



HAL
open science

Hydrophilisation de billes de polystyrène-divinylbenzène par adsorption de dérivés amphiphiles du dextrane : préparation et caractérisations structurales de nouveaux support pour la chromatographie des protéines

Clara Fournier

► **To cite this version:**

Clara Fournier. Hydrophilisation de billes de polystyrène-divinylbenzène par adsorption de dérivés amphiphiles du dextrane : préparation et caractérisations structurales de nouveaux support pour la chromatographie des protéines. Chimie. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1996. Français. NNT : 1996INPL153N . tel-01751141

HAL Id: tel-01751141

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751141v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

13600 8985 2

[N] 1936 FOURNIER, C.

SEINPC 18.3 11

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES INDUSTRIES CHIMIQUES DE NANCY

THESE

Présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR

DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Génie des Procédés et Chimie-Physique

par

CLARA FOURNIER

**HYDROPHILISATION DE BILLES DE POLYSTYRENE-DIVINYLBENZENE PAR
ADSORPTION DE DERIVES AMPHIPHILES DU DEXTRANE.
PREPARATION ET CARACTERISATIONS STRUCTURALES DE NOUVEAUX
SUPPORTS POUR LA CHROMATOGRAPHIE DES PROTEINES.**

Soutenue publiquement le 13 Décembre 1996 devant la Commission d'Examen

MEMBRES DU JURY :

Présidente :	Pr Edith DELLACHERIE
Rapporteurs :	Pr Daniel MULLER
	Pr Bernard SEBILLE
	Pr Michèle DEBATTY-MESTDAGH
	Dr Hubert HOMMEL
	Dr Michèle LEONARD

A mes Parents

et

A Frank

Ce travail a été réalisé dans l'équipe "Polymères et Biosystèmes" du laboratoire du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (URA 494) à l'École Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy.

Je remercie Madame Édith DELLACHERIE, Professeur à l'École Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, au sein même de son équipe. Que ces quelques mots soient le témoignage de mon respect et de ma gratitude pour la confiance totale qu'elle m'a accordée pour la réalisation de ce travail.

J'ai été très sensible à l'honneur que m'ont fait Messieurs Daniel MULLER et Bernard SÉBILLE, Professeurs des Universités respectives de Paris - Nord et de Créteil, en jugeant ce travail. Nos diverses rencontres organisées par *le Groupe de Recherche en Biochromatographie*, *le Groupe Français des Polymères* ou encore par "*The European Society of Bio-Chromatography*", furent pour moi un réel plaisir tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier Madame Michèle DEBATTY-MESTDAGH, Professeur à l'Université de Louvain-la-Neuve, et Monsieur Hubert HOMMEL, Maître de Conférences à l'École Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de Paris, pour leur présence à mon jury de thèse.

Il n'existe pas de mots assez forts pour exprimer la reconnaissance que j'éprouve envers Michèle LÉONARD, Chargée de Recherche au CNRS. Je veux lui dire combien j'ai apprécié la formation qu'elle m'a procurée, sa rigueur scientifique, son soutien moral, son amitié et sa passion communicative pour la Recherche.

A bientôt, Michèle.

Je remercie vivement Messieurs CHIKHI et HOMMEL du Laboratoire de Physique Quantique dirigé par Le Professeur Pierre LEGRAND, pour les études fructueuses réalisées en Résonance Paramagnétique Électronique. Qu'ils sachent le plaisir que j'ai eu à travailler avec eux et soient assurés de ma sincère reconnaissance.

J'adresse mes plus sincères remerciements à toutes les personnes de l'École Nationale Supérieure des Industries Chimiques qui ont contribué à la réalisation de ce travail, notamment :

Jean-François REMY et Cornélius SCHRAUWEN du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique,

Thérèse GEOFFROY, Robert CLÉMENT, Jean-Marie GROSSE et Henri LENDA du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire,

Marie-Laure VIRIOT du Département de Chimie Physique des Réactions.

Grâce à leur aide, leurs compétences, leur assistance technique et le prêt d'appareils, j'ai eu le privilège d'être initiée à de nombreuses techniques physico-chimiques.

Que Madame Nathalie PETITJEAN soit remerciée pour la diligence et le soin qu'elle a apportés à la dactylographie de ce mémoire.

Un très grand merci aux membres permanents et à mes camarades de l'équipe "Polymères et Biosystèmes" pour leur sympathie, pour la bonne ambiance qui règne au laboratoire notamment pendant les pauses-café, pour tous les bons moments partagés....

Bonne continuation à tous.

J'ai eu la chance de connaître la joie d'être Enseignant-Chercheur en tant que Monitrice et Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche, à l'École Nationale Supérieure des Industries Chimiques et à l'École Européenne d'Ingénieurs en Génie des Matériaux.

Merci à tous ceux qui m'y ont aidée.

A Nancy, ma ville d'adoption, j'ai vécu des moments inoubliables qui resteront à jamais gravés dans ma mémoire grâce à Isabelle, Krystel et David, Laurent, les Jumeaux, Nicolas, Valérie et bien d'autres.

Je remercie mes parents et Frank pour leur présence, leur soutien inconditionnel et leur amour tout au long de ces années.

RÉSUMÉ :

De nouvelles phases stationnaires pour la Chromatographie Liquide Haute Performance des protéines ont été préparées à partir de microsphères poreuses de polystyrène-divinylbenzène. Ce matériau étant très hydrophobe, il est nécessaire d'en modifier la surface afin de le rendre compatible avec la nature des biomolécules à séparer. Le procédé utilisé consiste à adsorber sur les particules, un polymère hydrophile tel que le dextrane. L'introduction de groupes phénoxy sur ce polysaccharide, à différentes concentrations, conduit à des dérivés amphiphiles capables de s'adsorber fortement sur le polystyrène. La couche de polymère déposée est stabilisée, dans les conditions optimales, par réticulation chimique à l'épichlorhydrine. Le taux de groupements phénoxy fixés sur le dextrane n'a pas une grande influence sur la quantité maximale de polymère qui peut être déposée sur le polystyrène mais est déterminant quant à l'aptitude des matériaux obtenus à adsorber les protéines. La porosité des supports préparés est étudiée tant à l'état sec par porosimétrie au mercure et par adsorption d'azote qu'à l'état solvaté dans divers milieux aqueux et organiques par chromatographie d'exclusion stérique. Elle dépend non seulement de la composition et de la conformation de la couche adsorbée mais aussi de l'aptitude des dextrans modifiés à s'associer par le biais d'interactions phénoxy-phénoxy. Finalement, des billes poreuses de polystyrène, modifiées par adsorption à saturation d'un dextrane présentant un taux élevé en groupes phénoxy, sont testées en chromatographie d'exclusion stérique des protéines. Le dextrane étant un polymère facilement fonctionnalisable, de tels supports sont utilisables pour d'autres modes de chromatographies; un exemple de purification de la trypsine par chromatographie d'affinité est donné.

ABSTRACT :

Polystyrene-divinylbenzene particles are commonly used as starting material for High Performance Liquid Chromatography. However, they cannot be applied without surface modifications to the chromatography of proteins in aqueous media, due to their hydrophobic properties. We report on the preparation of porous, hydrophilic polystyrene beads, prepared by dextran-coating. To favour dextran adsorption, the polysaccharide is previously substituted with different concentrations of phenoxy groups. Such amphiphilic derivatives are able to adsorb strongly on the polystyrene beads. Then the adsorbed polymeric layer is stabilised by chemical cross-linking with epichlorhydrin to avoid desorption in the presence of hydrophobic species such as proteins. Furthermore, the porous structure of polystyrene particles is investigated in the dry state by mercury porosimetry and nitrogen adsorption and in several aqueous and organic media by size exclusion chromatography. It may be concluded that the porosity depends not only on the composition and conformation of the adsorbed layer, but also on the ability of modified dextrans to associate by means of phenoxy-phenoxy interactions. Since dextran is easily derivatizable, the most hydrophilic support is tested not only in size exclusion chromatography of proteins but also in affinity chromatography of trypsin, with fixation of a trypsin ligand on the adsorbed layer.

Liste des abréviations et symboles.....	9
Introduction Générale.....	16
CHAPITRE I : Généralités sur l'utilisation des phases stationnaires à base de polystyrène-divinylbenzène en chromatographie liquide.....	19
1 - Introduction.....	20
2 - Particules de polystyrène	23
2-1 Les procédés classiques.....	23
2-1-1 Procédé en suspension.....	23
2-1-2 Procédé en émulsion.....	24
2-1-3 Procédé en dispersion	25
2-2 Autres procédés	25
2-2-1 Description du procédé développé par Ugelstad	26
2-2-2 Les tendances actuelles.....	26
3 - Particules de polystyrène hydrophilisées.....	28
3-1 Copolymérisations de dérivés styréniques.....	28
3-2 Fixation de groupes hydrophiles et/ou ioniques dans la matrice	29
3-3 Matériaux composites	30
3-3-1 Fixation de polymères hydrophiles	30
3-3-2 Adsorption de polymères et/ou de monomères.....	31
3-3-2-1 Adsorption de polymères sur une surface polystyrénique chargée.....	31
3-3-2-2 Adsorption d'un monomère suivie d'une polymérisation in situ.....	32
3-3-2-3 Adsorption de polymères hydrophiles/hydrophobes sur des surfaces neutres	32
3-3-3 Matériaux à pores composites	33
4- Analyse structurale des particules	35
4-1 Taille et forme des particules	35
4-1-1 Tamisage.....	35
4-1-2 Méthodes électriques	35
4-1-3 Méthodes optiques et électroniques.....	35
4-2 Porosité et surface spécifique.....	37
4-2-1 Méthodes physiques.....	38
4-2-2 Méthodes microscopiques	39
4-2-3 Méthode chromatographique	39
4-3 Analyse chimique de la surface.....	39
5 - Conclusion.....	41
Bibliographie.....	43

Chapitre II : Synthèse et caractérisation de dérivés amphiphiles du dextrane.....	48
1 - Généralités sur le dextrane.....	49
2 - Modifications chimiques du dextrane.....	51
2-1 Schémas de synthèse	51
2-2 Protocoles expérimentaux.....	51
2-2-1 Dérivés chlorés.....	52
2-2-1-1 Protocole expérimental	52
2-2-1-2 Détermination du taux de substitution en chlore par potentiométrie.....	52
2-2-1-3 Optimisation de la synthèse.....	53
2-2-2 Introduction de groupements phénoxy	54
2-2-2-1 Protocole expérimental	54
2-2-2-2 Dosages spectrophotométriques.....	54
2-2-2-3 Optimisation de la réaction.....	55
2-2-2-4 Hydrolyse des chlores résiduels	57
3 - Propriétés physico-chimiques des polymères en solution.....	58
3-1 Détermination des masses moléculaires moyennes	58
3-1-1 Étude préliminaire par chromatographie d'exclusion stérique (SEC).....	58
3-1-1-1 Principe	58
3-1-1-2 Conditions expérimentales.....	59
3-1-1-3 Étude en milieu phosphate	59
3-1-1-4 Étude en présence de solvant organique.....	62
3-1-1-5 Étude en présence de thiocyanate de potassium (KSCN)	64
3-1-2 Étude par diffusion de la lumière laser	64
3-1-2-1 Rappels théoriques.....	64
3-1-2-2 Équipements et conditions opératoires	65
3-1-2-3 Détermination des masses molaires moyennes	67
3-2 Étude viscosimétrique en solution diluée.....	69
3-2-1 Aspects théoriques.....	69
3-2-2 Matériel et conditions opératoires	70
3-2-3 Influence du taux de substitution.....	70
3-3 Étude par spectroscopie de fluorescence	73
3-3-1 Principe	73
3-3-2 Conditions expérimentales.....	74
3-3-3 Variation du rapport I1/I3.....	74
4- Conclusion.....	75
Bibliographie.....	77

Chapitre III : Adsorption des dextrans amphiphiles sur les particules de polystyrène. Stabilisation chimique de la couche adsorbée.	79
1 - Généralités sur l'adsorption des polymères aux interfaces solide-liquide.....	80
1-1 Introduction.....	80
1-2 Caractéristiques du mécanisme d'adsorption.....	81
2 - Étude de l'adsorption des dextrans-phénoxy sur le polystyrène.....	84
2-1 Conditionnement des particules.....	84
2-2 Méthodes de détermination des propriétés d'adsorption.....	85
2-2-1 Principe.....	85
2-2-2 Méthodes de détermination de la quantité adsorbée.....	86
2-3 Influence du taux de substitution du dextrane en groupes phénoxy.....	89
2-3-1 Comparaison des taux de recouvrement déterminés par diverses méthodes.....	89
2-3-2 Cinétique d'adsorption.....	90
2-3-3 Isothermes d'adsorption.....	90
3 - Stabilisation de la couche de polymère déposé.....	94
3-1 Présentation et objectifs.....	94
3-2 Protocoles expérimentaux.....	94
3-2-1 Réticulation chimique.....	94
3-2-2 Lavage des particules par un détergent.....	95
3-2-3 Calcul du taux de recouvrement final.....	95
3-3 Influence de la nature et de la concentration en agent réticulant.....	96
3-4 Influence du taux de substitution.....	98
4 - Conclusion.....	100
Bibliographie.....	101

Chapitre IV : Caractérisations physico-chimiques de la couche de dextrane

déposée à la surface du polystyrène.....	103
1 - Caractérisation chimique de la surface.....	104
2 - Réactivité de la surface vis-à-vis de l'albumine	105
2-1 Généralités sur l'adsorption des protéines sur des surfaces	105
2-1-1 Caractérisation générale des protéines.....	105
2-1-2 Adsorption des protéines.....	106
2-2 Adsorption de l'albumine du sérum bovin.....	108
2-2-1 Généralités sur l'albumine	108
2-2-2 Protocoles expérimentaux.....	108
2-2-2-1 Principe et conditions d'adsorption.....	108
2-2-2-2 Dosage des solutions d'albumine	108
2-2-3 Isothermes d'adsorption de l'albumine.....	109
2-2-3-1 Influence du taux de substitution en groupes phénoxy des polymères	109
2-2-3-2 Influence du pH.....	110
2-2-4 Influence du taux de recouvrement des particules.....	110
2-2-5 Conclusion.....	111
3 - Conformation des chaînes de dextrane à la surface du polystyrène.....	112
3-1 Rappels théoriques sur la résonance paramagnétique électronique.....	112
3-1-1 Introduction.....	112
3-1-2 Analyse et exploitation des spectres	113
3-2 Conditions expérimentales.....	115
3-2-1 Dispositif expérimental.....	115
3-2-2 Marquage des polymères par le 4-amino-TEMPO	115
3-2-2-1 Activation au carbonyl diimidazole	116
3-2-2-2 Activation au chlorure de trétylène	116
3-2-3 Adsorption des polymères marqués sur le polystyrène.....	117
3-3 Analyse des spectres expérimentaux.....	117
3-3-1 Influence du taux de substitution des dextrans en groupes phénoxy	118
3-3-2 Influence du taux de recouvrement des particules.....	120
3-3-3 Effet de réticulation	121
3-3-4 Présence de solvant organique	121
3-3-5 Présence d'albumine.....	123
4 - Conclusion.....	125
Bibliographie.....	126

Chapitre V : Caractérisation structurales des particules de polystyrène natives et modifiées.....	129
1 - Taille et forme des particules	130
1-1 Microscopie.....	130
1-1-1 Microscopie optique.....	130
1-1-2 Microscopie électronique à balayage.....	130
1-1-2-1 Conditions expérimentales.....	130
1-1-2-2 Analyse des billes natives et modifiées.....	130
1-2 Mesure de taille de particules	134
1-2-1 Principe	134
1-2-2 Appareillage et préparation pour analyse.....	134
1-2-3 Analyse granulométrique des supports.....	134
2- Porosité et surface spécifique à l'état sec	136
2-1 L'adsorption physique d'azote	136
2-1-1 Calcul de la surface spécifique	137
2-1-2 Détermination des rayons de pores et de la distribution	138
2-2 La porosimétrie au mercure.....	139
2-3 Protocoles expérimentaux.....	140
2-3-1 Appareillage pour l'adsorption d'azote.....	140
2-3-2 Porosimètre à mercure	141
2-4 Structure des particules modifiées	142
2-4-1 Validation des méthodes d'étude structurale.....	142
2-4-1-1 Séchage des particules.....	142
2-4-1-2 Limites d'utilisation de la porosimétrie au mercure	143
2-4-1-3 Détermination des surfaces spécifiques, des volumes poreux et des distributions poreuses	145
2-4-2 Résultats et discussion	147
2-4-2-1 Influence du taux de recouvrement des particules.....	147
2-4-2-2 Influence de la stabilisation de la couche adsorbée.....	149
2-4-2-3 Influence du taux de groupements phénoxy	150
3 - Porosité des particules à l'état solvaté.....	154
3-1 Détermination de la porosité par chromatographie d'exclusion stérique.....	154
3-2 Protocoles expérimentaux.....	156
3-2-1 Appareillage	156
3-2-2 Remplissage des colonnes	156
3-2-3 Les courbes d'étalonnage	156
3-2-3-1 Milieu organique	157
3-2-3-2 Milieux aqueux ou mixte.....	158
3-2-4 Conditions opératoires	158

3-3 Résultats et discussion	159
3-3-1 Étude en solvant organique (tétrahydrofurane).....	159
3-3-1-1 Calcul d'erreur sur la détermination de K.....	159
3-3-1-2 Détermination du modèle de pores.....	160
3-3-1-3 Détermination du rayon poreux moyen.....	160
3-3-1-4 Comparaison des courbes de calibration de divers supports en tétrahydrofurane.	160
3-3-2 Étude en solvant mixte	161
3-3-3 Étude en milieu phosphate	162
4 - Étude comparative et conclusion	163
Bibliographie.....	165

