^{-1}(q, t)$ ont des formes similaires. Mais, alors que $\gamma(q, t)$ dépend de $\chi_s(t)$ et $\xi_s(t)$, la deuxième fréquence $\tau^{-1}(q, t)$ dépend plutôt de $\chi_c(t)$ et $\xi_c(t)$. Ces dernières quantités dépendent de la fonction $\beta(t)$

$$\beta(t) = \frac{1}{t} \int_0^t \frac{dt'}{N(t')} \quad (4. 14)$$

qui montre l'intégrale de $\bar{N}^{-1}(t)$. Notons que la différence majeure entre les propriétés avec

l'indice c différent de celles de forme similaire mais avec l'indice s par le seul fait que les paramètres dépendent de $\beta(t)$ alors que les secondes dépendent de $\bar{N}^{-1}(t)$ seulement.

L'impact de cette seule différence sur l'évolution temporelle de la cinétique de séparation est significatif. Ceci est démontré à travers l'examen de la variation de la fonction de diffusion $S(q,t)$ en fonction de q et de t . Cet aspect est mis en évidence dans ce chapitre en introduisant les effets d'interaction hydrodynamiques à travers les modèles de mobilité généralisés et de cinétique de polymérisation.

4. 5. EFFETS DES INTERACTIONS HYDRODYNAMIQUES

Le modèle de Rouse est l'un des modèles les plus utilisés dans la littérature pour décrire la dynamique des polymères en solution ou en masse. Ses fondements reposent sur une définition appropriée du coefficient de frottement (ou de friction) ζ qui décrit le phénomène d'interaction hydrodynamique à courte portée entre le monomère et le milieu environnant (ou solvant). Dans le modèle de Rouse, la mobilité généralisée $M(q)$ se réduit à la quantité $\phi \zeta^{-1}$ indépendantes des variables d'espace et de temps. Ainsi, l'équation (4. 15) devient

$$\tau_R^{-1}(q,t) = q^2 \phi_0 D_0 [\chi_c(t) - \chi] [1 + q^2 \xi_c^2] \quad (4. 15)$$

Le coefficient de diffusion du monomère est notée $D_0 = k_B T \zeta^{-1}$. Il est évident que le modèle ne prend pas en compte les effets d'interaction hydrodynamiques de longue portée et du couplage des modes visqueux. Lorsque ces effets sont introduits dans le modèle dynamique et la mobilité généralisée définie de manière appropriée¹⁶ alors la fréquence caractéristique de l'Eq. 4. 11 devient

$$\tau_H^{-1}(q,t) = \tau_H^{-1}(q=0,t) G[\zeta_c^{-1}(t)] \quad (4. 16)$$

où la quantité $\tau_H^{-1}(q=0,t)$ est définie par

$$\tau_H^{-1}(q=0,t) = q^2 \frac{k_B T}{6\pi\eta \xi_c(t)} \quad (4. 17)$$

alors que la fonction $G(x)$ est

$$G(x) = \frac{3}{4} \frac{1+x^2}{x^3} \{ x + (x-1) \arctan x \} \quad (4.18)$$

Les indices R et H dans ces équations renvoient respectivement aux modèles de Rouse et hydrodynamiques de longue portée.

4. 6. CINÉTIQUE DE POLYMERISATION

Il apparaît clairement à partir des considérations précédentes que deux phénomènes cinétiques sont en concurrence dans le processus PIPS. La première cinétique caractérise la separation de phase des systèmes binaires polymère/solvant qui est gouverné par un mécanisme de diffusion sur une échelle de temps définie par la quantité $\tau = l^2 / D_0$ tandis que la deuxième cinétique est issue d'un processus chimique dans lequel la fraction de monomères ayant réagi notée $\alpha(t)$ et par conséquent le degré de polymérisation au temps t noté $N(t)$ augmentent avec le temps. Une description rigoureuse de ces processus dynamiques est plutôt compliquée et des modèles à des degrés de difficultés variés ont été proposés dans la littérature. Dans ce chapitre, une version simple de ces modèles est présentée en supposant que $\alpha(t)$ satisfait l'équation cinétique suivante

$$\frac{d\alpha(t)}{dt} = \kappa \alpha^n(t) [1 - \alpha(t)]^m \quad (4.19)$$

Dans laquelle κ représente le taux de réaction et les exposants n et m sont égaux à 1 dans le cas du modèle dit de double réaction, i.e. $n = m = 4$. Ce cas présente l'avantage de donner une solution analytique pour un problème cinétique décrit par une équation non linéaire. La solution est

$$\alpha(t) = \frac{\alpha_0 e^{\kappa t}}{1 + \alpha_0 (e^{\kappa t} - 1)} \quad (4.20)$$

α_0 étant le taux de conversion initial. Le tracé de $\alpha(t)$ est donné par la Figure 4. 1 montrant une forme sigmoïdale et indiquant que le processus de polymérisation débute lentement mais qu'à un certain moment, $\alpha(t)$ augmente brusquement avant d'atteindre un niveau de saturation autour de $\kappa t = 10$. La liaison entre la cinétique de polymérisation et de séparation de phase est donnée par la relation de Corother reliant $\alpha(t)$ à $N(t)$ de la façon suivante:

$$\alpha(t) = 1 - N^{-1}(t) \quad (4. 21)$$

Les conséquences de ce modèle simple seront illustrées au paragraphe suivant en mettant l'accent sur les effets hydrodynamiques.