Chapitre VI : Applications à la séparation chromatographique des protéines.....	167
1- Chromatographie d'exclusion stérique des protéines	168
1-1 Conditions expérimentales.....	168
1-2 Courbes de calibration en protéines.....	170
1-2-1 Influence du pH et de la force ionique.....	170
1-2-2 Comparaison avec les courbes de calibration en pullulanes.....	172
1-2-3 Comparaison avec une colonne commerciale.....	172
2- Chromatographie d'affinité appliquée à la purification de la trypsine	176
2-1 Généralités sur la chromatographie d'affinité.....	176
2-2 La trypsine.....	177
2-2-1 Généralités sur les sérine-protéases.....	177
2-2-2 Caractéristiques de la trypsine.....	177
2-2-2-1 Formation.....	177
2-2-2-2 Structure	177
2-2-2-3 Propriétés physico-chimiques de la trypsine.....	178
2-2-2-4 Les substrats de la trypsine	179
2-2-2-5 Les ligands.....	179
2-2-3 Chromatographie d'affinité de la trypsine.....	179
2-3 Préparation des supports d'affinité	180
2-3-1 Activation.....	181
2-3-2 Couplage de la p-aminobenzamidine et désactivation.....	181
2-3-3 Remplissage des colonnes.....	181
2-4 Détermination des paramètres d'affinité.....	181
2-4-1 Évaluation des interactions non spécifiques	181
2-4-2 Analyse frontale.....	183
2-4-2-1 Détermination de la capacité d'adsorption.....	183
2-4-2-2 Conditions expérimentales.....	184
2-4-3 Analyse zonale	184
2-4-3-1 Détermination des constantes d'association.....	184
2-4-3-2 Conditions expérimentales.....	186
2-4-4 Résultats et discussion	187
2-5 Exemples de purification de la trypsine	188
2-5-1 Conditions expérimentales.....	188
2-5-1-1 Éluion de la trypsine	188
2-5-1-2 Dosage de la concentration de trypsine.....	188
2-5-1-3 Dosage de l'activité amidasique	189
2-5-2 Purification	189
3- Conclusion.....	192
Bibliographie.....	193

Conclusion Générale.....	195
Annexe.....	199

SYMBOLES :

Techniques et Méthodes :

CLHP :	Chromatographie Liquide Haute Performance (ou HPLC)
RPE :	Résonance Paramagnétique Électronique
BET :	Détermination de la surface spécifique par la méthode BET (Brunauer, Teller et Emmett)
BJH :	Détermination de la distribution poreuse par la méthode BJH (Barrett, Joyner, Halenda)
IRTF :	Infra-Rouge par Transformée de Fourier
UV-Vis :	Spectrophotométrie Ultra-violet - Visible
SEC :	Chromatographie d'exclusion stérique
LALLS :	Diffusion de la lumière laser aux petits angles
MALLS :	Diffusion de la lumière laser à multi-angles
SEC-MALLS :	Appareil de diffusion de la lumière laser à multi-angles couplée à une chromatographie d'exclusion stérique

Caractérisation des polymères :

\overline{M}_n :	Masse moléculaire moyenne en nombre (g/mol)
\overline{M}_p :	Masse moléculaire moyenne en poids (g/mol)
\overline{M}_v :	Masse moléculaire moyenne viscosimétrique (g/mol)
\overline{M}_{SEC} :	Masse moléculaire moyenne déterminée par chromatographie d'exclusion stérique (g/mol)
C :	Concentration d'un polymère en solution (g/L)
dn/dc	Variation de l'indice de réfraction (n) d'un solvant avec la concentration du polymère
$[\eta]$:	Viscosité intrinsèque (dL/g)
η_{sp}/C :	Viscosité réduite
k_H :	Coefficient de Huggins
R_g ($\langle R_{g_n}^2 \rangle^{1/2}$):	Rayon de giration d'ordre n (Å)
V_H :	Volume hydrodynamique
Tg :	Température de transition vitreuse (°C)

Paramètres de l'adsorption :

C_i :	Concentration initiale d'un polymère ou protéine en solution (g/L)
C_S ou $C_{éq.}$:	Concentration d'un surnageant (g/L)
Γ :	Taux de recouvrement des particules (mg/m ²)
Γ_{pl} :	Taux de recouvrement maximal (plateau ou à saturation)
Γ_f :	Taux de recouvrement final
Γ_{th} :	Taux de recouvrement théorique

Abréviations et Symboles

Γ_{UV} :	Taux de recouvrement des particules déterminé par la méthode du surnageant
Γ_{IR} :	Taux de recouvrement des particules déterminé par Infra-Rouge
Q :	Quantité de polymère (mg) ou de protéine adsorbée (mg/m^2)
<u>RPE</u> :	
\mathcal{H} :	Hamiltonien de spin
T :	Température absolue (K)
Pads :	Fraction de la population lente du marqueur
Psol :	Fraction de la population rapide du marqueur
τ_c :	Temps de corrélation de réorientation des marqueurs (s)
ΔE_{eff} :	Énergie d'adsorption effective

Grandeurs chromatographiques :

V_o :	Volume mort (d'exclusion ou intersticiel) d'une colonne chromatographique
V_t :	Volume de perméation totale d'une colonne chromatographique (mL)
V_e ou VR :	Volume d'éluion (ou de rétention) d'un soluté (mL)
V_p :	Volume poreux d'une colonne chromatographique (mL)
t_R :	Temps d'éluion (ou de rétention) d'un soluté (minutes)
t_o :	Temps d'éluion d'un soluté non-retenu sur une colonne (minutes)
L :	Longueur d'une colonne (mm)
N :	Nombre de plateaux théoriques
H :	Hauteur équivalente d'un plateau théorique ou efficacité (mm)
h :	Hauteur équivalente d'un plateau théorique réduite
δ :	Largeur d'un pic chromatographique à mi-hauteur
R_s :	Résolution
α :	Sélectivité
K :	Coefficient de distribution
D. I. :	Diamètre interne d'une colonne chromatographique (mm)

Pour la chromatographie d'affinité :

Q_x :	Capacité d'adsorption réelle en protéine (A) ou quantité de ligand immobilisé actif (mol)
Q_{At} :	Quantité totale de protéine adsorbée sur le support (mol)
X :	Ligand immobilisé sur le support
[X] :	Concentration surfacique du ligand immobilisé X libre (mol ou mol/g de support)
L :	Ligand soluble
(L) :	Concentration en solution du ligand soluble (mol/L)
K_{AX} et K_{AL} :	Constantes d'association entre la protéine A et ses ligands X et L (mol/L)
V^* :	Volume d'éluion d'un soluté non-retenu (mL)

Abréviations et Symboles

V_z : Volume d'élution d'un soluté à dilution infinie (mL)

UI : Unité Internationale

Porosité :

S_{BET} : Surface spécifique (m²/g) déterminée par la méthode BET

S_{N₂} : Surface spécifique (m²/g) calculée par adsorption d'azote

S_{Hg} : Surface spécifique (m²/g) calculée par porosimétrie au mercure

S_{N₂+Hg} : Surface spécifique (m²/g) calculée par combinaison de l'adsorption d'azote et de la porosimétrie au mercure

V_p (N₂) : Volume poreux (cm³/g) mesuré par adsorption d'azote

V_p (Hg) : Volume poreux (cm³/g) déterminé par porosimétrie au mercure

V_p (N₂+Hg) : Volume poreux (cm³/g) calculé par combinaison de l'adsorption d'azote et de la porosimétrie au mercure

R_p ou R_{p_i} : Rayons de pores de classe i (Å)

R_{p50} ou R_{p_m} : Rayons poreux moyens (Å)

V_{p_i} : Volume poreux associé aux pores de rayons R_{p_i} (cm³/g)

Σ(V_{p_i}) = f(R_{p_i}) : Distribution poreuse cumulée

d(V_{p_i})/dR_{p_i} = f(R_{p_i}) : Distribution poreuse relative

r_k : Rayon de Kelvin (Å)

α : Coefficient de Halasz

θ : Angle de contact surface-mercure (en degré)

γ : Tension de vapeur de l'azote (N.m⁻¹)

γ : Tension superficielle du mercure (N.m⁻¹)

r_i : Rayon hydrodynamique d'un polymère-standard

ABRÉVIATIONS

BDGE :	Butanediol diglycidyl éther
BSA :	Albumine du Sérum Bovin
CDI :	Carbonyl diimidazole
DEAE :	Diéthylaminoéthyle
Dex :	Dextrane
DexCl :	Dextrane-Chlorhydrine
DexP :	Dextrane-Phénoxy
DexPA, B, C :	Dextranes-Phénoxy à différentes teneurs en groupes phénoxy
DMSO :	Diméthyl sulfoxyde
EDGE :	Ethylène glycol diglycidyl éther
EG :	Ethylène glycol
EpCl :	Épichlorhydrine
MeOH :	Méthanol
p-ABA :	P-aminobenzamidine
PS-DexP :	Polystyrène-divinylbenzène modifié par adsorption de dextrane-phénoxy
PS-DexP-pABA :	Polystyrène-divinylbenzène modifié par adsorption de dextrane-phénoxy puis fonctionnalisé par la p-aminobenzamidine
PS-DVB :	Polystyrène-divinylbenzène natif
PVA :	Alcool polyvinylique
T40 :	Dextrane de $\overline{M}_p \approx 40\ 000\ \text{g/mol}$
T10 :	Dextrane de $\overline{M}_p \approx 10\ 000\ \text{g/mol}$
TA :	Téréphtaldéhyde
THF :	Tétrahydrofurane
TrCL :	Chlorure de trésyle
Tris :	Tris(hydroxylaminométhane)
SDS :	Sulfate de dodécyle de sodium

INTRODUCTION

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) est un outil indispensable pour l'analyse, la séparation ou la purification des molécules. Cette technique a cependant souffert pendant longtemps d'un manque de supports adéquats, c'est-à-dire présentant à la fois une résistance mécanique, une stabilité chimique et des caractéristiques de granulométrie et de porosité adaptées à la mise en oeuvre de séparations rapides et résolutive.

La séparation des macromolécules biologiques telles que les protéines est une opération délicate. En raison de leur structure chimique complexe, les protéines s'adsorbent sur un grand nombre de surfaces, par le biais d'interactions diverses. La mise en place de ces interactions peut induire des perturbations plus ou moins importantes dans la structure tridimensionnelle des protéines et peut, dans certains cas, occasionner leur dénaturation.

Parmi les supports utilisés en bio-chromatographie, la silice reste un matériau de choix, en raison de sa résistance mécanique, de son faible coût et de la grande variété de particules actuellement disponibles (taille, porosité ...). L'utilisation de la silice pose néanmoins un certain nombre de problèmes. Ces problèmes sont liés, d'une part à la formation d'interactions ioniques et/ou de liaisons hydrogène plus ou moins réversibles entre les groupes silanols ionisables et les protéines, et d'autre part à son instabilité chimique dans les milieux aqueux légèrement alcalins. De nombreuses études ont été consacrées à la mise au point de procédés qui visent à passiver la surface de ce matériau, afin de minimiser les interactions avec les biomolécules et d'une façon générale, le milieu environnant. A l'heure actuelle, de nombreux supports commerciaux à base de silice sont disponibles et sont utilisables pour les divers modes de chromatographie (chromatographie d'exclusion stérique, d'échanges d'ions, hydrophobe, d'affinité) après une fonctionnalisation adéquate.

Parallèlement aux supports à base de silice, de nouveaux matériaux à base de polymères synthétiques ont été développés. En particulier, les supports constitués de polystyrène réticulé par le divinylbenzène (PS-DVB) présentent l'avantage d'être très stables en milieu aqueux et connaissent un succès grandissant. Cependant, le caractère hydrophobe marqué du polystyrène restreint considérablement ses applications dans le domaine des biotechnologies. Par analogie avec les études réalisées sur les phases de silice, certains auteurs ont montré qu'il est possible de modifier les propriétés du polystyrène par hydrophilisation de sa surface. De ce fait, l'adsorption non-spécifique des protéines sur le polystyrène peut être réduite voire supprimée.

Le travail présenté tout au long de ce mémoire s'inscrit dans cette dernière stratégie de recherche. L'objectif principal a consisté à préparer de nouvelles phases stationnaires pour la Chromatographie Liquide Haute Performance des protéines, à partir de billes poreuses de polystyrène-divinylbenzène puis à les caractériser. Ces particules ont été modifiées par adsorption de dérivés du dextrane à leur surface. Le dextrane a été choisi en raison de son

caractère hydrophile et biocompatible, et également en raison de sa réactivité. Cependant ce polysaccharide ne possède pas d'affinité pour les surfaces hydrophobes. Pour favoriser son adsorption, le dextrane a été modifié par fixation chimique de groupes phénoxy, le rôle de ces groupements hydrophobes devant être d'assurer l'ancrage du polysaccharide à la surface des particules de PS-DVB.

Dans la première partie de ce rapport, nous citerons les procédés de polymérisation les plus récents, qui permettent de préparer des particules sphériques de PS-DVB utilisables en CLHP. Nous décrirons ensuite les principales méthodes utilisées pour modifier la surface de ces particules, ainsi que les techniques qui permettent leur caractérisation.

La modification chimique du dextrane que nous avons étudiée est décrite dans le chapitre II. Plusieurs dérivés du dextrane, différant essentiellement par leur teneur en groupes phénoxy, ont été préparés puis caractérisés. En particulier, nous nous sommes attaché à étudier leur comportement en solution aqueuse.

Les propriétés d'adsorption de ces dérivés sur les particules de PS-DVB, sont rapportées dans le chapitre III. Cette étude porte sur les aspects cinétique et surtout thermodynamique du phénomène. Nous avons tenté de corréler les propriétés physico-chimiques des polymères à leurs propriétés d'adsorption sur le polystyrène. La couche de polymère adsorbée a ensuite été stabilisée par réticulation chimique, afin d'éviter toute désorption de dextrane au cours des manipulations ultérieures. Les conditions optimales de la stabilisation ont été déterminées par variation conjointe de la nature et de la concentration en agent réticulant utilisé.

Le travail présenté dans le chapitre IV avait pour objectif dans un premier temps, d'évaluer le caractère plus ou moins hydrophile des particules recouvertes. Celui-ci a été estimé en présence d'albumine, protéine hydrophobe susceptible de s'adsorber sur toute surface elle-même hydrophobe. L'adsorption non-spécifique de l'albumine a été mesurée dans diverses conditions expérimentales. L'influence du taux de recouvrement en dextrane des billes de PS-DVB et de la teneur en groupes phénoxy des dextrans adsorbés a été également examinée.

Afin d'expliquer les résultats obtenus, le comportement des dextrans à l'interface solide/liquide a été étudié par Résonance Paramagnétique Électronique, après marquage préalable. Des hypothèses ont été émises quant à la structure et aux propriétés dynamiques de la couche adsorbée, en relation avec la composition chimique des polymères, le taux de recouvrement des particules, l'effet de la réticulation et le milieu environnant. Des modèles schématiques de conformation du polymère adsorbé sont proposés.

Les modifications structurales apportées aux billes de PS-DVB ont été étudiées par diverses techniques granulométriques et porosimétriques. Les méthodes utilisées et détaillées dans le

chapitre V ont permis une étude approfondie de la structure poreuse des matériaux, tant à l'état sec qu'à l'état solvato.

A l'état sec, la porosité des divers supports préparés est déterminée par porosimétrie au mercure et par adsorption d'azote. Ces méthodes classiques ont permis d'évaluer la surface spécifique, le volume poreux et la distribution poreuse des matériaux. La porosité des supports préparés a également été étudiée à l'état solvato dans divers milieux aqueux et organiques par chromatographie d'exclusion stérique de standards polymères. Un traitement mathématique des courbes de calibration obtenues a permis de modéliser la distribution poreuse de chaque matériau en fonction du milieu solvato. L'ensemble des résultats obtenus nous a conduit à émettre des hypothèses concernant la répartition des dextrans-phénoxy à la surface du PS-DVB, en fonction de la taille des pores et de leur teneur en groupes phénoxy.

Dans certaines conditions, les particules de PS-DVB recouvertes présentent des caractéristiques compatibles avec la mise en oeuvre de séparations bio-chromatographiques, car elles combinent certaines propriétés physiques des billes de PS-DVB à l'hydrophilie, la flexibilité et la biocompatibilité du dextrane.

Ainsi que nous le verrons dans le chapitre VI, ces particules ont été testées en chromatographie d'exclusion stérique des protéines, dans diverses conditions d'élution (pH, force ionique). Enfin, le dextrane étant un polymère facilement fonctionnalisable, nous avons envisagé d'utiliser les particules modifiées pour d'autres modes de chromatographie; en particulier, un exemple de purification de la trypsine par chromatographie d'affinité sur un support obtenu par fixation de p-aminobenzamidine sur la couche de dextrane adsorbée, est donné et discuté.

CHAPITRE I

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS SUR L'UTILISATION DES PHASES STATIONNAIRES À BASE DE POLYSTYRÈNE EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

Ce chapitre est consacré, en première partie, à décrire les procédés de fabrication des particules de polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB) destinées à la Chromatographie Liquide Haute Performance. Nous décrirons les procédés les plus récents qui permettent de préparer des particules présentant de bonnes performances chromatographiques.

Le PS-DVB étant très hydrophobe, il n'est, à ce jour, que peu utilisé en bio-chromatographie. Néanmoins, nous citerons les diverses méthodes utilisées pour en modifier la surface, visant en particulier, à la rendre hydrophile, c'est-à-dire compatible avec la nature des biomolécules.

Enfin, nous présenterons brièvement les diverses méthodes utilisables pour caractériser un lit de particules poreuses.

1 - INTRODUCTION

La chromatographie liquide est une méthode d'analyse et de séparation des différents composés d'un mélange qui repose sur la distribution sélective des solutés entre deux phases, la phase stationnaire (le plus souvent solide) et la phase mobile (liquide). **La phase stationnaire, ou support chromatographique,** est l'acteur principal dans le processus chromatographique. Le matériau dont la phase stationnaire est composée possède ou non des sites fonctionnels. Les caractéristiques propres du support (granulométrie, porosité, surface spécifique ...) et la nature chimique de ces sites déterminent le type d'interactions responsables de la rétention des solutés. Le choix d'un support dépend essentiellement du mode de séparation désiré, des solvants et des pressions utilisées et aussi de la nature et de la taille des molécules à séparer.

Dans les années 70, le développement des équipements chromatographiques a permis l'usage de particules plus petites, de géométrie régulière, utilisables à des débits plus rapides (temps d'analyse réduits) et dont l'efficacité, la sélectivité et la résolution des séparations sont améliorées par rapport aux méthodes traditionnelles. Ces améliorations ont donné naissance à la Chromatographie Liquide Haute Performance notée CLHP.

Les supports chromatographiques peuvent être classés selon de nombreux critères (1, 2, 3, 4). On les classe notamment selon :

- **leur nature chimique** : minérale ou organique, synthétique ou naturelle, ou encore composite.
- **leur rigidité** : les gels mous ou xérogels sont utilisés pour la chromatographie liquide basse pression ; les gels plus rigides (aérogel) sont adaptés à la CLHP. Les xérogels sont caractérisés par leur capacité à gonfler dans certains milieux.
- **le mécanisme de discrimination entre les solutés** :
 - la chromatographie d'exclusion stérique ou SEC,
 - la chromatographie d'échange d'ions,
 - la chromatographie en phase inverse,
 - la chromatographie hydrophobe,
 - la chromatographie d'affinité, etc...

La CLHP est un outil largement employé comme technique de séparation pour obtenir des produits de haute pureté à partir de milieux issus d'opérations biotechnologiques. Les biopolymères tels que les protéines sont très sensibles aux changements de leur environnement et ne peuvent être isolés par des méthodes conventionnelles (distillation, extraction...) en raison de leur fragilité. Ces polymères doivent garder leur conformation native pour préserver leur activité biologique. Une bonne séparation, dans le cas des biomolécules, ne signifie pas seulement une résolution complète de tous les solutés en un minimum de temps mais aussi la préservation de l'activité biologique.

Ainsi, la matrice idéale pour la Bio-Chromatographie Liquide Haute Performance doit donc posséder un certain nombre de caractéristiques, énumérées ci-dessous (5, 6) :

- **Stabilité mécanique** : la phase stationnaire doit être constituée de particules, insolubles et rigides pour résister aux pressions élevées exercées en CLHP.
- **Stabilité et inertie chimiques** : le support ne doit pas être dégradé en présence de solvants utilisés pour la chromatographie ni provoquer la dénaturation des composés biologiques à séparer.
- **Caractère hydrophile** : ce matériau doit être non ou peu adsorbant vis-à-vis des biopolymères.
- **Structure définie** : les particules constituant le support chromatographique doivent posséder une géométrie, une granulométrie et une porosité bien définies afin d'obtenir de bonnes performances chromatographiques (efficacité, résolution, capacité ...).
- Les supports doivent être **chimiquement modifiables**, en vue de fonctionnalisations ultérieures pour des utilisations dans les divers modes de chromatographie.
- Et enfin, les supports doivent être **régénérables, stérilisables et leur synthèse reproductible**.

De nombreux polymères d'origine naturelle (organique ou minérale), ou synthétique sont utilisés comme supports pour la bio-chromatographie (7, 8) :

A la fin des années 50, des polysaccharides tels que la cellulose, l'agarose, les dextrans réticulés constituaient la majorité des matrices chromatographiques. Néanmoins, leur résistance mécanique faible limite considérablement leur utilisation en CLHP. Ces gels organiques ont été progressivement supplantés par des supports inorganiques. Des particules de silice macroporeuses ont été introduites au début des années 70. Des microparticules de silice non poreuses (1-5 μm) ont également été introduites dès le début des années 80, et dès lors des séparations rapides ont été possibles.

A la fin des années 70, quelques résines organiques ont été préparées et testées en Bio-Chromatographie Haute Performance. Les progrès continus dans les procédés de polymérisation en suspension et en émulsion ont favorisé la production de particules présentant une grande rigidité et des caractéristiques granulométriques bien définies.

Parallèlement, d'autres supports minéraux se sont développés tels que les oxydes d'alumine, de zircon et de titane (9, 10)...

A l'heure actuelle, la plupart des supports disponibles pour effectuer la séparation des protéines sont à base de silice capable de supporter des pressions élevées. Ces supports connaissent un impact énorme dans le domaine des bio-séparations. En effet, de très nombreuses phases commerciales de silice existent et diffèrent par leurs caractéristiques granulométriques (taille et distribution de taille), structurales (taille des pores, surface spécifique, volume poreux). Néanmoins, la silice présente certains inconvénients majeurs parmi lesquels on peut citer une aptitude à adsorber irréversiblement certaines protéines par le biais d'interactions ioniques ou

liaisons hydrogène (11) et surtout une instabilité dans les milieux aqueux légèrement alcalins ($\text{pH} > 8$) (12) (dissolution progressive par ionisation de l'acide silicique).

Parmi les matériaux chromatographiques actuellement en développement, le polystyrène réticulé par le divinylbenzène (PS-DVB) occupe une place importante. Ce matériau a l'avantage d'être une matrice organique très stable en milieu aqueux. Comparativement à la silice, il présente l'avantage d'être résistant aux agressions chimiques (pH acide ou basique, solvants organiques). Cependant, il n'est pas directement compatible avec les solutions aqueuses de protéines en raison de son caractère hydrophobe marqué. De ce fait, son utilisation a longtemps été limitée à la chromatographie en phase inverse (13, 14).

Le tableau I-1 compare certaines propriétés physico-chimiques des phases de silice et de polystyrène.

Phase	Propriétés	Conséquences	Remède
SILICE	Bonne tenue mécanique	Utilisable en CLHP	Masquage des silanols
	Stabilité chimique $2 < \text{pH} < 8$	Non stérilisable par la soude	
	Présence de silanols et silanolates	Adsorption de protéines par interactions ioniques ou hydrogène	
PS-DVB	Bonne tenue mécanique	Utilisable en CLHP	Hydrophilisation du polystyrène
	Stabilité chimique $1 < \text{pH} < 14$	Stérilisable par la soude	
	Matériau hydrophobe	Adsorption de protéines par interaction hydrophobe	

Tableau I.1 : Comparaison des phases de silice et de PS-DVB

Qu'il s'agisse de silice ou de polystyrène, il apparaît donc nécessaire de modifier la surface de ces matériaux. En ce qui concerne le travail présenté, nous avons choisi d'utiliser le polystyrène comme matériau de base pour l'élaboration de supports destinés à la bio-chromatographie et nous nous proposons de décrire, dans un premier temps, les procédés de fabrication de particules de polystyrène-divinylbenzène utilisables en CLHP. Puis nous montrerons les possibilités de modifications de ces particules.

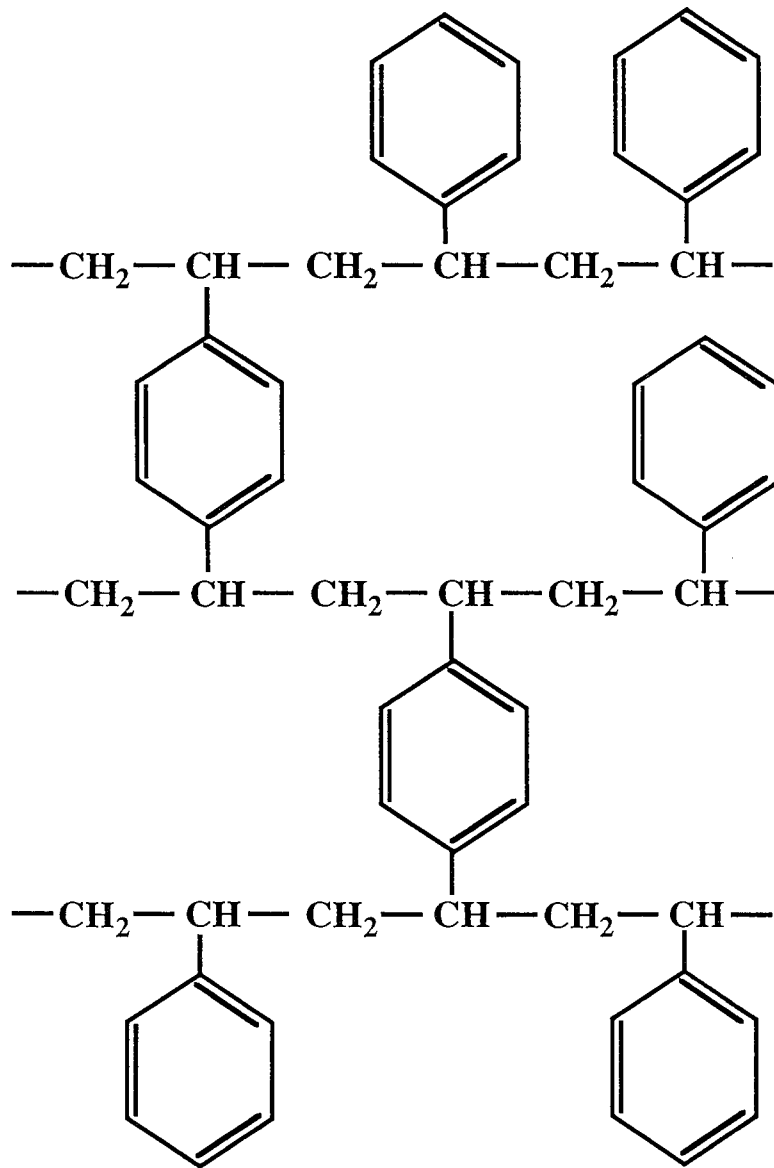


Figure I.1: Structure générale du polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB)

2 - PARTICULES DE POLYSTYRÈNE

Depuis une trentaine d'années, les particules polymères (polystyrène, polyacrylamide, polyméthacrylate, etc...) connaissent un développement considérable tant en ce qui concerne leurs procédés de fabrication que leurs applications potentielles. Parmi elles, les particules polystyréniques occupent une place importante notamment dans les domaines biomédicaux et biotechnologiques.

Les phases polystyréniques, initialement introduites par Moore (17) en 1964, proviennent essentiellement de la copolymérisation du styrène (S) et du divinylbenzène (DVB) en suspension (huile/eau). Le taux de DVB incorporé joue un rôle important tant sur la rigidité du matériau que sur sa porosité. La figure I.1 montre la structure générale du PS-DVB.

De nombreux procédés de fabrication de particules polymères ont été décrits et font appel le plus souvent à des polymérisations radicalaires conventionnelles en émulsion ou en suspension. Néanmoins, la préparation de particules sphériques, monodisperses (dans la gamme 1 à 20 μm) requiert un certain nombre de modifications des procédés classiquement utilisés.

2-1 LES PROCÉDÉS CLASSIQUES

Les procédés de polymérisation en suspension, en émulsion, en dispersion..., sont anciens (15, 16) mais font toujours l'objet de nombreuses modifications visant à améliorer les caractéristiques physiques des particules préparées (taille, porosité...).

D'une manière générale, les procédés décrits ci-dessous concernent la copolymérisation radicalaire du styrène et du divinylbenzène dans des milieux dispersés.

2-1-1 Procédé en suspension

Dans ce procédé, le(s) monomère(s) insoluble(s) dans l'eau sont dispersés en gouttelettes de 10 μm à 5 mm par agitation rapide dans une phase aqueuse. Un agent stabilisateur est ajouté dans le milieu. L'amorceur organosoluble (en général le 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) ou le peroxyde de benzoyle) est introduit dans les gouttes de monomère. Le monomère en suspension est polymérisé par voie radicalaire à une température comprise entre 80 et 110°C. La polymérisation se déroule à l'intérieur même des gouttelettes de monomère assurant le rôle de micro-réacteur.

Les suspensions sont stabilisées avec des additifs qui empêchent la coalescence des particules en formant un film à l'interface huile/eau. Les additifs utilisés sont essentiellement des polymères hydrosolubles tels que des polysaccharides, des celluloses modifiées et surtout des copolymères alcool vinylique-acétate de vinyle. Ces additifs hydrosolubles sont communément

appelés **colloïdes protecteurs**. Des composés inorganiques finement divisés comme des talcs, carbonates, silicates, phosphates de calcium ou de magnésium peuvent être également utilisés. Pour faciliter la dispersion de certains agents inorganiques, on ajoute des tensio-actifs mais en faible concentration pour éviter la formation d'une émulsion.

A la fin de la réaction, le copolymère PS-DVB se trouve sous forme de "perles" sphériques, le polymère et le monomère étant solubles l'un dans l'autre. Néanmoins, la taille des particules est relativement élevée ($> 20 \mu\text{m}$) et présente une large distribution en taille. Ce phénomène dépend de plusieurs paramètres. En particulier, une vitesse d'agitation élevée et une augmentation de la viscosité du milieu dispersant (par addition d'un stabilisant hydrosoluble) peuvent accroître la finesse de la dispersion.

De nombreux auteurs décrivent et/ou utilisent le procédé en suspension pour préparer des perles sphériques de polystyrène réticulé, utilisables en chromatographie liquide (13, 14, 17, 18, 19).

2-1-2 Procédé en émulsion

La copolymérisation du styrène et du divinylbenzène peut être réalisée par le procédé en émulsion. Les monomères (styrène et divinylbenzène) très peu solubles dans l'eau, sont émulsionnés en présence de **tensio-actifs** tels que le laurate de potassium.

L'amorceur, est nécessairement soluble dans la phase aqueuse (persulfate de sodium), dans laquelle se déroule la polymérisation. Le milieu initial est, constitué principalement de micelles d'agent émulsifiant et de gouttelettes de monomères.

Le processus de la polymérisation en émulsion se décompose en trois périodes :

La première période est appelée période de germination. Il y a amorçage de la polymérisation lorsqu'un radical est capté spécifiquement par une micelle (qui possède une surface spécifique plus grande que celle des gouttelettes de monomères), laquelle contient une quantité minimale de monomère dissous dans sa partie organophile. La polymérisation s'y poursuit avec du monomère provenant des gouttelettes et transféré par diffusion via la phase aqueuse. De telles micelles se transforment progressivement en particules de latex.

La germination se termine lorsque toutes les molécules de tensio-actif ont été captées par les particules de latex. Le milieu est alors constitué principalement par les particules de latex qui contiennent tout le polymère déjà formé, gonflé par du monomère et des gouttelettes de monomère qui servent de réservoir.

Dans la deuxième période dite stationnaire, la polymérisation se déroule à vitesse constante en utilisant le monomère stocké à l'intérieur des particules de latex. Le monomère contenu dans les gouttelettes continue de diffuser vers les particules en formation. Cette période prend fin lorsque les gouttelettes de monomère ont disparu. La taille des particules augmente mais leur nombre reste constant.

Enfin, la troisième période correspond à l'épuisement progressif du monomère dissous dans les particules de polymère.

Ce procédé conduit essentiellement à l'obtention de particules de latex **submicroniques, de distribution de taille très étroite et sphériques** (si la concentration en tensio-actif est faible de 1 à 2 %). Ces particules ont donc une taille trop faible pour être utilisables comme support chromatographique.

2-1-3 Procédé en dispersion

Ce procédé a été introduit par Barrett en 1973 (20) pour préparer des particules de polyméthacrylate en milieu organique. Il a été ensuite utilisé pour obtenir des particules de polystyrène dans des milieux alcooliques. A la différence des procédés en suspension et en émulsion, le milieu réactionnel est initialement homogène, le monomère et l'amorceur (en général l'AIBN) sont solubles dans le milieu. A mesure que la polymérisation progresse, le polymère formé précipite sous forme de particules en présence d'agents stabilisants (alcool polyvinylique, polyvinylpyrrolidone...). Ce procédé de polymérisation par précipitation n'est pas développé industriellement mais fait l'objet de nombreuses recherches. En particulier, l'utilisation de milieux mixtes hydro-alcooliques (variation de la polarité du milieu) conduit à l'obtention de particules finales sphériques, monodisperses et de taille comprise entre 1 et 5 μm (21, 22).

Les particules de polystyrène, produites par ce procédé, ne sont pas adaptées pour une utilisation en chromatographie liquide, compte-tenu du faible taux de DVB incorporé.

2-2 AUTRES PROCÉDÉS

L'enjeu permanent depuis les années 80 est de concevoir des particules sphériques dont les caractéristiques recherchées sont les suivantes :

- une taille de particules comprise entre 1 et 20 μm (amélioration de l'efficacité)
- une distribution de taille étroite (réduction du volume interstitiel des colonnes)
- une grande rigidité mécanique (utilisation sous pression élevée)
- une porosité rigoureusement contrôlée

En ce sens, le procédé développé par Ugelstad et coll. (23) permet l'obtention de particules qui répondent davantage aux critères requis pour la Chromatographie Liquide Haute Performance. Nous verrons également quelques développements récents dans la conception des colonnes chromatographiques.

2-2-1 Description du procédé développé par Ugelstad

Cette méthode (23, 24), telle qu'elle a été décrite à l'origine pour le polystyrène comporte deux étapes :

1^{ère} étape : la formation d'un latex de polystyrène est réalisée par une polymérisation en émulsion conventionnelle suivie d'un gonflement des **germes** de latex en présence d'espèces faiblement solubles dans l'eau.

2^{ème} étape : la copolymérisation du styrène et du divinylbenzène est réalisée à partir des germes à l'état gonflé. Les monomères (et l'amorceur organosoluble) faiblement solubles dans l'eau sont ajoutés au milieu et diffusent à l'intérieur du germe dans lequel la polymérisation se déroule. Cette étape permet le grossissement des particules et leur réticulation.

L'originalité de ce procédé repose sur l'activation des latex primaires ou germes par un processus de gonflement. Les germes sont convertis en particules finales. La sphéricité et la monodispersité en taille de particules sont conservées durant la post-polymérisation. Celle-ci permet la fabrication de particules de taille supérieure au micromètre. L'obtention de la porosité repose sur l'utilisation de solvants organiques comme porogènes. Les particules seront microporeuses ou macroporeuses si le diluant utilisé est respectivement un bon et un non-solvant du polystyrène. Par ailleurs, la porosité dépend également de la quantité de DVB incorporée (domaine des micro-mésopores).

2-2-2 Les tendances actuelles

Le concept instauré par Ugelstad et coll. a donné naissance à de nombreux procédés dérivés.

Les travaux de Kim et coll. publiés en 1988 en sont un premier exemple (25). Des copolymérisations successives des deux co-monomères (styrène, divinylbenzène) en suspension autour de particules préformées ou germes permettent de préparer des particules de PS-DVB de taille et de rigidité désirées (l'appellation anglaise de ce procédé est "successive seeded polymerization"). Néanmoins, ce procédé requiert un minimum de cinq polymérisations pour atteindre une taille particulaire comprise entre 1 et 10 μm .

Le procédé d'Ugelstad et coll. a également été amélioré (26). Cette fois-ci, les germes sont gonflés en présence d'un oligomère totalement insoluble dans l'eau. La présence de cet oligomère accroît la capacité de gonflement des germes. La polymérisation en suspension démarre quand tous les ingrédients nécessaires sont introduits dans les particules à l'état hautement gonflé. Ce procédé est appelé méthode de gonflement activé (de l'anglais "activated swelling method"). Cette méthode est particulièrement adaptée à la préparation de microsphères de PS-DVB réticulées.