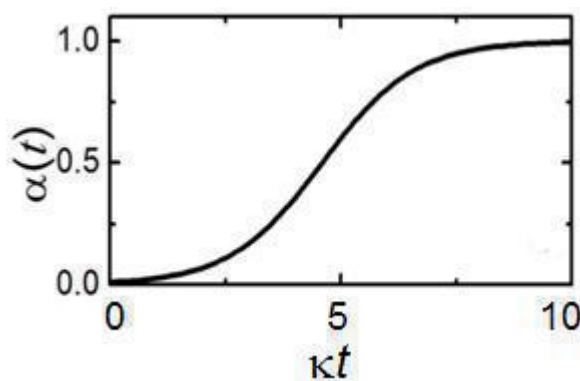


Figure 4. 1 : Fraction de monomères ayant réagi $\alpha(t)$ en fonction de κt selon le modèle de double réaction, κ est la vitesse de réaction (Voir Eq. 4. 20)

4. 7. APPLICATIONS

4. 7. 1. Evolution du comportement en phase: $\chi_s(t)$ vs $\chi_c(t)$

Les résultats précédents montrent que le paramètre critique est $\chi_c(t)$ et non pas $\chi_s(t)$ déduit à partir de la dérivée seconde de l'énergie libre comme d'habitude. $\chi_c(t)$ dépend de $\beta(t)$ l'intégrale de $N^{-1}(t)$. Ces différences sont illustrées sur les Figures 4. 2a et 4. 2b où l'on voit que $N^{-1}(t)$ décroît plus rapidement que $\beta(t)$.

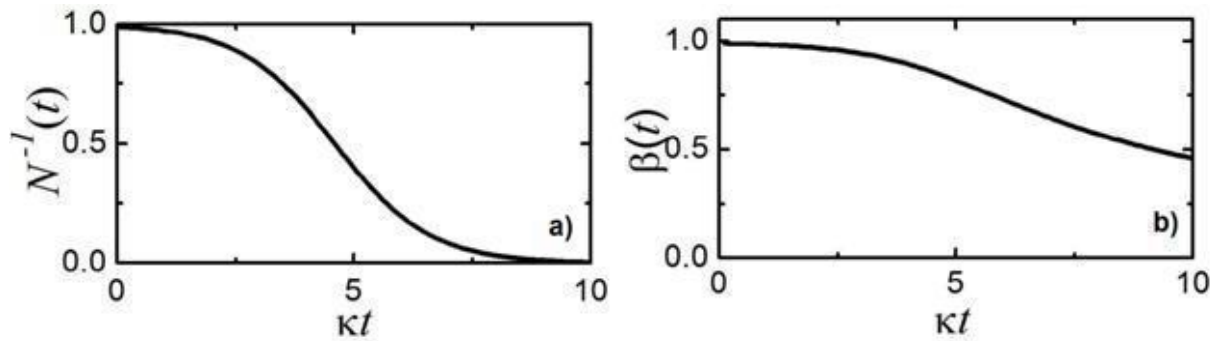


Figure 4. 2 :a) Variations de l'inverse du degré de polymérisation $N^{-1}(t)$ en fonction de κt (Voir Eq. 4. 21). b) Variation de $\beta(t)$ en fonction de κt (Voir Eq. 4. 14).

Une telle accumulation des effets entropiques du début de la polymérisation au temps t se révèle déterminante pour la stabilité du système qui dure plus longtemps sachant que le comportement en phase est régi selon $\chi_c(t)$ comme on l'a dit précédemment. Ces aspects sont illustrés sur les diagrammes de $\chi_s(t)$ et $\chi_c(t)$ en fonction de ϕ_0 à mesure que le temps de polymérisation t augmente. Ces diagrammes sont représentés sur les Figs. 4. 3a et 4. 3b.

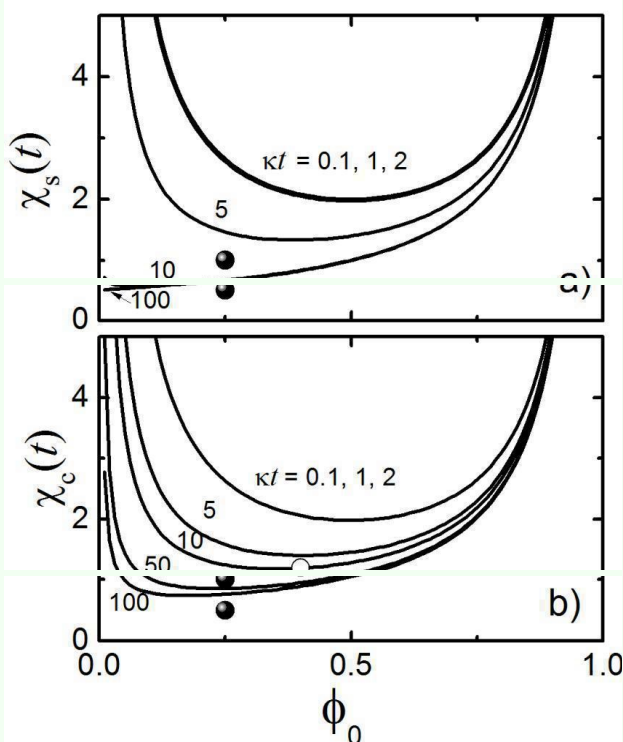


Figure 4. 3 : a) Evolution du diagramme de phase selon $\chi_s(t)$, le paramètre critique obtenu à partir de la dérivée seconde de l'énergie libre (Voir Eq. 4. 8). Dans la partie supérieure, les courbes tracées pour $\kappa t = 0.1, 1$ et 2 sont presque confondues. Les courbes intermédiaires correspondent à $\kappa t = 5$. Les courbes inférieures correspondant à $\kappa t = 10$ et 100 sont différentes pour les très petites valeurs de ϕ_0 . b) Mêmes courbes que a) concernant le paramètre critique $\chi_c(t)$ défini par l'Eq. 4. 14. Dans l'ordre décroissant $\kappa t = 0.1, 1, 2$ (3 courbes confondues), $5, 10, 50$ et 100 ϕ_0 est la fraction volumique de monomère. Les cercles pleins correspondent à $\phi_0 = 0.25$ et $\chi = 1/2$ (cercle bas), $\chi = 1$ (cercle haut). Le cercle vide correspond aux conditions des calculs faits dans la Figure 4. 5a, b.