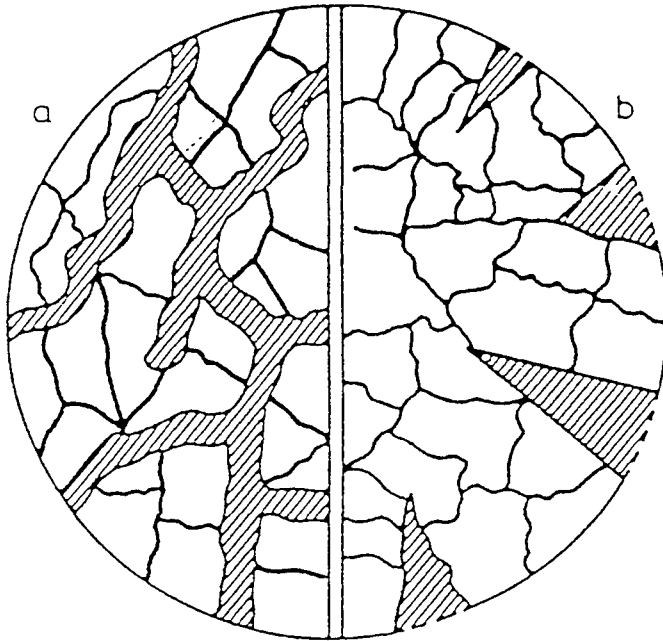


Figure I.2 : Structures possibles des gigapores (ou ultra-macropores) :
(a) Pores interconnectés, perfusifs et porosité conventionnelle
(b) Pores superficiels

Les nouvelles approches de préparation de billes de PS-DVB reposent toutes sur la formation préalable de germes ou pré-particules à l'état gonflé. Mais une attention particulière est accordée à la porosité des matériaux finaux (création d'une macroporosité et d'une distribution poreuse étroite). Les travaux les plus récents décrivent l'utilisation combinée d'un porogène polymère et de diluants. Parmi eux se distinguent les travaux de Cheng et coll. (27, 28) (procédé en émulsion) et ceux de Fréchet et coll. (29, 30, 31) (procédé en suspension). Notons que le procédé décrit par Fréchet et coll. permet la fabrication de particules de PS-DVB hautement réticulées (contenant jusqu' à 90 % en volume de DVB).

Des travaux récents visant à augmenter le transfert de masse en phase mobile stagnante consistent à préparer des matériaux présentant des pores de très grandes dimensions (gigapores ou ultra-macropores).

Dans le cas où les particules toutes entières sont traversées par des pores, les solutés migrent à l'intérieur des particules du support par un mécanisme de convection rapide appelée "**perfusion**" plutôt que par diffusion. Tel est le cas du support commercial POROS (32, 33) qui présente à la fois des gigapores (6000 Å) interconnectés et une porosité conventionnelle (pores de taille plus petite et peu profonds). La figure I.2 représente les structures possibles des gigapores interconnectés ou non (3).

La réduction du volume interparticulaire des supports chromatographiques est aussi particulièrement recherchée pour améliorer l'efficacité des colonnes. La préparation de particules sphériques et monodisperses, aujourd'hui acquise, favorise déjà un bon remplissage des colonnes.

Une approche particulièrement intéressante a été reportée par Fréchet et coll. (29, 34). Leurs travaux reposent sur la conception de supports macroporeux et "continus" (non particulaires). Tous les composés nécessaires à la copolymérisation radicalaire du styrène et du divinylbenzène sont confinés dans une colonne et la réaction s'effectue in situ. Ce concept donne naissance à des supports chromatographiques exempts de volume interstitiel. Le matériau final est constitué d'une particule unique macroporeuse de forme cylindrique (assimilée à une membrane chromatographique) dont les dimensions sont imposées par celles de la colonne (le terme anglais de cette nouvelle structure est "polymer rod"). Les séparations des solutés sont ultra-rapides et s'effectuent selon un mécanisme de convection rapide analogue à la "perfusion".

Finalement, les recherches visant à développer des nouveaux supports destinés à la chromatographie liquide sont particulièrement intensives, notamment dans le domaine des matériaux polymères. Des supports à base de PS-DVB particulièrement originaux tels que les matériaux perfusifs ont été développés et commercialisés.

3 - PARTICULES DE POLYSTYRÈNE HYDROPHILISÉES

Les supports à base de PS-DVB ne sont pas utilisables directement pour la chromatographie des protéines, dans des conditions non-dénaturantes. Leur utilisation requiert donc au préalable une modification de leur surface.

L'**hydrophilisation**, et par extension la **fonctionnalisation** des surfaces polystyréniques, est envisagée par diverses approches. L'idée de base est, dans tous les cas, la réduction de l'adsorption non-spécifique des protéines sur ces matériaux.

De nombreux auteurs ont préparé des matrices de nature polystyrénique plus facilement modifiables que celles des particules de PS-DVB. De telles matrices peuvent être obtenues par :

- copolymérisation du styrène et/ou du divinylbenzène en présence d'un autre comonomère (lui-même hydrophile ou fonctionnalisable) par les procédés précédemment décrits,
- modification de la matrice de PS-DVB par fixation de groupes hydrophiles et/ou fonctionnels,

Le caractère hydrophobe du polystyrène peut être masqué par la présence d'une couche hydrophile à sa surface. L'obtention d'une couche hydrophile peut être réalisée de différentes façons :

- fixation covalente d'un polymère hydrophile,
- adsorption physique d'un monomère (ou oligomère) suivie d'une polymérisation in situ,
- adsorption d'un polymère hydrophobe/hydrophile.

Ces dernières modifications apportées aux particules de polystyrène donnent naissance à des matériaux dits composites.

3-1 COPOLYMÉRISATIONS DE DÉRIVÉS STYRÉNIQUES

La modification chimique des particules de PS-DVB est souvent difficile à réaliser car le PS-DVB ne présente pas de groupes facilement modifiables. De ce fait, certains auteurs ont préféré préparer des particules polystyréniques en utilisant un monomère plus réactif que le styrène, monomère commercialisé ou préparé à l'échelle de laboratoire. En particulier, le chloro-méthylstyrène est souvent substitué au styrène car plus facilement modifiable ultérieurement.

Des billes monodisperses de poly(chloro-méthylstyrène-co-divinylbenzène) sont commercialisées et ouvrent de nombreuses possibilités de substitution nucléophile.

Des particules poreuses de poly(4-hydroxystyrène-co-divinylbenzène) appelé plus simplement poly(vinylphénol), sont préparées par copolymérisation du 4-t-butoxycarboxystyrène et du DVB (35). Le traitement thermique de ces particules permet de libérer les nombreuses fonctions hydroxyles.

Un autre monomère du type 2,3-époxypropyl vinylbenzyl éther a été copolymérisé avec le DVB. Les fonctions époxy peuvent être hydrolysées (36). Dans ce cas, le matériau, bien que possédant de nombreux groupes hydroxyles, reste hydrophobe.

Dans ces deux derniers exemples, l'obtention de fonctions hydroxyles permet d'envisager la fixation de groupes ou polymères hydrophiles afin d'augmenter le caractère hydrophile de ces nouveaux matériaux. Néanmoins, leur applications bio-chromatographiques restent limitées actuellement au mode phase inverse.

3-2 FIXATION DE GROUPES HYDROPHILES ET/OU IONIQUES DANS LA MATRICE

Des particules de PS-DVB (ou de poly(méthyl-styrène-co-divinylbenzène) ont été activées par réaction au chlorure de sulfuryle (SO_2Cl_2). Des groupements chloro-méthyles ainsi introduits sur le polystyrène permettent donc d'envisager de nombreuses modifications. Nous ne mentionnerons que quelques exemples. L'oxydation des particules de poly(chloro-méthyl-styrène-co-divinylbenzène) en présence de permanganate de potassium ou de bichromate de sodium conduit à la préparation de supports chromatographiques échangeurs faibles de cations (fonctions carboxylates), de très haute capacité (37). L'introduction d'autres groupes chargés tels que des phosphates a également été décrite, après chlorométhylation du PS-DVB (38).

Parmi les matériaux chargés, le polystyrène-divinylbenzène sulfonate est couramment utilisé et peut s'obtenir directement à partir du PS-DVB par un traitement à l'acide chloro-sulfonique (39). Les particules polystyréniques fonctionnalisées par des groupes chargés tels que phosphates et sulfonates sont couramment employées comme échangeurs fort de cations.

Des supports chromatographiques continus (polymer rod) constitués de poly(chloro-méthyl-styrène-co-divinylbenzène) ont été modifiés par couplage d'une lactone par l'intermédiaire d'une diamine (40). De tels matériaux présentent un caractère hydrophile suffisant pour obtenir des éluions quasi-quantitatives de certaines protéines. En particulier, l'albumine de sérum humain est élue à 75 % (tampon phosphate 0,1M + NaCl 0,5M, pH 7) sur ce support.

Le polystyrène-divinylbenzène peut être modifié par introduction de groupes hydrophiles non chargés, tels que des groupes hydroxyméthyles ou acétyles. Par exemple, la fixation chimique de groupes acétyles est réalisée par réaction de Friedel et Crafts (41) avec le chlorure d'acétyle.

Les exemples de matériaux cités ici présentent cependant, dans un grand nombre de cas, un caractère hydrophobe important malgré l'introduction de groupes ioniques ou hydrophiles. Des supports échangeurs d'ions, compatibles avec les protéines ont été testés. Dans la plupart des cas, les biomolécules sont séparées par un mécanisme qui combine à la fois les chromatographies hydrophobe et d'échange d'ions.

3-3 MATÉRIAUX COMPOSITES

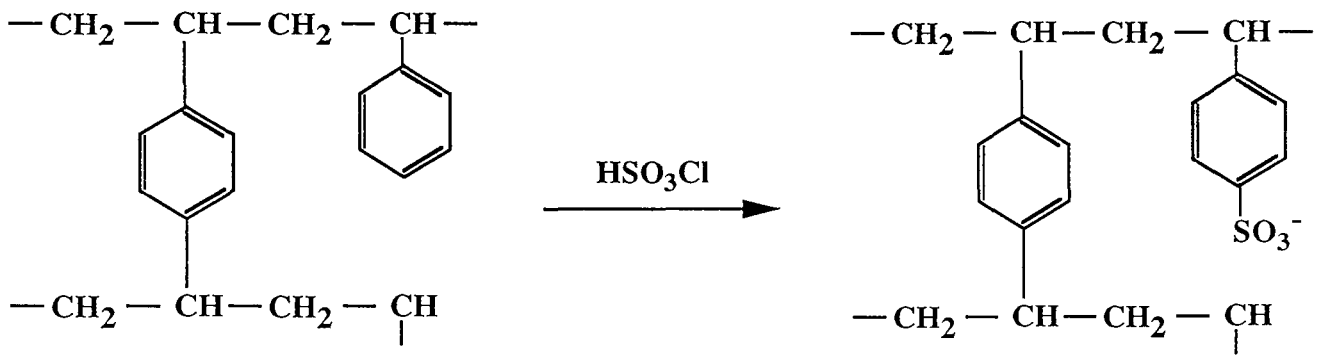
Par analogie avec les travaux réalisés sur les phases de silice utilisables en biochromatographie, de très nombreux matériaux polystyréniques **composites** ont été mis au point durant les dix dernières années. Nous avons volontairement choisi cette appellation, pour décrire les matériaux constitués d'au moins deux composantes différentes ; la matrice de base est modifiée par fixation covalente ou adsorption de polymères hydrophiles. De telles modifications conduisent de toute évidence à la formation d'une couche hydrophile à la surface du matériau. La couche formée est fonctionnalisable dans une étape ultérieure. Ce paragraphe n'a pour ambition que de présenter quelques matériaux composites potentiellement utilisables en biotechnologie.

3-3-1 Fixation de polymères hydrophiles

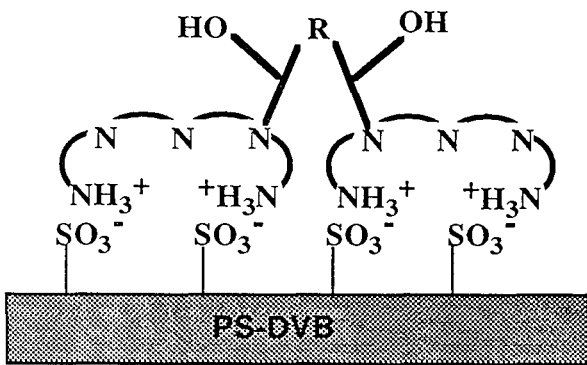
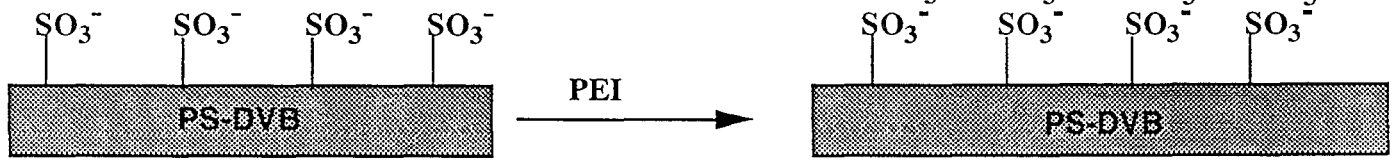
Ellingsen et coll. ont fixé chimiquement un polymère hydrophile (non précisé) sur le PS-DVB après une hydroxyméthylation préalable du matériau (42). La surface résultante présente une couche hydrophile, laquelle est aisément fonctionnalisée par introduction de groupes ioniques (sulfate ou ammonium). Ce matériau possède un léger caractère hydrophobe, l'élution quantitative de protéines n'est réalisée qu'en présence de solvant organique dans l'éluant (phase inverse).

D'autres auteurs ont hydrophilisé des latex de polystyrène par fixation covalente de poly(éthylène oxyde) et de dextrane (43). La fixation de ces polymères biocompatibles sur le polystyrène nécessite un certain nombre d'étapes préalables (modifications respectives du polystyrène et des polymères pour faciliter leur fixation). Dans un premier temps, l'amination du polystyrène est réalisée en deux étapes : oxydation du polystyrène en présence de permanganate de potassium et d'acide sulfurique conduisant à un polystyrène chargé négativement, puis adsorption de polyéthylèneimine. Les polymères hydrophiles peuvent être chimiquement modifiés sur un motif monomère terminal de façon à les coupler à la surface par un seul site (end-on). Le dextrane est également modifié par introduction de fonctions aldéhydiques réparties statistiquement le long de la chaîne macromoléculaire. Dans ce cas, la fixation d'une chaîne de polymère sur la surface s'effectue par de nombreux sites de fixation (side-on) ainsi que le représente la figure I.3.

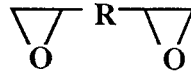
Etape n°1 : Fabrication de PS-DVB sulfonate



Etape n°2 : Adsorption de polyéthylèneimine (PEI)



Etape n°3 : Réticulation chimique



Etape n°4 : Quaternisation

CH_3I
 1,2,6,6-pentaméthylpiperidine

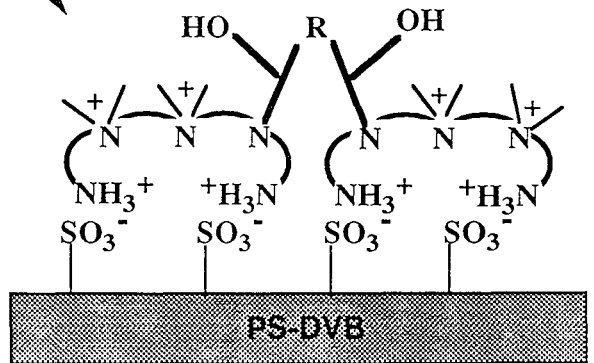


Figure I.4 : Représentation schématique de la préparation d'un support chromatographique à base de polystyrène sulfonate utilisable en chromatographie d'échange fort d'anions des protéines (d'après la référence 39).

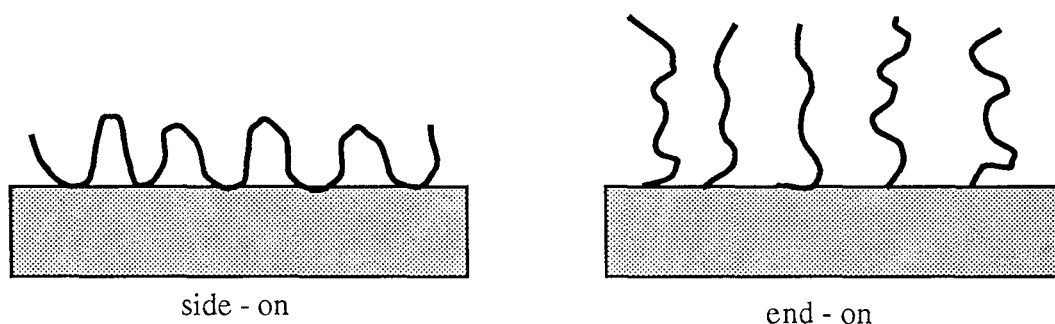


Figure I.3 : Différents modes de fixation covalente de polymères sur une surface

L'influence du mode de recouvrement sur l'efficacité de l'hydrophilisation des particules joue un rôle déterminant. En effet, le dextrane fixé en mode side-on forme une couche moins perméable aux protéines que celle formée par ce même polymère fixé en mode end-on. L'intérêt que revêt cet exemple est l'utilisation de polymères biocompatibles, qui sont de surcroît, facilement fonctionnalisables. Néanmoins, ce procédé comporte de très nombreuses étapes de modification chimique.

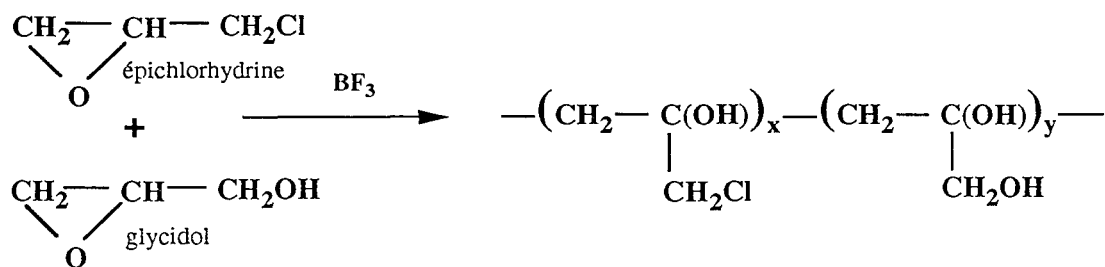
3-3-2 Adsorption de polymères et/ou de monomères

Un des procédés d'hydrophilisation de matériaux polystyréniques les plus couramment rencontrés repose sur l'adsorption de polymères sur leur surface. Sur le plan pratique, ce procédé présente la plus grande facilité de mise en oeuvre puisqu'il s'agit d'une mise en contact d'une surface avec un polymère en solution.

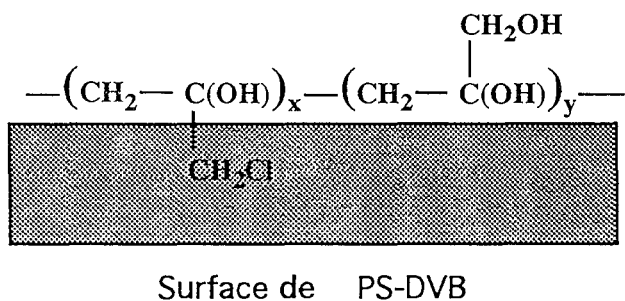
3-3-2-1 Adsorption de polymères sur une surface polystyrénique chargée

Les particules de polystyrène-divinylbenzène modifiées, en particulier, par introduction de groupes sulfonates sont couramment utilisées en chromatographie d'échange de cations de divers composés. Néanmoins, elles conservent un caractère hydrophobe limitant leur utilisation en bio-chromatographie. De telles particules peuvent alors être hydrophilisées par adsorption d'un polymère chargé positivement. La figure I.4 décrit un exemple de préparation d'un support chromatographique à base de polystyrène-sulfonate hydrophilisé par adsorption de polyéthylèneimine (39). La couche de polymère, adsorbée par le biais d'interactions ioniques, est réticulée chimiquement pour augmenter sa stabilité chimique puis la polyéthylèneimine est quaternisée. Finalement, la couche externe, hydrophile et fonctionnalisée, confère au matériau final un caractère échangeur fort d'anions utilisable pour la séparation des protéines.

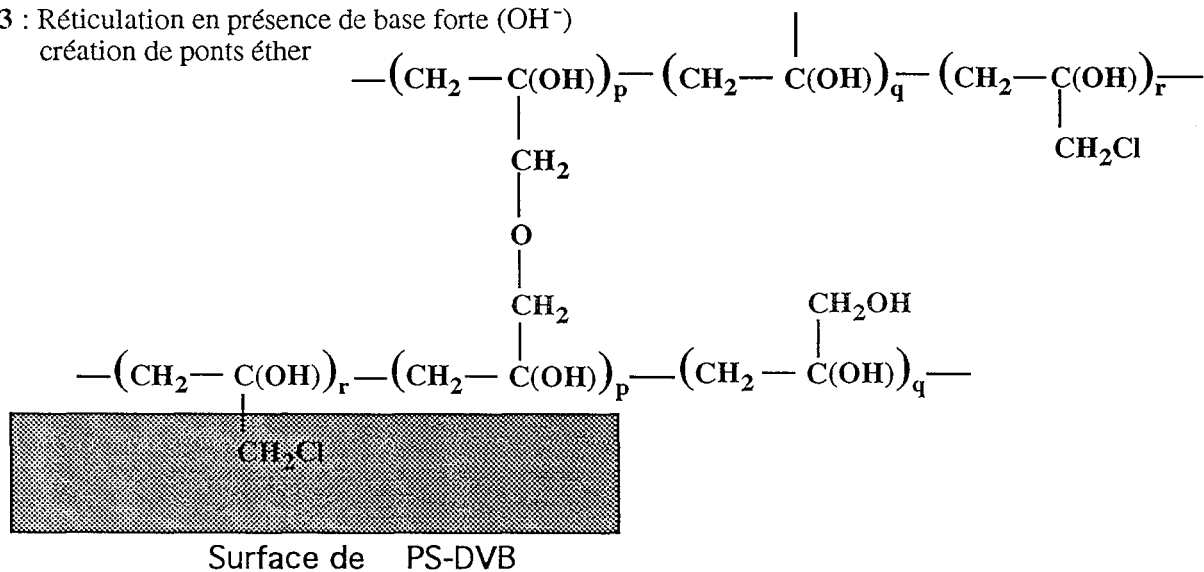
Etape n°1 : Préparation d'un oligomère



Etape n°2 : Adsorption de l'oligomère



Etape n°3 : Réticulation en présence de base forte (OH⁻)
création de ponts éther



Etape n°4 : Fonctionnalisation du support par réaction de substitution nucléophile sur les fonctions chlores

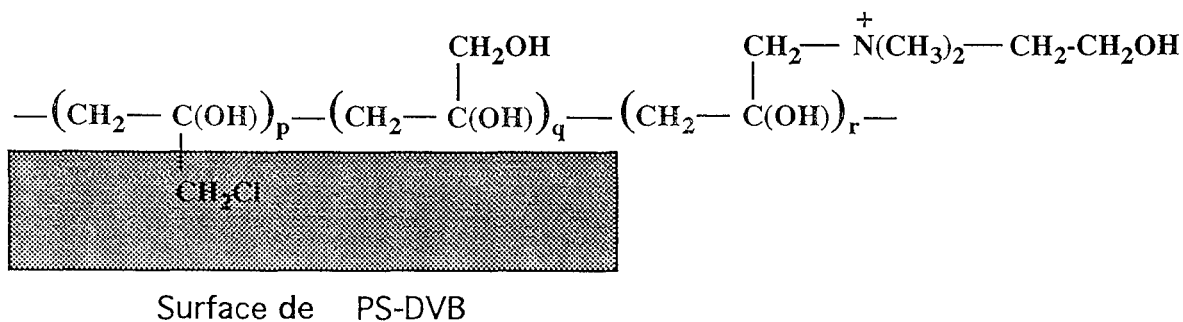


Figure I.5 : Hydrophilisation de billes de PS-DVB par un polyglycérol puis fonctionnalisation (échangeur fort d'anions). Schéma adapté d'après les références (44, 45).

3-3-2-2 Adsorption d'un monomère suivie d'une polymérisation in situ

L'hydrophilisation de particules peut être réalisée par **adsorption** et/ou **précipitation** de comonomères organiques suivie de leur polymérisation à la surface du matériau (44, 45). Les monomères utilisés sont des époxydes de grande réactivité (épichlorhydrine, épibromhydrine), ou des méthacrylates, associés au glycidol plus hydrophile. Ils sont déposés sur le PS-DVB sous forme de monomères ou de macromonomères.

La figure I.5 présente le schéma réactionnel qui conduit à la formation d'une couche hydrophile et stable aisément fonctionnalisable : les groupes halogènes s'orientent préférentiellement vers la surface, alors que les groupes hydroxyles s'orientent vers la solution. Un traitement par une base forte permet la création de ponts éther stables. Enfin, la fonctionnalisation de la couche hydrophile formée est possible à partir des fonctions halogènes non-adsorbées. Des séparations chromatographiques de protéines ont été réalisées, en particulier en échange faible de cations et en chromatographie d'affinité de la lectine. Cette méthode originale de recouvrement a été appliquée à de nombreux supports commerciaux tels que le PLRP-S, le Rogel (RSL-Alltech Europe Eke, Belgique) ou encore le RH-168 (Rohm & Haas, Philadelphie, États-Unis). De nombreuses fonctionnalisations ont été entreprises (ou envisagées) dont les détails sont mentionnés dans un brevet (45).

3-3-2-3 Adsorption de polymères hydrophiles/hydrophobes sur des surfaces neutres

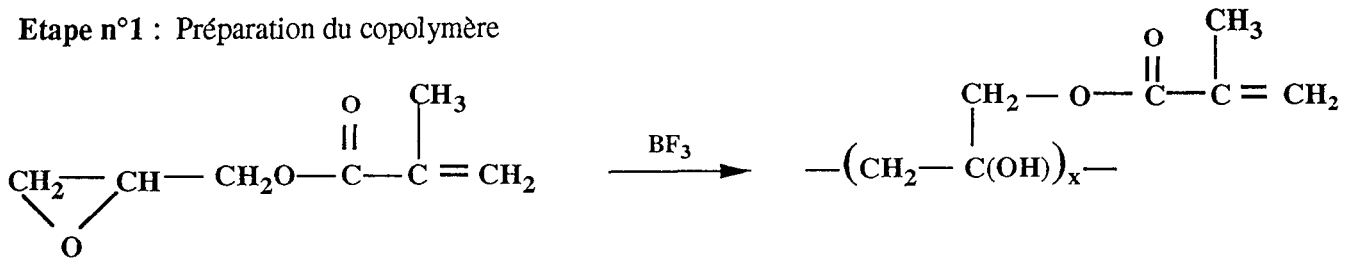
Sur des surfaces hydrophobes dépourvues de charges, les polymères peuvent s'y adsorber par le biais d'interactions hydrophobes. Les polymères très hydrophiles ne s'adsorbent pas ou peu sur des surfaces hydrophobes.

De nombreux travaux décrivent l'adsorption sur du polystyrène, de polymères tels que l'alcool polyvinylique (46, 47), l'hydroxyéthyl-cellulose (48). Ces polymères sont à la fois hydrophiles et hydrophobes de par leur nature et sont donc capables de s'adsorber sur ce matériau.

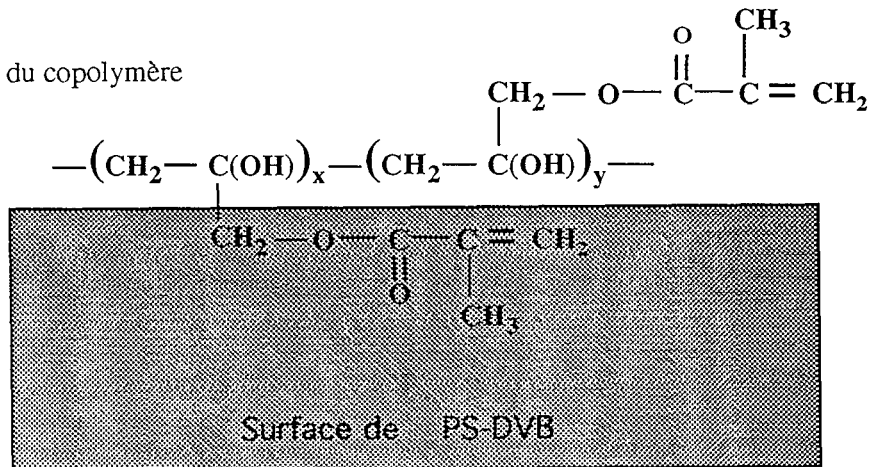
La **balance hydrophile/hydrophobe** d'un polymère (et donc son affinité pour une surface hydrophobe) peut être contrôlée par copolymérisation de monomères d'hydrophilie différente. Par exemple, des copolymères blocs à base d'oxyde d'éthylène et de propylène s'adsorbent davantage sur le polystyrène que le poly(éthylène oxyde) seul (49). Ce dernier est souvent utilisé pour modifier des surfaces hydrophobes, à des fins biomédicales, en raison de son caractère hydrophile et de sa biocompatibilité.

L'hydrophilisation peut également être effectuée par adsorption de polymères amphiphiles et hydrosolubles. De tels polymères peuvent être préparés par fixation de groupements

Etape n°1 : Préparation du copolymère



Etape n°2 : Adsorption du copolymère



Etape n°3 : Polymérisation de l'acide méthacrylique à la surface du matériau

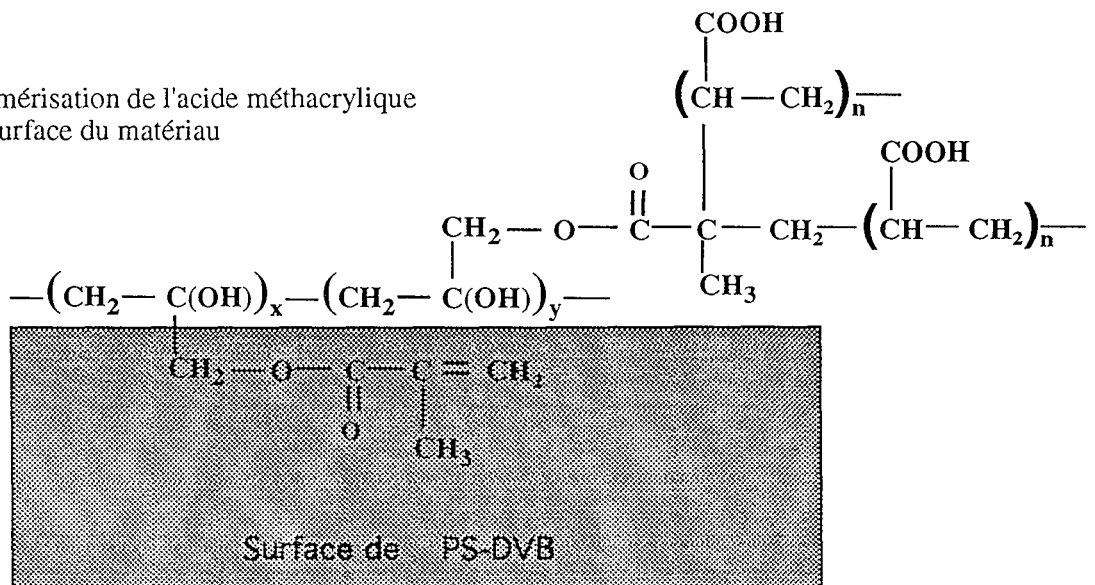


Figure I.6: Adsorption de copolymères suivie d'une polymérisation à la surface des billes. Schéma adapté d'après les références (45, 51).

hydrophobes sur un squelette hydrophile (50). Le caractère amphiphile du polymère dépend de la nature des greffons et de leur concentration sur le polymère.

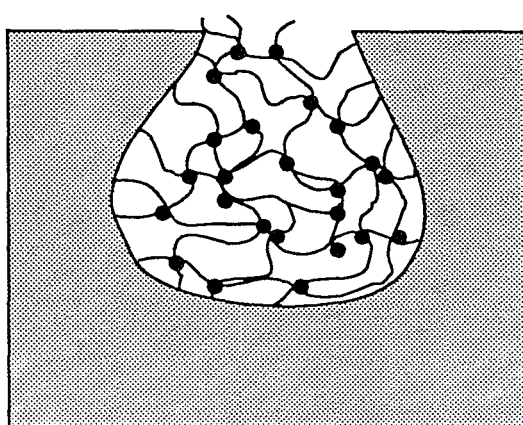
Une autre famille de copolymères amphiphiles de faible masse molaire a été utilisée pour hydrophiliser des matériaux polymères à usage bio-chromatographique. Il s'agit de copolymères amphiphiles de polyglycidol-méthacrylate (45, 51). Les motifs méthacrylates (les plus hydrophobes) s'adsorbent sur la surface. Une polymérisation subséquente de l'acide méthacrylique permet la formation d'une couche stable, hydrophile possédant des fonctions acides carboxyliques comme le montre le schéma de la figure I.6. Des séparations chromatographiques de protéines ont par ailleurs été obtenues sur le support commercial POROS R (PerSeptive Biosystems, Cambridge, États-Unis) préparé selon ce procédé.

3-3-3 Matériaux à pores composites

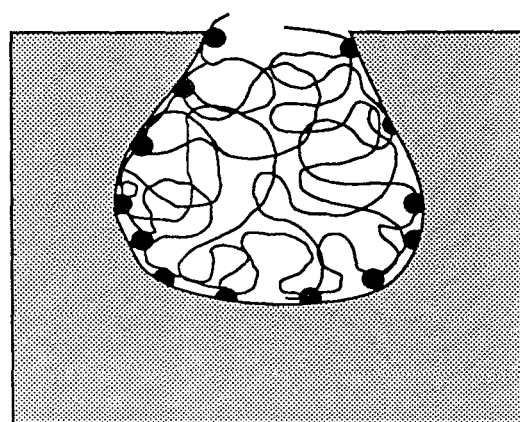
Une dernière catégorie de supports composites a été récemment mentionnée.

Ces supports sont constitués d'un squelette rigide macroporeux (polystyrène-divinylbenzène, silice, polyméthacrylate) (52). Les macropores sont remplis d'un polymère qui forme un réseau flexible. Les polymères choisis pour ce type de matériaux sont typiquement des xérogels à base de dextrane ou de polyacrylamide. Les pores formés à l'intérieur de ces xérogels déposés dans les macropores sont homogènes en raison des propriétés de gonflement de ces gels dans l'eau. Les divers procédés jusqu'alors utilisés pour remplir les macropores consistent :

- à remplir les pores par le xérogel puis à le réticuler pour former un réseau relativement lâche (figure I.7 cas a),
- à fixer le xérogel de façon covalente (figure I.7 cas b).



Cas a
présence de xérogel dans les pores
+ réticulation des chaînes (●)



cas b
Fixation du xérogel
(●) représente les points d'ancrage
sur la surface

Figure I.7 : Représentation de la structure des "matériaux à pores composites "

L'utilisation de tels matériaux pose un certain nombre de problèmes dont le principal est lié à la diffusion des protéines au travers du réseau formé par le polymère flexible, ces protéines sont susceptibles d'interagir de façon non-spécifique avec le squelette rigide. Ces interactions sont particulièrement gênantes pour des applications en chromatographie d'exclusion stérique mais peuvent être supprimées par une passivation préalable de la surface.

Des supports composites ont été préparés à partir de particules rigides d'origine organique et minérale (polystyrène macroporeux - silice) (2, 53). Les pores sont modifiés par remplissage avec un gel synthétique, flexible et fonctionnalisé, qui se distribue de façon homogène à l'intérieur des pores. La flexibilité des chaînes macromoléculaires augmente l'accessibilité des sites actifs par un mécanisme de diffusion plus rapide que celui des supports conventionnels, tout en conservant à un haut niveau, la capacité dynamique, le débit et la résolution. De tels supports porteurs de groupes ioniques sont commercialisés pour la chromatographie d'échange d'ions des protéines sous le nom HyperD (BioSeptra, Marlborough, États-Unis).

4- ANALYSE STRUCTURALE DES PARTICULES

4-1 TAILLE ET FORME DES PARTICULES

Les particules de PS-DVB pour la chromatographie sont produites par les divers procédés précédemment décrits. Leur taille et leur géométrie dépendent de plusieurs paramètres expérimentaux tels que la forme et le volume du réacteur, la vitesse de mélangeage, la proportion du monomère dans le milieu dispersé, le viscosité des phases en présence...

De nombreuses techniques, rassemblées notamment par R. E. Majors (54), permettent de caractériser des particules quant à leur taille, leur distribution de taille et leur géométrie. Il existe donc plusieurs définitions du diamètre moyen (4) selon la méthode de mesure utilisée. Les définitions les plus courantes sont d_{50} ou d_m . Ces grandeurs correspondent respectivement au diamètre situé à 50% de la distribution cumulée en volume et au diamètre de la population de particules la plus fréquente.

Les techniques de caractérisation de taille de particules, dont nous proposons une brève description, sont classées selon leur principe de base.

4-1-1 Tamisage

Le tamisage est l'une des méthodes géométriques les plus courantes. Des tamis d'ouvertures calibrées sont utilisés pour mesurer la taille des particules. Les tamis les plus courants existent dans la gamme de maille $> 40 \mu\text{m}$. Il existe également des micro-tamis fabriqués par photogravure et électrogammage dans la gamme $5-500 \mu\text{m}$.