A titre d'exemple, considérons un système caractérisé par une fraction volumique moyenne de monomères $\phi_0 = 0.25$. Nous remarquons qu'aussi longtemps que le système montre des conditions de bon solvant, c'est à dire un paramètre d'interaction χ inférieur à $1/2$, alors il y a stabilité, mais dès que le paramètre d'interaction dépasse la valeur $1/2$, le processus de

séparation de phase se déclenche et s'accélère comme le montre la partie b de cette figure en comparaison avec le comportement classique attendu décrit par la partie a de la même figure. Supposons que les conditions sont telles que $\chi = 1$, le diagramme a montre que le système entre profondément dans la zone d'instabilité déjà au temps $\kappa t = 10$ alors que les prévisions basées sur le paramètre $\chi_c(t)$ nous informent que le système devrait rester stable jusqu'à un temps supérieur à $\kappa t \cong 40$. De telles différences sont exacerbées lorsque χ augmente et la qualité du solvant diminue. Ceci veut dire que bien que $\chi_s(t)$ et $\chi_c(t)$ montrent des tendances qualitatives semblables puisque les deux paramètres critiques diminuent d'une façon significative dans le temps et subissent une asymétrie importante en fonction de ϕ_0 , des différences numériques (donc quantitatives) substantielles subsistent. Ce qui peut générer des conclusions erronées quand à l'analyse de la stabilité thermodynamique du système.

Par conséquent, on peut conclure que l'analyse de la stabilité du système basée sur le paramètre critique $\chi_s(t)$ se limite aux cas particuliers des processus connus sous les noms de TIPS (pour Thermally Induced Phase Separation ou séparation de phase induite thermiquement) et SIPS (pour Solvent Induced Phase Separation ou séparation de phase induite par évaporation de solvant).^{29,30,31}

Notons aussi qu'au temps $\kappa t = 10$ pratiquement tous les sites réactifs ont été consommés et $\alpha(t)$ a atteint sa limite supérieure 4. Alors que $\chi_s(t)$ dans la Fig. 4. 3a a pratiquement atteint sa limite de saturation, $\chi_c(t)$ dans la partie 4. 3b continue à décroître jusqu'à plusieurs ordre de grandeurs supérieurs surtout pour ϕ_0 inférieure à 4.

4. 7. 2. Relaxations des fluctuations et effets hydrodynamiques

La fonction de diffusion $S(q,t)$ définie par l'Eq. 4. 11 peut être écrite en fonction du coefficient de diffusion généralisé $D(q,t)$ sous la forme suivante

$$\frac{S(q,t)}{S_0(q)} = \exp[-2q^2 D(q,t) t] \quad (4. 22)$$

Dans la dynamique de Rouse, $D(q,t)$ prend la forme simple en fonction de $\chi_c(t)$ et $\xi_c(t)$

$$D(q,t) = D_R(q,t) = D_0 \phi_0 [\chi_c(t) - \chi] [1 + q^2 \xi_c^2(t)] \quad (4. 23)$$

Le système reste stable aussi longtemps que $D(q,t)$ est positif et les fluctuations relaxent dans le temps. Cependant, des modes de fluctuation avec $D(q,t) < 0$ peuvent surgir dans les conditions où $\chi_c(t) < \chi$ donnant lieu à une croissance des fluctuations dans le temps. Le système subit les effets d'une compétition entre les modes qui relaxent et ceux qui croissent avec une tendance générale qui va dans le sens d'une stabilité ou d'une instabilité vis-à-vis de la séparation de phases. Ces aspects sont illustrés sur la Figure 4. 4.

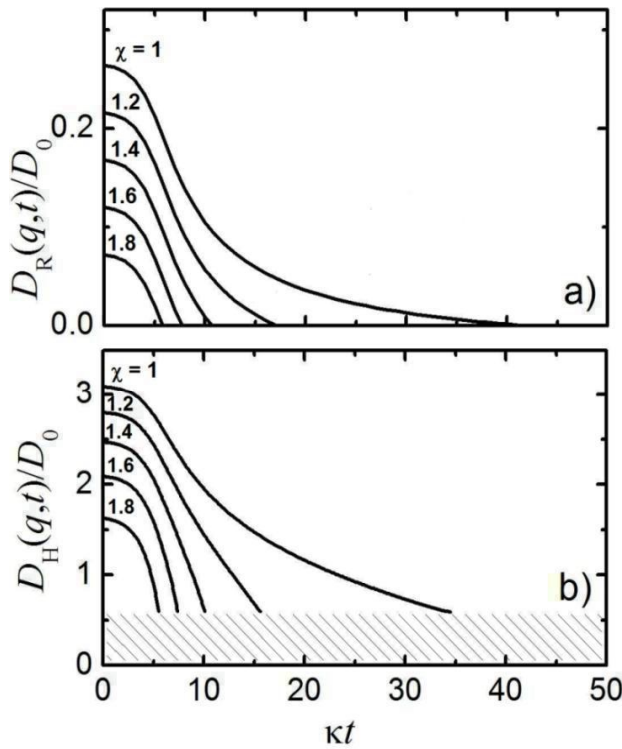


Figure 4. 4 : a) Variations du coefficient de diffusion normalisé $D_R(q,t)/D_0$ en fonction de κt pour plusieurs valeurs du paramètre d'interaction χ (dans l'ordre décroissant $\chi = 1, 1.2, 1.4, 1.6,$ et 1.8) et $ql = 0.5$ dans le modèle de Rouse (Voir Eq. 4. 23). b) Variations de $D_H(q,t)/D_0$ en fonction de κt pour les mêmes valeurs de χ en présence d'interactions hydrodynamiques de longue portée (Voir Eq. 4. 24). La région hachurée montre une accélération des instabilités due aux modes d'écoulement visqueux de longue portée.

La Figure 4. 4a montre que les fluctuations entraînent le système vers une instabilité ralentissant d'une façon critique encore davantage lorsque la qualité du solvant diminue (c'est-à-dire lorsque le paramètre χ augmente). Ces tendances restent valables selon que les interactions hydrodynamiques de longues portées sont présentes ou non mais des différences quantitatives substantielles existent montrant que le modèle dynamique doit être révisé et adapté pour rendre compte de ces effets. Une telle révision peut être réalisée à partir des Eqs. 4. 16 à 4. 18 et en écrivant le coefficient de diffusion généralisé sous la forme suivante

$$D(q,t) = D_H(q,t) = \frac{k_B T}{6\pi\eta\xi_c(t)} G(\zeta_c(t)) \quad (4. 24)$$

Selon les théories classiques des solutions de polymères¹⁶, la dynamique de Rouse prévoit une

diffusion plus lente en comparaison avec le modèle dit de Zimm où les interactions hydrodynamiques de longues portées sont présentes. Un exemple typique est celui de la diffusion de la chaîne de polymère marquée ou en solution infiniment diluée. Le coefficient de diffusion dans le cas de Rouse est proportionnel à \bar{N}^{-1} alors que dans le cas de Zimm, il est proportionnel à \bar{N}^{ν} où l'exposant critique ν est 1/3 en mauvais solvant, 1/2 en solvant thêta et 3/5 en bon solvant.^{32,33} Les résultats sont illustrés sur les Figures 4. 3a et 3b montrant que le coefficient de diffusion décroît avec le temps et se déplace vers les petites valeurs à mesure que χ augmente. C'est un phénomène de ralentissement de la relaxation des fluctuations. Ces courbes sont qualitativement similaires avec ou sans les effets hydrodynamiques de longues portées mais des différences substantielles existent sur le plan quantitatif puisque les valeurs numériques ne sont pas du même ordre de grandeur. On observe une accélération des relaxations dans les valeurs de $D_H(q,t)$ en plus d'un aspect particulier dû aux interactions de Zimm. On remarque que la valeur du coefficient de diffusion $D_H(q,t)$ devient imaginaire d'une façon discontinue à partir d'une valeur positive finie et sans passer par zéro. Cet effet peut être interprété comme une séparation de phase prématurée suite à la rapide accélération des fluctuations. Cette émergence d'instabilités prématurées propres aux interactions hydrodynamiques provient donc de couplage de modes d'écoulement visqueux et n'apparaît pas dans le cas du modèle de Rouse. Dans ce dernier cas, les fluctuations croissent seulement lorsque $D_R(q,t)$ s'annule puis devient négatif pour signaler les instabilités qui forcent le système vers une séparation de phase. Le milieu est alors le siège d'une compétition entre les modes de fluctuations stables qui relaxent et d'autres instables qui croissent dans le temps. Les modes de faibles longueurs d'onde relaxent vite pour stabiliser le système alors que ceux de grandes longueurs d'onde croissent entraînant le système vers la séparation de phase. En attendant suffisamment longtemps, on s'aperçoit que les modes instables l'emportent et une séparation de phase a lieu lorsque le paramètre d'interaction de Flory-Huggins dépasse la valeur critique.

La distance moyenne entre les domaines de séparation de phase n'est plus décrite par la longueur de corrélation $\xi_c(t)$ mais par la quantité \bar{q}_m^{-1} qui est l'inverse du nombre d'onde (amplitude du nombre d'onde) caractérisant le pic de la fonction $S(q,t)$. Ce passage d'une longueur caractéristique $\xi_c(t)$ à l'autre (\bar{q}_m^{-1}) est illustré sur la Figure 4. 5 pour des valeurs croissantes de χ . Comme attendu le système est le siège d'instabilités et de séparation de phase plus tôt à mesure que χ augmente et la quantité de solvant diminue

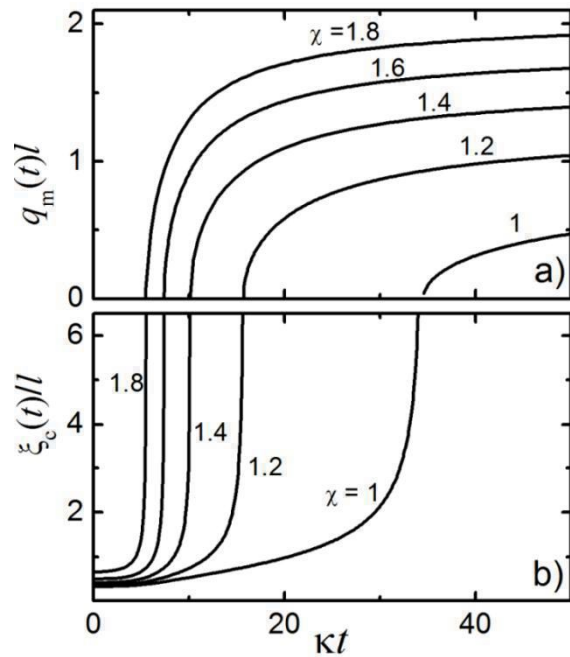


Figure 4. 5 : Passage de $\xi_c(t)$ à $q_m(t)$ et fonction de diffusion. a) Vecteur d'onde $q_m l$ au maximum de la fonction de diffusion en fonction de κt pour différents valeurs du paramètre d'interaction χ (Dans l'ordre croissant $\chi = 1, 1.2, 1.4, 1.6,$ et 1.8). b) Mêmes conditions pour la longueur de corrélation $\xi_c(t)l$ (Voir Eq. 4. 13).