4-1-2 Méthodes électriques

Par des appareils plus sophistiqués de type Coulter (compteur à variation de résistance), on observe la variation de résistance ou tension lorsqu'une particule en suspension dans un électrolyte passe au travers d'un petit orifice calibré. L'analyse est effectuée, en principe, particule par particule. Les analyses granulométriques sont établies en nombre, en masse et en volume.

4-1-3 Méthodes optiques et électroniques

* *Méthodes microscopiques* : La mesure de la taille des particules est réalisée par l'observation directe au microscope. Cette technique est considérée comme absolue car les particules peuvent être observées et mesurées individuellement grâce à des techniques d'analyse d'images. La caractérisation de la granulométrie par microscopie peut s'effectuer au moyen de divers types de microscopes.

Tout d'abord, la microscopie optique peut atteindre des résolutions de l'ordre de quelques μm et reste une technique utile et pratique. L'interprétation d'une image en microscopie optique renseigne sans ambiguïté sur la forme et la taille de particules. Elle permet sans conteste de vérifier la présence de petites particules ou de particules cassées.

La microscopie électronique à balayage ou SEM (Scanning Electron Microscopy) et la microscopie électronique à transmission ou TEM (Transmission Electron Microscopy) renseignent sur les aspects structuraux d'un lit de particules. Elles informent sur la morphologie et la granulométrie de particules de façon très précise puisque les résolutions peuvent atteindre quelques angströms. Cependant le problème principal de cette méthode réside dans la préparation d'un échantillon. Il est nécessaire de procéder à des étapes de déshydratation, de congélation, d'imprégnation ou encore de métallisation (etc....) qui peuvent occasionner une dégradation du matériau.

Il existe d'autres types de microscopies à sonde focale issues du principe du microscope à effet tunnel (STM pour Scanning Tunnelling Microscope). De ce principe est né aussi le microscope à balayage à effet de force (à force atomique) noté SFM (Scanning Force Microscope). Le principe général des microscopies à sonde focale est le balayage de la surface par une sonde très fine et sensible aux propriétés de la surface.

A. Serres (55) a détaillé et utilisé certains de ces instruments pour caractériser des surfaces à base de silice et de verre.

** Autres méthodes :* D'autres techniques reposent sur la dispersion des ondes électromagnétiques. L'invention du laser a permis de réaliser des faisceaux de lumière monochromatiques, ce qui rend l'interprétation des spectres en diffraction (particules microniques) et en diffusion (particules submicroniques) plus aisée. La répartition de la puissance lumineuse dépend de la dimension des obstacles ($1 \mu\text{m}$ - $2 \mu\text{m}$). De nombreux appareils fonctionnent sur ce principe dont une liste a été publiée par l'IFTS en 1992. Une instrumentation de type MALVERN, considéré comme un granulomètre en est un exemple. Le traitement des données est réalisé dans le cas de sphères ou de particules de géométrie simple. Contrairement aux méthodes optiques ou électriques, ces techniques ne considèrent pas les particules individuellement mais dans leur ensemble.

4-2 POROSITÉ ET SURFACE SPÉCIFIQUE

La structure poreuse d'un matériau s'évalue par la distribution de la taille des pores, par sa surface spécifique (S_p) et son volume poreux total (V_p). Les pores sont classés selon leur géométrie (cylindrique, sphérique, conique ...) et leur rayon (R_p). Le rayon poreux moyen, par analogie avec les dimensions des particules, est défini couramment par (4) :

- R_{p50} , rayon poreux correspondant à 50% de la distribution poreuse cumulée ($\sum V_{pi} = f(R_p)$) avec V_{pi} , volume poreux associé aux pores de classe i .
- R_{pm} , rayon poreux correspondant à la classe de pores la plus fréquente ($dV_{pi}/dR_p = f(R_p)$).

La distribution poreuse peut être gaussienne, étroite, bi ou plurimodale ou encore totalement hétérogène.

La nomenclature usuelle des pores selon leur dimension est la suivante :

- les micropores pour $R_p < 10 \text{ \AA}$
- les mésopores pour $10 < R_p < 250 \text{ \AA}$
- les macropores pour $R_p > 250 \text{ \AA}$

Les techniques permettant la caractérisation de la structure poreuse sont présentées ci-dessous et ont des limites de validité différentes comme le montre la figure I.8.

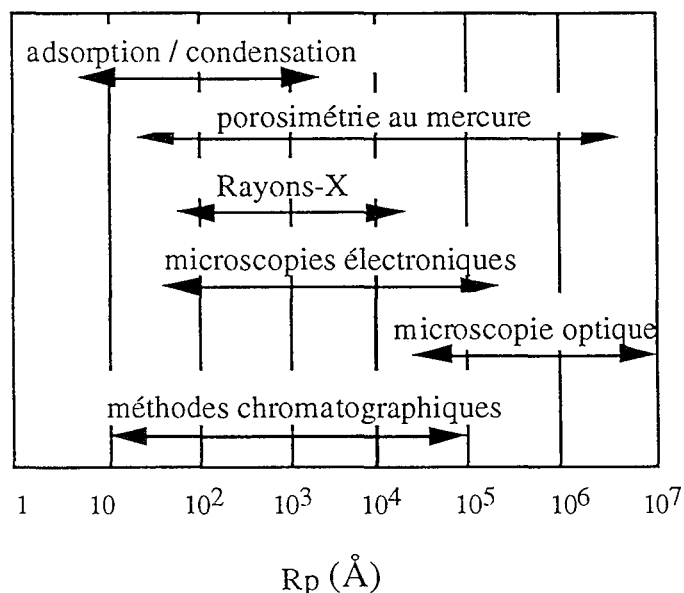


Figure I.8 : Limites de validité des méthodes de caractérisation de la structure poreuse d'après Unger (4)

4-2-1 Méthodes physiques

La porosimétrie au mercure et l'adsorption d'un gaz inerte sont des méthodes conventionnelles pour déterminer la répartition poreuse d'un échantillon solide à l'état sec.

La surface spécifique, exprimée en m^2/g de support, est la somme de la surface externe et de la surface interne constituée par les parois des pores. Elle est classiquement déterminée par la méthode BET de Brunauer, Emmet et Teller (56), basée sur l'**adsorption de gaz** inerte à basse température. Les surfaces spécifiques d'échantillons dont la valeur est de quelques dizaines ou centaines de mètres carrés par gramme sont déterminées par adsorption d'azote.

De plus, le choix du gaz tel que l'azote, le néon, l'hélium ou le krypton dépend de la taille des particules à analyser. L'adsorption de gaz repose sur l'obtention des courbes d'adsorption/désorption dans la zone de condensation capillaire. Cette technique permet de déterminer, outre la surface spécifique par la méthode BET, le volume poreux et la distribution poreuse (d'après de la loi de Kelvin) à partir de la courbe de désorption, en choisissant un modèle de pores cylindriques. Cette méthode n'est cependant valable que pour des rayons inférieurs à 250 Å.

Par **porosimétrie à mercure**, on détermine, le volume de mercure ayant pénétré dans les pores en fonction de la pression imposée. On accède ainsi au volume poreux total d'un échantillon et à la distribution poreuse, les rayons poreux (par exemple de modèle cylindrique) étant reliés à la pression de mercure par l'équation de Washburn. Cette technique est valable pour les pores de rayons compris entre 30 et 75000 Å.

La surface spécifique peut être évaluée indirectement par adsorption d'azote et par porosimétrie au mercure dans le cas de pores de géométrie définie (modèle de pores cylindriques non interconnectés).

Ces deux techniques de caractérisation de la structure poreuse, utilisées dans le cadre de notre étude, seront développées dans le chapitre V.

La **thermoporométrie** est une méthode thermique qui permet aussi de déterminer la taille des pores d'un matériau et a été élaborée par Brun et coll (57). Elle est fondée sur la transformation liquide-solide d'un condensat (eau, benzène ...) à l'intérieur des pores du matériau analysé. Les grandeurs obtenues par cette technique sont :

- les rayons de pores et les volumes poreux associés ;
- le volume poreux total comprenant la micro et mésoporosité. Au-delà de 250 Å de rayon poreux, les pores sont confondus avec le volume interstitiel ;
- la surface spécifique du matériau en tenant compte de la couche de solvant sur les parois ne subissant pas de changement d'état ;
- le facteur de forme dont la valeur est comprise entre 1 pour les pores sphériques et 2 pour les pores cylindriques.

Cette technique, utilisée par Housse-Ferrari (58) pour caractériser la structure poreuse de silice recouverte de poly N, N' diméthylacrylamide, présente une facilité de mise en oeuvre puisque les grandeurs extraites sont mesurées à partir de thermogrammes provenant d'un calorimètre différentiel. De plus, la thermoporométrie permet d'accéder à la taille réelle des pores et non à celle de leur orifice d'accès. Cependant, la macroporosité n'est pas accessible par cette technique et une destruction partielle de la structure des particules peut se produire pendant la congélation.

4-2-2 Méthodes microscopiques

Des particules poreuses peuvent être analysées par Microscopie Électronique à Transmission. En principe, les pores en surface (accessibles) ainsi que les pores obstrués non accessibles peuvent être visualisés à partir de coupes transversales de particules (marquées ou non) préalablement imprégnées dans une résine.

Les microscopes à sonde focale permettent d'analyser la rugosité et la porosité superficielle d'un matériau compte-tenu de leur grande résolution.

4-2-3 Méthode chromatographique

La caractérisation d'une structure poreuse peut s'effectuer à l'état solvaté par chromatographie d'exclusion stérique de solutés-étalons. Dans cette méthode, le matériau à analyser constitue la phase stationnaire. Par un choix approprié de la phase mobile et des étalons utilisés pour la calibration, on cherche d'abord à minimiser les interactions entre support et soluté. Un traitement mathématique des courbes de calibration, permet la modélisation de la distribution poreuse en connaissant les rayons hydrodynamiques des solutés injectés (59).

4-3 ANALYSE CHIMIQUE DE LA SURFACE

La caractérisation chimique de la surface d'un matériau peut s'effectuer par diverses méthodes, dont le domaine de validité dépend de la géométrie, la nature et la taille dudit matériau.

Dans le cas particulier des particules organiques modifiées par fixation ou adsorption de polymères (ou de groupes ioniques ou fonctionnels), diverses analyses chimiques peuvent être envisagées :

- les charges surfaciques sont généralement quantifiées par potentiométrie. Des mesures de potentiel ζ sont envisageables sur des particules de taille inférieure à 30 μm . Cette grandeur n'est pas reliée directement au nombre de charges surfaciques. Mesuré dans certaines conditions (en présence d'électrolytes de concentrations données), le potentiel ζ permet par exemple, de comparer des lots de particules entre eux.

• la quantité de polymère déposée peut être déterminée par diverses méthodes directes telles que :

- l'analyse élémentaire,
- la spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier,
- la Spectroscopie Électronique pour l'Analyse Chimique (ESCA),

Cette technique consiste à irradier la surface à analyser par un faisceau de rayons X et à mesurer les énergies de liaison des orbitales électroniques des photoélectrons émis. L'exploitation des spectres obtenus renseigne sur la nature et la concentration des atomes présents. La validité de cette spectroscopie dépend de la profondeur d'analyse de la surface .

- la Spectroscopie de Masse Statique d'Ions Secondaires (SSIMS-Tof).

Dans cette technique, la surface à analyser est bombardée par un faisceau d'ions primaires (par exemple Cs^+). Il en résulte la rupture de certaines liaisons inter atomiques et intermoléculaires et l'émission d'ions secondaires, détectés par un spectromètre de masse. La composition chimique d'une surface (concentration et répartition de chaque espèce) peut être déterminée en fonction de la profondeur de pénétration des ions primaires dans le matériau.

• la quantité de polymère adsorbée peut également être évaluée par une méthode indirecte qui consiste à déterminer la quantité de polymère non-adsorbée ; la quantité de polymère adsorbée est déterminée par différence entre la quantité initiale de polymère en solution et celle qui reste dans le surnageant après l'adsorption. Dans ce cas, le dosage réalisé à partir du polymère en solution (méthode du surnageant) dépend de la nature du polymère (dosage spectrophotométrique, potentiométrique, colorimétrique...).

5 - CONCLUSION

La conception de matériaux destinés à la Bio-Chromatographie Liquide Haute Performance doit prendre en compte deux aspects différents : le premier concerne la nature de la matrice et le second la composition de ce qui jouera le rôle de la phase stationnaire. La matrice idéale doit posséder une résistance mécanique suffisante ; elle doit être constituée de particules sphériques, de petite taille, monodisperses, non poreuses ou présentant des pores de géométrie uniforme pour permettre un transfert de masse rapide. La phase stationnaire doit être stable chimiquement, hydrophile et facilement modifiable. De nombreux articles, livres et revues traitent de la préparation, des propriétés et des applications des supports chromatographiques. Chaque type de support (organique ou inorganique) présente ses avantages et ses inconvénients et le choix d'un matériau convenable dépend des propriétés requises pour un mode de séparation donné.

En ce qui concerne les supports à base de polymères organiques et synthétiques, les procédés classiques de production de billes ont été améliorés pour favoriser la production de particules monodisperses. Les modifications les plus récentes apportées à ces procédés concernent également le contrôle de la structure poreuse des microsphères. La plupart des billes de PS-DVB (et dérivés polystyréniques) commerciales présente une polydispersité en taille de pores importante. Néanmoins, des billes de PS-DVB dont la distribution poreuse est plus étroite sont actuellement préparées à l'échelle de laboratoire. Par ailleurs, des billes de PS-DVB macroporeuses et de grande rigidité ont été développées pour améliorer la résistance au transfert de masse en phase mobile stagnante. L'élution des solutés s'effectue par diffusion rapide (gigapores) et/ou convection rapide appelée perfusion.

Les supports polystyréniques constitués de billes monodisperses sont encore très coûteux. C'est pourquoi, un support polystyrénique original a été développé dans lequel la masse de remplissage des colonnes est constituée d'une seule particule macroporeuse dont les caractéristiques sont assimilées à celles d'une membrane chromatographique.

Dans le domaine de la bio-chromatographie, le caractère hydrophobe prononcé du PS-DVB limite son utilisation à la chromatographie en phase inverse. Ce mode de séparation, qui nécessite l'emploi d'un solvant organique, provoque souvent la dénaturation des protéines. C'est pourquoi, de nombreuses équipes de recherche se sont intéressées à l'hydrophilisation de ces matériaux à des fins biotechnologiques.

La production de particules polystyréniques intrinsèquement hydrophiles, utilisant un monomère plus hydrophile et plus réactif que le styrène, ne permet pas encore d'obtenir des billes suffisamment hydrophiles.

L'élaboration de matériaux dits composites reste à ce jour la meilleure possibilité de modifications des phases de PS-DVB, par analogie avec celles déjà réalisées sur les phases de silice (par fixation ou adsorption de polymères). En l'occurrence, l'obtention de supports de PS-DVB hydrophiles par adsorption de polymères amphiphiles, biocompatibles et facilement fonctionnalisables est un procédé facile à mettre en oeuvre, qui ne requiert que peu d'étapes de préparation.

Quelle que soit la modification apportée aux particules de PS-DVB, leurs caractéristiques finales doivent être déterminées pour comprendre leurs propriétés dans le procédé chromatographique. Dans ce but, nous avons présenté quelques techniques de caractérisation d'un lit de particules poreuses. Certaines de ces techniques ont été utilisées dans le cadre de notre étude.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) J. G. Dorsey, W. T. Cooper, J. F. Wheeler, H. G. Barth et J. P. Foley
Liquid Chromatography : Theory and Methodology
Anal. Chem., **66**, (1994), 500R-546R
- (2) E. Boschetti
Advanced sorbents for preparative protein separation purposes - Review
J. Chromatogr. A, **658**, (1994), 207-236
- (3) D. Berek, I. Novak et M. Petro
Column packings for High Performance Liquid Chromatography : present state and future development.
J. Radioan. Nucl. Ch. Ar., **183**, (1994), 19-26
- (4) K. K. Unger
Survey of types of chromatographic packings and stationary phases and their role in separation processes.
J. Chromatogr. Sci., **47**, (1990), 43-85
- (5) M. P. Henry
Design requirements of silica-based matrices for biopolymer chromatography, a review.
J. Chromatogr., **544**, (1991), 413-443
- (6) V. P. Zubov, A. E. Ivanov et V. V. Saburov
Polymer-coated adsorbents for the separation of biopolymers and particles.
Adv. Polym. Sci. , **104**, (1992),135-175
- (7) K. K. Unger, K. D. Lork et H. J. Wirth
Development of advanced silica-based packing materials
dans HPLC of proteins , peptides and polynucleotides
Chapitre 3, (1991), 59-117
- (8) S. N. Behrens
Polymeric packing materials in liquid chromatography for biological applications.
dans Polymer applications for biotechnology, Chapitre 4, (1992), 98-154
- (9) J. Nawrocki, M. P. Rigney, A. McCornick et P. W. Carr
Chemistry of zirconia and its use in chromatography
J. Chromatogr. A, **657**, (1993), 229-282
- (10) H.-J. Wirth, K.- O. Erikson, P. Holt, M. Aguilar et M. T. W. Hearn
High-Performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins
CXXIX. Ceramic-based particles as chemically stable chromatographic supports.
J. Chromatogr., **646**, (1993), 129-141
- (11) D. E. Schmidt Jr, R. W. Glese, D. Coron et B. L. Karger
High performance liquid chromatography of proteins on a diol-silica bonded gel stationary phase.
Anal. Chem., **52**, (1980), 177-182
- (12) P. E. Parker, B. W. Hatt, et S. R. Holding
Dissolution of siliceous chromatographic packings in various aqueous eluents.
J. Chromatogr., **206**, (1981), 27-34