De tels comportements sont confirmés sur la Figure 4. 6a qui montre comment les courbes de $S(q,t)$ développent un maximum à q_m et la Figure. 4. ϕ qui montre comment l'amplitude du maximum diverge dans le temps.

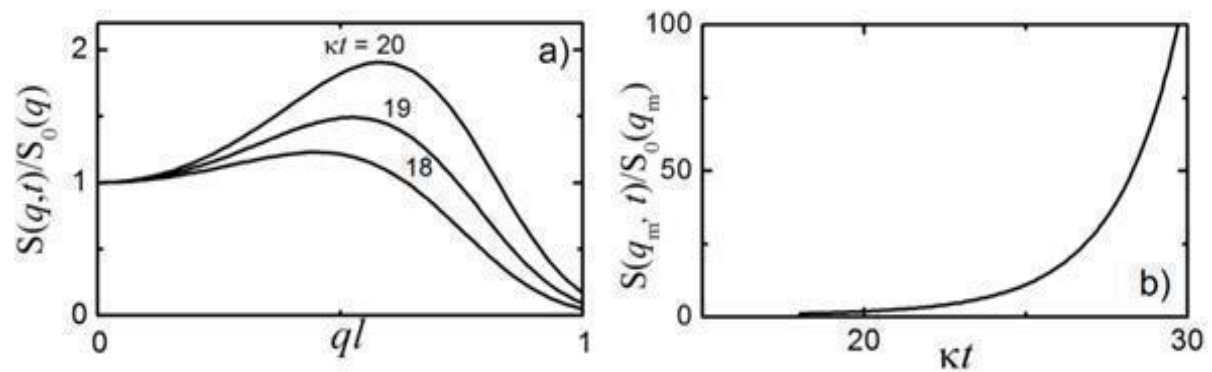


Figure 4. 6 : a) Fonction de diffusion normalisée $S(q,t)/S_0(q)$ en fonction de ql pour trois valeurs de κt dans l'ordre décroissant $\kappa t = 20, 19, 18$. b) Fonction de diffusion à q_m normalisée, $S(q_m,t)/S_0(q_m)$ en fonction de κt . Les calculs ont été réalisés en utilisant $\phi_0 = 0.4$ et $\chi = 1.2$ (Cercle vide du diagramme de la Fig. 4. 3b).

4. 8. CONCLUSIONS

Le processus de séparation de phase induite par la polymérisation ou PIPS représente l'une des méthodes de synthèse les plus répandues en chimie macromoléculaire. Elle permet dans une certaine mesure le contrôle des effets des paramètres importants du système et donc des propriétés d'usage. Cependant, une bonne compréhension des processus cinétiques impliqués nécessitent encore des efforts de recherche pour explorer certains détails de l'évolution temporelle à différentes étapes de la polymérisation. Cette réaction génère des développements et des changements drastiques dans le comportement en phase du milieu, la morphologie et les propriétés structurales, en fonction du temps, de l'état initial d'une solution de monomères à l'état final d'un solide ou d'un réseau plus ou moins rigide. Une tentative dans ce sens est présentée dans ce chapitre en examinant ces développements dans le cadre d'un modèle théorique typique des célèbres théories de Cahn-Hilliard-Cook de la décomposition spinodale des alliages métalliques. La fonction de diffusion $S(q,t)$ montre que le début des instabilités est régi par le paramètre $\chi_c(t)$ au lieu du paramètre classique de décomposition spinodale $\chi_s(t)$ qui est obtenu à partir de la dérivée seconde de l'énergie libre de Flory-Huggins. Alors que ce dernier dépend de $N^{-1}(\phi)$, l'autre paramètre $\chi_c(t)$ dépend de son intégrale $\beta(t)$. Les fluctuations de concentration de monomères survivent plus longtemps que dans le cas où l'on prend $\chi_s(t)$ comme paramètre critique de référence dans l'étude de stabilité. Les interactions hydrodynamiques de longues portées et le couplage des modes d'écoulement visqueux accélèrent les relaxations en entraînant des instabilités prématurées contrairement à la dynamique de Rouse qui ne montre pas de tels effets particuliers. Ces considérations sont donc importantes dans la compréhension de la compétition entre les cinétiques de polymérisation et de séparation de phase inhérentes au processus de synthèse macromoléculaire utilisant la méthode dite PIPS.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-
- [1] Flory, P.J. Principles of Polymer Chemistry, Cornell University Press, Ithaca, **1953**.
- [2] Odian, G. Principle of Polymerization, 3th Ed., Wiley-VCH, New York, **1991**.
- [3] Tran-Cong-Miyata, Q.; Van-Pham, D.T; Noma, K.; Norisuye, T.; Nakanishi, H. Chinese J. Polym. Sci. **2009**, 27, 23.
- [4] Chen, C.Y.; Chang, C.S.; Huang, S.W.; Chen, J.H.; Chen, H.L.; Su, C.I.; Chen, S.A. Macromolecules **2010**, 43, 4346.
- [5] Crawford, G.P.; Zumer, S. Liquid Crystals in Complex Geometries; Taylor & Francis, London, **1996**.
- [6] Ramanitra, H.; Chanclou P.; Vinouze, B.; Dupon, L. Mol. Cryst. Liq. Cryst. **2003**, 57, 404.
- [7] Drzaic, P.S. Liquid Crystal Dispersion, World Scientific, Singapore, **1995**.
- [8] Maschke, U.; Coqueret, X.; Benmouna, M. Macromol. Rapid Commun. **2002**, 23, 159.
- [9] Ain Sebaa, N.; Dembahri, Z.; Rolando C.; Benmouna, M. Polym. Inter. **2011**, 60, 1024.
- [10] Riccardi, C.C.; Borrajo, J.; Williams, R.J.J.; Reydet, G.; Sautereau, H.; Pascault, J.P. J. Polym. Sci. B: Polym. Phys. **1996**, 34, 349.
- [11] Dusek, K.; Prins, W. Adv. Polym. Sci. **1969**, 49, 7.
- [12] Okay, O. Polymer **1994**, 35, 796.
- [13] Svec, F.J.; Fréchet, J.M. Chem. Mater. **1995**, 7, 707.
- [14] Svec, F. J. Chromatogr. B **2006**, 841, 52.
- [15] K. Binder, J. Chem. Phys. **1983**, 79, 6387.
- [16] M. Doi, S. F. Edwards Theory of Polymer Dynamics, Oxford University Press, Oxford **1986**.
- [17] Akcasu, Z.; Hammouda, B.; Lodge T.P.; Han, C.C. Macromolecules **1984**, 17, 759.
- [18] Vilgis, T.; Benmouna, M. J. Chem. Phys. **1991**, 95, 1276.
- [19] Benmouna, F.; Johannsmann, D. J. Phys. Condens. Matter. **2003**, 15, 3003.
- [20] Roby, F.; Joanny, J.F. Macromolecules **1992**, 25, 4612.
- [21] Benmouna, M.; Fischer, E.W.; Seils, J.; Vilgis, T.A. Makromol. Chem., Theory Simul. **1993**, 2, 1276.

-
- [22] Benmouna, M.; J. Seils; Meier, G.; Patkowski, A.; Fischer, E.W. *Macromolecules* **1993**, *26*, 668.
- [23] Akcasu, Z.A. *J. Stat. Phys.* **1977**, *16*, 33.
- [24] L. Arnold, *Stochastic Differential Equations Theory and Applications*, Wiley, NY, USA **1973**.
- [25] Cahn, J.W.; Hilliard, J.E. *J. Chem. Phys.* **1958**, *28*, 258.
- [26] Elliott, C.M. *Num. Math.* **1989**, *88*, 35.
- [27] Kyu, T.; Lee, J.H. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *76*, 3746.
- [28] Luo, K. *Eur. Polym. J.* **2006**, *42*, 1499.
- [29] Young Gun, K.; Dong Seong L.; Gil Sun; L.; Ung Su C.; Yong Sung P.; Ki Pung Y. *Macromol. Chem. Phys.* **2011**, *212*, 1443.
- [30] Tanaka, T.; Takahashi, M.; Kawaguchi, S.; Hashimoto, T.; Saitoh H.; Kouya, T.; Taniguchi, M.; Lloyd, D.R. *Desal. Water Treat.* **2011**, *17*, 176.
- [31] Asai, S.; Majumdar, S.; Gupta, A.; Kargupta, K.; Ganguly, S.; *Comput. Mat. Sci.* **2009**, *47*, 193.
- [32] Akcasu, Z.; Benmouna, M.; Han, C.C. *Polymer* **1980**, *21*, 866.
- [33] Benmouna, M.; Alkafadji, S.; Akcasu, Z. *Macromolecules* **1981**, *14*, 147.

CONCLUSION GENERALE

Cette thèse est une contribution au développement des méthodes séparatives basées sur des phénomènes physiques différents s'adressant plus particulièrement aux protéines dans les gels.

Le chapitre 1 s'inscrit dans les tendances actuelles vers plus de miniaturisation dans les systèmes séparatifs. Cette tendance est motivée par l'examen de cibles rares dans des échantillons miniaturisés, comme par exemple les protéines faiblement exprimées dans les cellules.

Ce chapitre est consacré à une revue bibliographique sur le développement des colonnes capillaires monolithiques à base de polymères. Nous avons essayé de faire une revue sur ce thème particulier étant donné son importance et l'intérêt croissant qu'il suscite dans de nombreux laboratoires de renommée internationale.

Le chapitre 2 est une étude expérimentale des colonnes capillaire monolithiques à base du monomère monofonctionnel lauryl de méthacrylate et du réticulant bifonctionnel EDMA. Nous avons présenté la méthode de préparation de ces colonnes en mettant l'accent sur le greffage du polymère sur la surface interne de la colonne par silanisation. Cette préparation est importante puisque contrairement aux systèmes tassés à base de particules inorganique nécessitant une étape de préparation en plus, qui consiste à placer des frités pour empêcher les particules d'être entraînées avec la phase mobile. L'observation de la paroi de la colonne par MEB après la silanisation a permis de mettre en évidence le fait que le monolithe est bien accroché à la paroi.