- (13) L. L. Llyod
Rigid macroporous stationary phases in high performance liquid chromatography
J. Chromatogr., **554**, (1991), 201-217
- (14) R. Rosset, M. Claude et A. Jardy
Chromatographie de partage sur phases stationnaires greffées et polymères non ioniques.
Copolymères de styrène-divinylbenzène.
dans *Chromatographies en phases liquide et supercritique*, chapitre IX, Ed Masson S.A.,
(1991), 322-364
- (15) Arago 16 - Matériaux polymères - Enjeux et Perspectives
O.F.T.A. Masson, Paris (1995)
- (16) J.-P. Mercier et E. Maréchal
Chimie des Polymères
Traité des matériaux, **13**, (1993)
- (17) J. C. Moore
Gel permeation chromatography. (I) New method for molecular weight distribution of
high polymers.
J. Polym. Sci., **2**, (1964), 835-842
- (18) R. Arshady
Styrene based polymer support developed by suspension polymerization
Chim. Ind., **10**, (1988), 70-75
- (19) R. Arshady
Beaded polymer supports and gels. (I). Manufacturing techniques
J. Chromatogr., **586**, (1991), 181-197
- (20) K. E. J. Barrett
Dispersion polymerization in organic media
Br. Polym. J., **5**, (1973), 259-271
- (21) A. Tuncel, R. Kahraman et E. Piskin
Monosize polystyrene microbeads by dispersion polymerization
J. Appl. Polym. Sci., **50**, (1993), 303-319
- (22) B. Thomson, A. Rudin et G. Lajoie
Dispersion copolymerization of styrene and divinylbenzene : synthesis of monodisperse
uniformly crosslinked particles.
J. Polym. Sci., **33**, (1995), 345-357
- (23) J. Ugelstad, P. C. Moerk, K. H. Kaggerud, T. Ellingsen et A. Berge
Swelling of oligomer-polymer particles. New methods of preparation of emulsions and
polymer dispersions.
Adv. Colloid Interface Sci., **13**, (1980), 101-140
- (24) J. Ugelstad
Monodisperse polymer particles and their dispersions
U. S. Patent n° 4459378 (Etats-Unis), (Juillet 1984)

- (25) J. H. Kim, E. D. Sudol, M. S. El-Aasser, J. W. Vanderhoff et D. M. Kornfeld
Preparation of large-particle-size monodisperse latexes in a rotating cylinder reactor.
Chem. Eng. Sci., **43**, (1988), 2025-2030
- (26) T. Ellingsen, O. Aune, J. Ugelstad et S. Hagen
Monosized stationary phases for chromatography
J. Chromatogr., **535**, (1990), 147-161
- (27) C. M. Cheng, F. J. Micale, J. W. Vanderhoff et M. S. El-Aasser
Synthesis and characterization of monodisperse porous polymer particles.
J. Polym. Sci., Part A : Polymer chemistry, **30**, (1992), 235-244
- (28) C. M. Cheng, J. W. Vanderhoff et M. S. El-Aasser
Monodisperse porous polymer particles : formation of the porous structure
J. Polym. Sci., Part A : Polymer chemistry, **30**, (1992), 245-256
- (29) J. M. J. Fréchet
Design and preparation of novel particulate and continuous polymeric macroporous media
for the separation of biological and synthetic molecules.
Makromol. Chem., Macromol. Symp., **70/71**, (1993), 289-301
- (30) Q. C. Wang, K. Hosoya, F. Svec et J. M. J. Fréchet
Polymeric porogens used in the preparation of novel monodispersed macroporous
polymeric separation media for High-Performance Liquid Chromatography.
Anal. Chem., **64**, (1992), 1232-1238
- (31) M. Galia, F. Svec et J. M. J. Fréchet
Monodisperse polymer beads as packing materials for High-Performance Liquid
Chromatography : effect of divinylbenzene content on the porous and chromatographic
properties of poly(styrene-co-divinylbenzene) beads prepared on the presence of linear
polystyrene as a porogen.
J. Polym. Sci., Part A : Polymer chemistry, **32**, (1994), 2169-2175
- (32) N. B. Afeyan, N. F. Gordon, I. Mazsaroff, L. Varady, S. P. Fulton, Y. B. Yang et F.
E. Regnier
Flow-through particles for the high-performance liquid chromatographic separation of
biomolecules : perfusion chromatography.
J. Chromatogr., **519**, (1990), 1-29
- (33) N. B. Afeyan, S. P. Fulton et F. E. Regnier
Perfusion chromatography packing materials for proteins and peptides.
J. Chromatogr., **544**, (1991), 267-279
- (34) Q. C. Wang, F. Svec et J. M. J. Fréchet
Macroporous polymeric stationary-phase rod as continuous separation medium for
reversed-phase chromatography.
Anal. Chem., **65**, (1994), 243-248
- (35) V. Smigol, F. Svec et J. M. J. Fréchet
Uniformly sized poly(vinylphenol) porous beads : a versatile HPLC separation medium
allowing fast switching between size-exclusion, normal phase, and reversed phase
chromatography.
J. Liquid Chromatogr., **17**, (1994), 259-276

- (36) Y. C. Liang, F. Svec et F. M. J. Fréchet
Monodisperse polymer beads as packing material for high-performance liquid chromatography. Preparation of macroporous poly(2,3-epoxypropylvinylbenzyl ether-co-divinylbenzene) beads, their properties and application to HPLC separations.
J. Polym. Sci. : Part A : Polymer Chemistry, **33**, (1995), 2639-2646
- (37) Y. B. Yang, F. Nevejans, M. Verzele
Reversed-phase and cation-exchange chromatography on a new poly(styrene-divinylbenzene) high capacity, weak cation-exchanger.
Chromatographia, **20**, (1985), 735-738
- (38) D. Letourneur, V. Migonney, D. Muller, M. Jozefonvicz
Phosphorylated polystyrene resins in high performance ion-exchange chromatography
J. Chromatogr., **634**, (1992), 87-91
- (39) M. A. Rounds, W. D. Rounds et F. E. Regnier
Poly(styrene-divinylbenzene)-based strong anion-exchange packing material for high performance liquid chromatography of proteins.
J. Chromatogr., **397**, (1987), 35-38
- (40) Q. C. Wang, F. Svec et J. M. J. Fréchet
Hydrophilization of porous polystyrene-based continuous rod column.
Anal. Chem., **67**, (1995), 670-674
- (41) J. J. Sun et J. S. Fritz
Chemically modified resins for solid-phase extraction.
J. Chromatogr., **590**, (1990), 95-99
- (42) T. Ellingsen, O. Aune, A. Berge, L. Kilaas, R. Schmid, P. Stenstad, J. Ugelstad, S. Hagen, E. Weng et L. Johansen
Monosized polymer particles in biochemical and biomedical separations.
Makromol. Chem., Macromol. Symp., **70/71**, (1993), 315-326
- (43) E. Österberg, K. Bergström, K. Holmberg, T. P. Schuman, J. A. Riggs, N. L. Burns, J. M. Van Alstine et J. M. Harris
Protein-rejecting ability of surface-bound dextran in end-on and side-on configurations : comparison to PEG
J. Biomed. Mater. Res., **29**, (1995), 741-747
- (44) Y. B. Yang et F. E. Regnier
Coated hydrophilic polystyrene-based packing materials
J. Chromatogr., **544**, (1991), 233-247
- (45) L. Varady, Y. B. Yang, S. E. Cook et F. E. Regnier
Coated media for chromatography
U. S. patent n° 5.030.352, (9 juillet 1991)
- (46) A. Tuncel, A. Denizli, D. Purvis, C. Lowe et E. Piskin
Cibacron blue F3G-A-attached monosize poly(vinylalcohol)-coated polystyrene microspheres for specific albumin adsorption.
J. Chromatogr., **634**, (1993), 161-168
- (47) M. Léonard, C. Fournier, E. Dellacherie
Polyvinyl alcohol-coated macroporous polystyrene particles as stationary phases for the chromatography of proteins.
J. Chromatogr., **664**, (1995), 39-46

- (48) M. Malmsten, B. Lindman, K. Holmberg et C. Brink
Hydrophilization of polystyrene surfaces with ethyl(hydroxyethyl)cellulose.
Langmuir, **7**, (1991), 2412-2414
- (49) M. J. Bridgett, M. C. Davies et S. P. Denyer
Control of staphylococcal adhesion to polystyrene surfaces by polymer surface modification with surfactants.
Biomaterials, **13**, (1992), 411-416
- (50) R. Tanaka, P. A. Williams, J. Meadows et G. O. Phillips
The adsorption of hydroxyethyl cellulose and hydrophobically modified hydroxyethyl cellulose onto polystyrene latexes.
Colloids and Surfaces, **66**, (1992), 63-72
- (51) L. Varady, N. Mu, Y. B. Yang, S. E. Cook, N. Afeyan et F. E. Regnier
Fimbriated stationary phases for proteins
J. Chromatogr., **631**, (1993), 107-114
- (52) M. Petro et D. Berek
Polymers immobilized on silica gels as stationary phases for liquid chromatography.
Chromatographia, **37**, (1993), 549-561
- (53) E. Boschetti, L. Guerrier, P. Girot, J. Horvath
Preparative high performance liquid chromatographic separation of proteins with HyperD ion-exchange support.
J. Chromatogr. B, **664**, (1995), 225-231
- (54) R. E. Majors
Measuring particle-size
LC-GC, **11**, (1993), 848-857
- (55) A. Serres
Supports de silice passivée à ligands biospécifiques : Synthèse, caractérisation et propriétés de séparation en chromatographie des protéines
Thèse de doctorat, Université Paris-Nord, (1994)
- (56) S. Brunauer, P. H. Emmett et E. Teller
Adsorption of gases in multimolecular layers.
J. Amer. Chem. Soc., **60**, (1938), 309-319
- (57) M. Lebrun, A. Lallemand, J. - F. Quinson et C. Eyraud
A new method for the simultaneous determination of the size and the shape of pores : The Thermoporosimetry.
Thermochim. Acta, **21**, (1977), 59-88
- (58) V. Housse-Ferrari
Préparation et caractérisation de silices poreuses modifiées par des polymères et des copolymères du N, N' - diméthylacrylamide.
Utilisation pour la séparation chromatographique des protéines.
Thèse de doctorat, Université Paris VI, (1990)
- (59) J. H. Knox et H. J. Ritchie
Determination of pore size distribution curves by size-exclusion chromatography
J. Chromatogr., **387**, (1987), 65-84

CHAPITRE II

CHAPITRE II

SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE DÉRIVÉS AMPHIPHILES DU DEXTRANE

Le polymère que nous avons choisi pour modifier la surface des particules de polystyrène-divinylbenzène est le dextrane T40 ($\overline{M}_p \approx 40\,000\text{g/mol}$). Ce polymère est très hydrophile et ne s'adsorbe pas sur le polystyrène. Pour permettre son adsorption, le polysaccharide est préalablement modifié par introduction contrôlée de groupements phénoxy à faible concentration.

Au cours de ce chapitre seront décrits les divers modes opératoires concernant les modifications chimiques apportées au dextrane natif ainsi que les différentes méthodes qui ont été utilisées pour caractériser les polymères préparés.

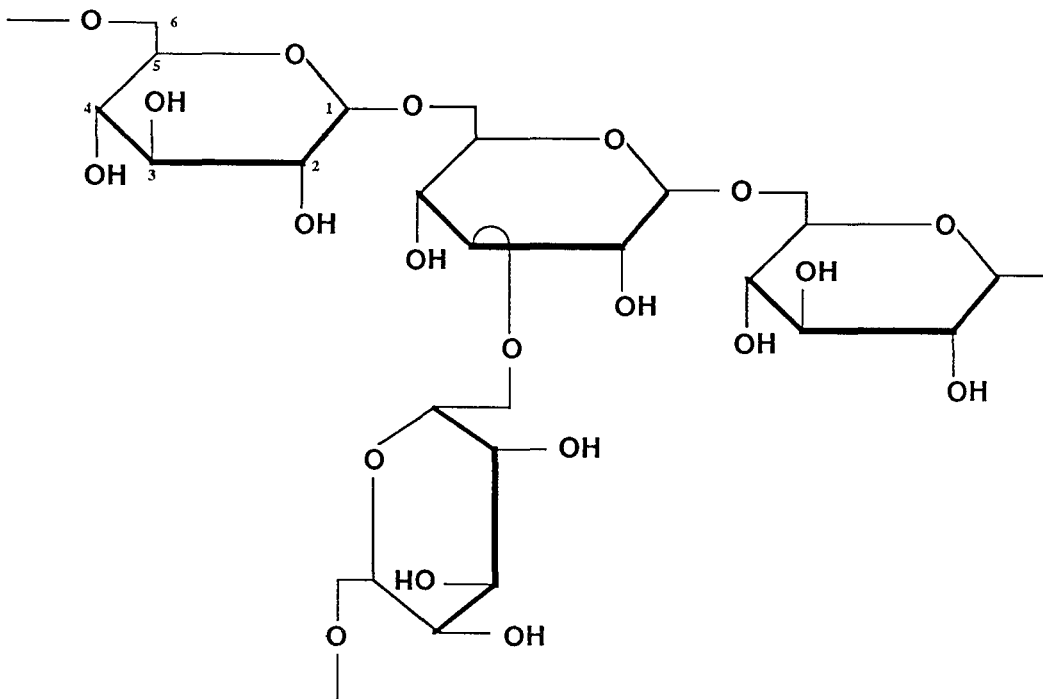


Figure II.1: Structure générale des dextranes issus de la souche B 512 F des *Leuconostoc mesenteroides*

1 - GÉNÉRALITÉS SUR LE DEXTRANE

Le nom de dextrane a été introduit en 1870 par Scheibler qui établit que le dextrane est un polymère constitué par l'enchaînement d'unités glucopyranose.

**Production*

Les dextrans sont synthétisés à partir du saccharose par un grand nombre de micro-organismes (1). En particulier, seuls les dextrans issus de la souche B-512F de *Leuconostoc mesenteroides* présentent un intérêt commercial. De nombreuses revues concernant la production, la structure, les propriétés et les utilisations des dextrans ont été publiées et ont contribué à la bonne connaissance de ces polymères (2,3,4).

**Structure*

Le dextrane utilisé dans cette étude est constitué par des enchaînements d' α -D glucopyranose selon un mode principal α 1-6 et possède des ramifications comme le montre la figure II-1 (5) qui dépendent de la souche productrice. Outre la chaîne principale, il possède des ramifications 1 \rightarrow 3 peu nombreuses (< 5 %) réparties de façon régulière sur la chaîne principale et constituées majoritairement d'une seule unité monomère. Le dextrane natif a une masse molaire initiale élevée ; il subit une hydrolyse acide partielle suivie d'un fractionnement, ce qui permet l'obtention d'une gamme de polymères de masses molaires variées et de polymolécularité plus réduite.

**Propriétés physico-chimiques*

Le dextrane est un polymère très hydrophile, et très soluble dans l'eau ; il l'est moins dans quelques solvants organiques comme le formamide, le diméthyle sulfoxyde, l'éthylène glycol, le glycérol..., et est insoluble dans la plupart des autres solvants organiques.

C'est en 1958 que Granath a établi la loi de dépendance de la viscosité avec la masse moléculaire moyenne viscosimétrique notée \overline{M}_v ($\overline{M}_v < 500\ 000$ g/mol) dans l'eau à 25°C (6). Des études viscosimétriques complémentaires sur les dextrans ont permis de conclure que ce polymère en solution dans l'eau se comporte comme une pelote flexible et ne présente pas d'association intramoléculaire (7,8).

Sa réactivité modérée est le reflet de sa richesse en fonctions hydroxyles et en dehors de conditions extrêmes de pH (pH < 2), il est peu sensible à l'hydrolyse.

**Utilisations*

Dans la pratique, les dextrans de \overline{M}_p comprises entre 2 000 et 150 000 g/mol sont les plus couramment utilisés, notamment dans les industries cosmétiques, photographiques (9), et tout particulièrement dans les domaines médicaux et thérapeutiques (2,3,8).

Ainsi, les dextrans sont utilisés en tant que substituts du plasma car ils sont biocompatibles et surtout hémocompatibles. Grâce à leur pouvoir d'expansion volumique, ils permettent la correction de troubles hémodynamiques dans les états de choc. Les substituts utilisés en France sont le Rhéomacrodex et le Macrodex à base de dextrans dont les \overline{M}_p sont respectivement 40 000 et 70 000 g/mol.

Par ailleurs, ils ont été utilisés au laboratoire pour la préparation de substituts érythrocytaires à base d'hémoglobine (10, 11). Dans ce cas, le polymère est fixé chimiquement sur la protéine, afin de conférer à celle-ci des propriétés compatibles avec un usage transfusionnel.

Le dextrane-sulfate est un dérivé qui possède des propriétés anticoagulantes (4). Des études plus récentes ont établi ses effets d'inhibition dans le développement du virus HIV (12).

Dans le domaine de la chromatographie, citons également l'exemple des gels d'exclusion stérique Séphadex à base de dextrane, plus ou moins réticulé selon le domaine de fractionnement. La fonctionnalisation de ces matrices par des groupements diéthylaminoéthyles ou carboxyméthyles permet leur utilisation comme échangeurs d'ions. D'autres ligands peuvent également être introduits, afin d'obtenir des matériaux utilisables dans différents types de chromatographie.

Le dextrane-diéthylaminoéthyle est également utilisé, pour l'élaboration de supports chromatographiques composites. Par exemple, son adsorption à la surface de la silice permet de masquer les groupes silanols (13, 14) qui interagissent fortement avec certaines protéines.