Dans ce chapitre, nous avons présenté quelques résultats, puisque les données expérimentales sont actuellement à l'étude en vue d'une publication à soumettre prochainement. Nous avons seulement présenté des résultats préliminaires concernant les différentes colonnes, synthétisées en présence du réticulant EDMA à différentes concentrations. Nous avons en particulier montré les résultats concernant la perméabilité B_0 , obtenue à partir de deux protocoles d'élution mettant en jeu quatre types d'éluants, l'eau pure, l'ACN pure, un mélange à 75%ACN et un mélange eau/ACN particulier correspondant à la viscosité maximale. En effet, en examinant la courbe de viscosité du mélange eau/ACN, on se rend compte qu'elle présente un maximum à la composition 80/20 en volume. C'est le mélange à cette composition précise qui a été choisi pour les mesures de B_0 , sachant que la viscosité joue un rôle prépondérant dont on peut se rendre compte facilement en examinant la loi de Darcy. Ainsi, la variation de la perméabilité B_0 pour les différentes colonnes, c'est-à-dire en fonction de la concentration d'EDMA dans le mélange de polymérisation, de celle

de la composition du mélange porogène, et pour les différents éluants a été mise en évidence. Nous avons également estimé le diamètre des pores d_p qui dépend directement de la perméabilité B_0 par l'intermédiaire de la loi hydrodynamique de Kozeny-Carman. Ce diamètre suit parfaitement les tendances indiquées par B_0 . Il y a un autre diamètre moyen qui tient compte des effets de la porosité totale ε_T et qui a été invoqué dans ce chapitre. D'autres résultats plus élaborés et détaillés feront l'objet prochainement d'un manuscrit qui sera soumis à un journal spécialisé.

Le chapitre 3 a été consacré à l'étude des gels de PAAm modifiés par l'incorporation au cours de la synthèse chimique du gel, le dextran, polysaccharide connu. En examinant la cinétique de polymérisation de deux manières différentes (UV-visible, élévation de la température de polymérisation) et en comparant les résultats avec ceux du gel commercial Duracryl, nous avons pu identifier les conditions dans lesquelles il est possible d'améliorer les propriétés. Cette comparaison a mis en jeu des échantillons de dextran de masses différentes et de concentrations différentes. Cette méthodologie basée sur la comparaison des performances des gels synthétisés et de Duracryl a été poursuivie dans l'examen d'autres propriétés tels que le gonflement dans l'eau dé-ionisée et dans une solution tampon à PH contrôlé. Ces expériences ont montré comment l'ajout du dextran augmente la tenue mécanique du gel de PAAm surtout pour les grandes masses. Elles ont également mis en évidence les effets de gonflement osmotique dû aux petits ions dans la solution tampon en comparaison avec les résultats de l'eau dé-ionisée. Le tracé dit de Ferguson a permis de comparer les capacités séparatives des différents systèmes étudiés en SDS-PAGE. Ce diagramme met en évidence la progression du front de protéines en fonction de leur masse. Il montre le chemin pour une modification adéquate du gel de séparation en solutionnant la masse et la concentration de l'additif dextran, le gel commercial Dextran étant le système de base et de comparaison pour cette solution.

Le but de ce travail n'était pas seulement de trouver une alternative au gel commercial, mais surtout de démontrer qu'un gel dont on connaît la composition exacte est mieux adapté, pour étudier les propriétés physiques et améliorer les performances dans des applications concrètes.

Le chapitre 4 développe une modélisation de la cinétique de polymérisation en général, en mettant l'accent sur les effets des différents paramètres pertinents et en analysant les effets de la compétition entre les cinétiques de polymérisation et de séparation de phases. Ce chapitre est une démonstration de l'utilité de la théorie dite de Cahn-Hilliard-Cook, conçue pour les alliages métalliques. Des modèles simples pour le taux de conversion de monomères, la variation de la masse des polymères formés en fonction de ce taux de conversion ainsi que l'évolution temporelle des facteurs de structure ont été proposées. D'autres perspectives sont ouvertes pour le

perfectionnement de ces modèles et leur application à des cas concrets. En particulier, il est fondamental de pouvoir relier avec précision les effets des paramètres du système et la condition de polymérisation aux propriétés d'usage du gel formé. Ce thème reste d'actualité et pourra faire l'objet d'une poursuite des investigations présentées dans ce chapitre.

RESUME

Cette thèse comporte plusieurs parties. La première partie porte sur l'étude des colonnes capillaires à base de polymère pour répondre aux tendances actuelles à concevoir des dispositifs de séparation des protéines miniaturisés. Le chapitre 1 est consacré à une revue bibliographique de ce développement en mettant l'accent sur les avantages présentés par les colonnes monolithiques à base de polymères. Le chapitre 2 est consacré à l'étude expérimentale des colonnes monolithiques à base de laurylméthacrylate (LMA) et leurs caractérisations morphologiques et hydrodynamiques. Les résultats préliminaires concernent une étude de morphologie à sec par microscopie électronique à balayage. L'étude des propriétés hydrodynamiques met l'accent sur la composition du mélange de polymérisation, la nature et la composition de l'éluant (eau/ACN) à travers les différentes colonnes préparées et les protocoles d'injection de la phase mobile lors d'une expérience de séparation. Ces études ont permis de déterminer la perméabilité du monolithe ainsi que le diamètre moyen des pores correspondant à différentes conditions expérimentales (composition de la phase mobile, débit utilisé, protocole d'injection de la phase mobile, composition du mélange de polymérisation). Dans une troisième partie, nous présentons la synthèse, la caractérisation et les applications en électrophorèse de gels de PAAm modifiés par l'ajout d'un polysaccharide, le dextran avec pour objectif de trouver un substitut aux gels commerciaux comme le Duracryl. L'accent est mis sur les effets de la masse molaire du dextran et sa concentration. La cinétique de polymérisation a été suivie en analysant la variation de l'absorbance en fonction du temps mesurée par spectroscopie UV-visible. Comme il s'agit d'une polymérisation exothermique, la cinétique de réaction a été également étudiée en mesurant la variation de la température en fonction du temps. Le gonflement des gels synthétisés a été analysé dans l'eau dé-ionisée et dans la solution tampon pour mimer le liquide physiologique dans lequel les protéines trouvent un milieu favorable pour leur solubilisation. Les applications des gels synthétisés ont été montrées en utilisant la technique de séparation des protéines de type SDS- PAGE. Dans la dernière partie de cette thèse, nous considérons la cinétique de polymérisation qui est décrite par un modèle dit de double réaction. La cinétique de séparation de phases est décrite par le modèle de Cahn-Hilliard_Cook développé dans le cas des alliages métalliques et adapté aux mélanges à base de polymères.

Mots clés : Protéines, séparation, cinétique, gels, monolithes, polymérisation, hydrodynamique, gonflement, éluant, morphologie.

ABSTRACT

This thesis is comprised of several parts. The first part is a review of the synthesis, characterization and applications of polymer based capillary columns for protein separation by micro chromatography techniques. Chapter 2 is devoted to the experimental investigation of monolithic columns based on lauryl methacrylate, synthesis, morphology characterization and hydrodynamics. Preliminary results concern a study of morphology in the dry state using scanning electron microscopy and a study of hydrodynamic properties focusing on the effects of composition, the nature of eluant and its composition (water and ACN) through different synthesized columns and eluant injection protocole. This investigation allowed us to determine the permeability of the monolith and the mean diameter of pores obtained under a variety of experimental conditions (composition of the mobile phase, flow rate, injection protocol of eluant, composition of the polymerization mixture). In the second part, we present the synthesis, characterization and applications by gels via electrophoresis of PAAm gels modified by adding the polysaccharide Dextran. The aim was to find a substitute to the commercial gel Duracryl. The emphasis was on the effects of molecular weight and concentration of dextran. Kinetics of polymerization was monitored by analyzing the time dependent absorbance as measured by UV-visible spectroscopy. Since one deals with an exothermic polymerization, the kinetics can be monitored with the time temperature variations. The swelling of synthesized gels was investigated in de-ionized water and in the buffer solution to mimic the physiological fluid in which proteins are embedded. Applications of those gels were demonstrated through SDS-PAGE technique. In the last part of this thesis, we were interested on the modeling of the kinetics of polymerization and phase separation using the celebrated Cahn-Hilliard-Cook theories adapted to polymers composites from metal alloys.

Keywords: Proteins, separation, kinetics, gels, monoliths, polymerization, hydrodynamics, swelling, eluant, morphology.

الموجز

هذه الرسالة لها عدة أجزاء. الجزء الأول يركز على دراسة الأعمدة الشعرية استنادا للبوليمر لتلبية الاتجاهات الحالية في تصميم الأجهزة المنمنمة فصل البروتينات. ويخصص الفصل إلى استعراض أدبيات التنمية مع التركيز على المزايا للبوليمرات متجانسة على أساس الأعمدة. ويخصص الفصل إلى دراسة تجريبية من الأعمدة متجانسة على أساس ميتاكريليت لوريل (LMA) وتكييفها المورفولوجية والهيدروديناميكية. النتائج الأولية بشأن دراسة المورفولوجية للأراضي الجافة بواسطة المجهر الإلكتروني. دراسة الخصائص الهيدروديناميكية يركز على تكوين خليط البلمرة، طبيعة وتكوين شاطئ (المياه/ACN) عبر أعمدة مختلفة أعدت والبروتوكولات حقن الطور المتحرك خلال تجربة الانفصال. واستخدمت هذه الدراسات لتحديد نفاذية متراصة وقطر المسام الموافق الظروف التجريبية المختلفة (تكوين الطور المتحرك، ومعدل تدفق بروتوكول الحقن المستخدمة لتكوين الطور المتحرك من خليط البلمرة). في الجزء الثالث، نقدم التوليف، وتوصيف والتطبيقات في المواد الهلامية الكهربائي معلة تعديل بإضافة السكريد، ديكستران، بهدف إيجاد بديل عن المواد الهلامية التجارية Duracryl. يتم التركيز على الآثار المترتبة على الوزن الجزيئي للديكستران وتركيزه. وأعقب حركية البلمرة من خلال تحليل التغير في الامتصاصية مقابل الزمن يقاس UV-مربنية الطيفي. كما هو البلمرة الطاردة للحرارة، ودرس أيضا في حركية التفاعل عن طريق قياس التباين في درجة الحرارة مقابل الوقت. تم تحليل المواد الهلامية تورم توليفها في الماء منزوع الأيونات في الحل وعازلة لتقليد السوائل الفسيولوجية التي البروتينات هي بيئة مواتية للانحلالية بهم. عرضت تطبيقات المواد الهلامية تصنيجه باستخدام تقنية فصل البروتينات SDS PAGE. - في الجزء الأخير من هذه الأطروحة، نرى بوصف حركية البلمرة بواسطة نموذج يسمى رد الفعل المزدوج. يتم وصف حركية فصل المرحلة من طراز كاهن Hilliard_Cook وضعت في حالة السبائك المعدنية ومناسبة لمزيج من البوليمرات

كلمات البحث: البروتين، حركية الانفصال، والمواد الهلامية، كتل، البلمرة، الهيدروناميكا، وتورم، مورفولوجيا شاطئ.