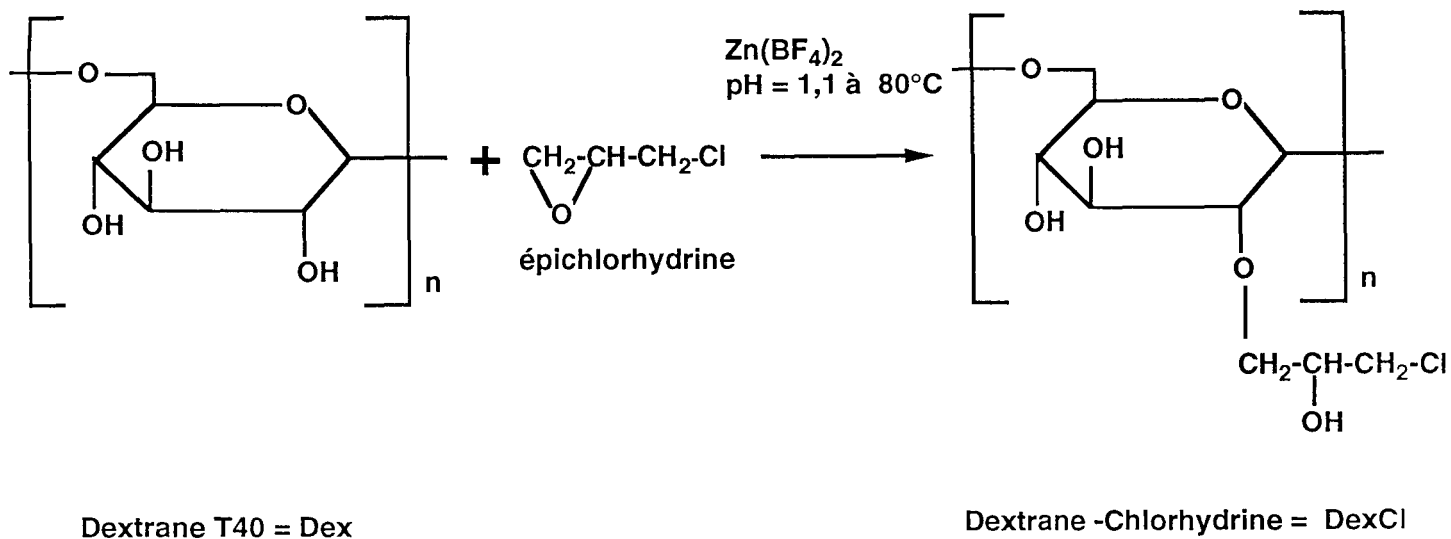


Figure II.2 : Schéma de synthèse des Dextranes-Chlorhydrine

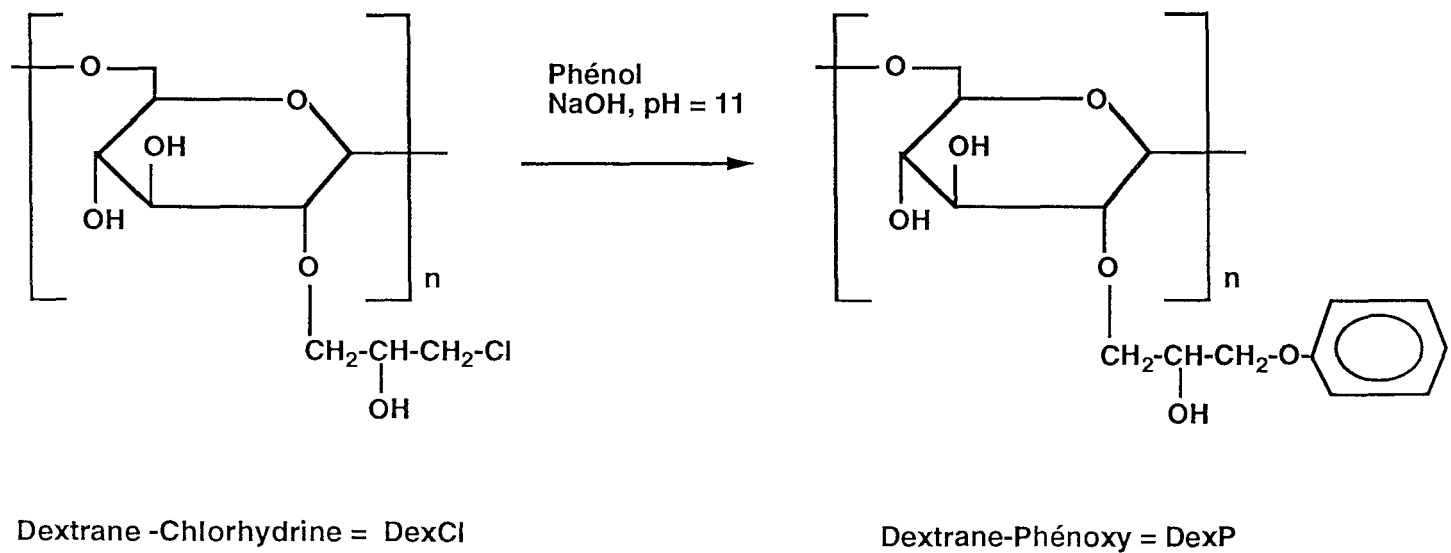


Figure II.3 : Schéma de synthèse des Dextranes-Phénoxy

2 - MODIFICATIONS CHIMIQUES DU DEXTRANE

Cette partie est consacrée à la présentation et à l'étude de l'optimisation des conditions de préparation des dextrans modifiés par introduction de groupes phénoxy. Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé un dextrane noté Dex ou T40 dont les masses moléculaires moyennes en nombre et en poids sont respectivement 23 000 et 40 000 g/mol et commercialisé par Pharmacia (Uppsala, Suède).

2-1 SCHÉMAS DE SYNTHÈSE

La modification apportée au dextrane T40 se déroule en deux étapes selon les protocoles opératoires détaillés ci-après.

L'introduction d'un bras chlorhydrine réactif ou chlorohydroxypropyle sur le dextrane est une transformation réalisée classiquement dans la chimie de ce polymère.

Le dextrane-chlorhydrine est obtenu par réaction du dextrane avec l'épichlorhydrine en présence d'un acide de Lewis (figure II.2). Selon Rogovin et coll. (15), la substitution nucléophile est catalysée par le tétrafluoroborate de zinc en solution aqueuse à 50 %. Le dextrane modifié ainsi obtenu, noté DexCl, constitue un intermédiaire réactionnel aisément fonctionnalisable. En effet, la substitution des chlores par divers groupes nucléophiles, en particulier, des ions phénates a été envisagée. Cette étape est réalisée en milieu aqueux à pH 11 et conduit à la formation de dextrane-phénoxy, noté DexP (figure II.3).

L'introduction de groupements phénoxy sur le dextrane a pour objectif, la préparation d'un dérivé amphiphile capable de s'adsorber à la surface des particules de polystyrène-divinylbenzène. Le taux de groupements phénoxy, susceptibles d'interagir avec le PS-DVB par interaction hydrophobe, est un facteur clé pour notre étude et a fait l'objet d'une optimisation.

2-2 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX ET OPTIMISATION DES CONDITIONS DE SYNTHÈSE DES DEXTRANES-PHÉNOXY

Au cours de ce paragraphe seront décrites les conditions opératoires relatives à chaque étape de modification du dextrane. Les résultats concernant les taux de substitution atteints et les problèmes inhérents à chaque procédé seront discutés.

2-2-1 Dérivés chlorés

2-2-1-1 Protocole expérimental

Le protocole présenté ici correspond à la méthode de Rogovin modifiée par Prouchayret sur le dextrane T10 (10).

50 g de dextrane T40 sont dissous dans une solution contenant 50 mL de NaOH à 0,64 M et 50 mL d'une solution $Zn(BF_4)_2$ (50 % w/v) dont le pH est compris entre 1 et 2. 100 mL d'épichlorhydrine sont ajoutés au mélange, lequel est agité pendant 5 heures à 80 °C puis refroidi jusqu'à température ambiante.

La purification du polymère repose sur des précipitations successives (acétone, éthanol) visant à éliminer l'agent chloré en excédent et les sous-produits de la réaction. Après refroidissement, le polymère est précipité dans 2 L d'acétone sous agitation (ultraturax), filtré sur fritté et séché à l'étuve sous vide à 40°C. Le produit séché est redissous dans un minimum d'eau distillée (100 mL) et précipité à nouveau dans 1 L d'éthanol, filtré puis séché. La purification est achevée lorsque les taux de chlore du dextrane après deux précipitations successives sont identiques. Comme l'ont montré précédemment Prouchayret (10) et Bonneaux (11), 3 précipitations au moins dans l'éthanol sont nécessaires pour obtenir un taux de chlore constant. Une dernière précipitation dans l'acétone est préconisée pour faciliter le séchage du polymère obtenu.

2-2-1-2 Détermination du taux de substitution en chlore par potentiométrie

Les atomes de chlore (chlores liés et chlorures) contenus dans un composé organique peuvent être quantifiés par la méthode de Schröniger dont le principe est le suivant : le dosage de chlore total présent dans un échantillon sec de polymère s'effectue par une combustion préalable et totale de cet échantillon.

20 mg environ exactement de produit sont placés sur un papier prévu à cet effet et disposés dans une nacelle en platine dépourvue de toute substance organique.

Dans un ballon, sont introduits 3 mL de solution de sulfate d'hydrazine (réducteur) et 3 mL de sulfate acide de potassium. Après une oxygénation de 5 minutes du ballon, la nacelle y est introduite et la combustion est amorcée au moyen d'une lampe au tungstène. Après 30 minutes d'agitation, le chlore gazeux formé est réduit en chlorure ; cet ion est dosé par argentimétrie en milieu acide. Ce titrage donne accès au nombre de moles total de chlore (chlore lié au polymère et chlorure) présent dans l'échantillon. Le taux de chlorure présent dans l'échantillon est dosé par argentimétrie après dissolution de 50 mg environ exactement de celui-ci dans 3 mL de sulfate acide de potassium, sans dégradation préalable de l'échantillon. Par différence, on accède au taux de chlore lié au polymère. Les taux de chlore peuvent être également estimés par l'analyse élémentaire.

2-2-1-3 Optimisation de la synthèse

En milieu très acide ($\text{pH} < 0$), la réaction de l'épichlorhydrine sur le polymère est aisée ainsi qu'il apparaît dans les travaux antérieurs. Cependant, dans ces conditions, la modification du polymère s'accompagne d'une hydrolyse des enchaînements glucosidiques qui réduit de près de $3/4$ la \overline{M}_p du dextrane. L'amélioration apportée par Prouchayret à la méthode de Rogovin consiste à ajuster le pH réactionnel initial entre 1 et 2 pour limiter les réactions d'hydrolyse et donc la diminution de \overline{M}_p . Ces travaux ont été réalisés à partir d'un dextrane de $\overline{M}_p \approx 10\,000$ g/mol.

Partant d'un dextrane de masse moléculaire plus élevée, nous avons voulu, dans un premier temps, vérifier l'influence du pH sur les caractéristiques des polymères obtenus. Dans le tableau II.1, figurent les taux de chlore et les masses molaires moyennes évaluées par chromatographie d'exclusion stérique (colonne Lichrospher Diol Si 300, tampon phosphate 0,05M pH 7,2) notées \overline{M}_{SEC} de divers DexCl en fonction du pH réactionnel initial. Les masses \overline{M}_{SEC} sont obtenues à partir d'une courbe de calibration faite avec des pullulanes et ne sont données qu'à titre indicatif.

Polymère	pH réactionnel	Taux de chlore (mmol/g de polymère)	\overline{M}_{SEC} (éq. pullulanes en g/mol)
T40	—	—	25 100
DexCl ₁	< 1	6,8	< 6 000
DexCl ₂	1,1 < pH < 1,2	6,5	16 000
DexCl ₃	1,3	3,0	23 600
DexCl ₄	1,7	2,0	23 700

Tableau II.1 : Synthèse des dextrans-chlorhydrines : Influence du pH réactionnel initial. 10 g de dextrane sont traités par 20 mL d'épichlorhydrine selon les conditions décrites.

Ainsi, il apparaît clairement qu'une baisse du pH réactionnel engendre une réduction importante de la masse moléculaire moyenne du dextrane. Le caractère très acide du tétrafluoroborate de zinc, responsable des coupures de chaînes, peut être atténué par ajout de soude. Mais la réactivité de l'épichlorhydrine diminue quand le pH augmente. Un pH optimal compris entre 1,1 et 1,2 permet d'atteindre un taux de chlore lié au polymère équivalent à celui obtenu lors d'études précédentes sur un dextrane de masse molaire $\overline{M}_p \approx 10\,000$ g/mol, soit 0,65 mmol/g de polymère (10). Quoiqu'il en soit une légère diminution des masses moléculaires moyennes des polymères est toujours observée, le dextrane étant particulièrement sensible à l'acidité du milieu. Les rendements massiques de cette étape sont supérieurs à 90 % dans tous les cas et les taux de chlore fixé parfaitement reproductibles.

2-2-2 Introduction de groupements phénoxy

L'introduction de groupements phénoxy se fait par une substitution nucléophile des atomes de chlore en milieu aqueux. Les paramètres tels que la durée et la quantité de réactif doivent être optimisés afin d'obtenir des taux de substitution variables. Cette deuxième étape est suivie de plusieurs étapes de purification afin d'éliminer le phénol en excès, et d'un traitement par la soude permettant d'hydrolyser les chlores résiduels. Le mode opératoire général est décrit ci-dessous :

2-2-2-1 Protocole expérimental

A une solution de phénol dissous dans 20 mL de soude est ajouté 1 g de DexCl. Le mélange est agité 1 à 3 jours à température ambiante en maintenant le pH réactionnel à 11 par addition de soude (2 unités de pH au dessus du pKa du couple phénol/phénate). A la fin de la réaction, le mélange réactionnel est concentré par évaporation sous vide du solvant puis acidifié jusqu'à pH 6 par adjonction d'HCl avant de procéder à la purification du polymère obtenu. Le polymère en solution est précipité dans l'éthanol absolu (ultraturax), filtré puis séché sous vide à 40°C pendant une nuit. Trois extractions successives de 15 minutes dans le dichlorométhane à reflux sont finalement réalisées (15 mL de solvant par gramme de polymère) puis le polymère est filtré à chaud, séché sous vide à 40°C pendant une nuit. Les fonctions chlore résiduelles du produit formé sont hydrolysées pendant 48 heures dans NaOH 1M (20 mL/g de polymère). Le polymère est finalement dialysé contre de l'eau distillée pendant 3 jours pour éliminer les sels présents puis lyophilisé.

2-2-2-2 Dosages spectrophotométriques

La détermination du taux de groupements phénoxy fixés sur le dextrane est basée sur le fait que ces groupes absorbent en UV avec un maximum de densité optique à $\lambda = 269$ nm. Nous avons eu recours à une molécule témoin dont le chromophore possède un environnement chimique proche des groupes phénoxy du polymère. Ce témoin est le phénoxy éthanol dont le coefficient d'extinction molaire, ϵ ($1372 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) a été déterminé selon la loi de Beer-Lambert à 269 nm dans l'eau.

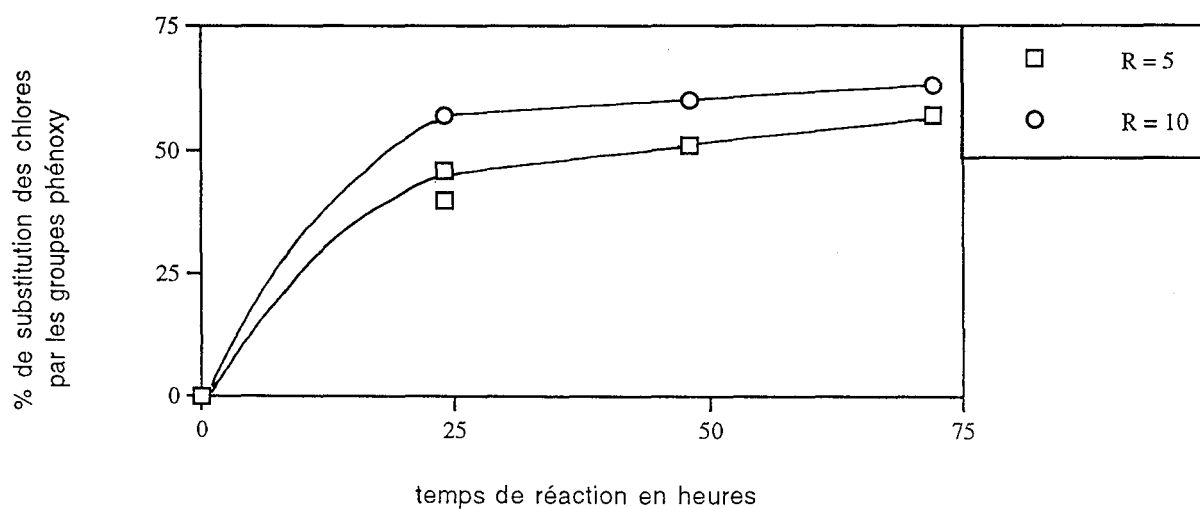


Figure II.4 : Influence de la durée de réaction et du rapport molaire R sur le pourcentage de substitution en groupes phénoxy du polymère $DexCl_1$ dont les caractéristiques sont données dans le tableau II.1. (R = nombre de moles de phénol/nombre de moles de chlore lié)

2-2-2-3 Optimisation de la réaction

Les conditions opératoires ont été adaptées en fonction du taux substitution en groupes phénoxy désiré. L'étude de la fixation des phénates sur le dextrane-chlorhydrine consiste à comparer les taux de phénoxy obtenus, résultant des variations conjointes de la durée, de la température de la réaction et du rapport molaire R. Celui-ci est défini comme étant le rapport du nombre de moles de phénol au nombre de moles de chlore lié au DexCl. L'optimisation de cette étape a été réalisée, dans la plupart des cas, à partir de 1 g de DexCl₁ substitué à raison de 0,68 mmol de chlore/g.

Les résultats sont reportés dans le tableau II.2 et sur la figure II.4 et appellent un certain nombre de commentaires.

R	Durée en heures	Taux de groupements phénoxy	
		en mmol/g	% substitution par rapport au taux de chlore
50	24	0,50	73
35	24	0,45	66
10	24	0,39	57
10 (a)	24	0,37	54
5	24	0,27	40
5 (b)	24	0,29	46
3	24	0,16	23
2	24	0,14	20
1	24	0,08	12
87	48	0,62	91
87 (c)	48	0,60	88
8,8	48	0,41	60
5	48	0,35	51
100	72	0,61	90
10	72	0,43	63
5	72	0,39	57

Tableau II.2 : Influence des conditions expérimentales sur la réaction des ions phénates avec le DexCl₁ (1g, 0,68 mmol de chlore/g), à température ambiante, à l'exception de :

(a) : synthèse réalisée à partir de 6 g de DexCl₁ (\overline{M} SEC en éq. pullulanes < 6 000 g/mol)

(b) : synthèse réalisée à partir de 1 g de DexCl₂ (\overline{M} SEC en éq. pullulanes ≈ 16 000 g/mol)

(c) : synthèse réalisée à partir de 1 g de DexCl₁ à 60°C

- Un large excès de phénol est requis pour atteindre des taux de substitution élevés. L'obtention de taux de substitution plus faibles (≤ 10 %) n'est possible qu'avec des rapports molaires R inférieurs à 2.

- L'influence de la température a été étudiée pour un rapport molaire $R = 87$. L'augmentation de la température n'a pas permis d'augmenter le taux de substitution des chlores par les phénates. Pour la suite des travaux, la réaction a été réalisée à température ambiante.

- Lorsque la réaction est réalisée sur une plus grande quantité de polymère (6 g au lieu de 1 g), le taux de substitution obtenu est légèrement plus faible.

- Une augmentation du temps de réaction au delà de 24 heures ne s'accompagne que d'une faible augmentation du taux de substitution. La cinétique de réaction est en fait plus rapide dans les premières 24 heures.

- Enfin, la reproductibilité de cette réaction a été testée sur deux dérivés chlorés DexCl₁ et DexCl₂ de masses moléculaires différentes mais de taux de chlore comparables (cf tableau II.1). Les résultats obtenus pour $R = 5$, indiquent que l'influence de la masse moléculaire est faible.

Cette étude préliminaire apporte de nombreux renseignements quant à la réactivité des dextrans-chlorhydrines vis-à-vis de phénates. A partir d'un même dérivé chloré DexCl, il est possible en faisant varier essentiellement le rapport R de préparer des dérivés DexP ayant des taux de substitution en groupements phénoxy variables.

Pour la suite de ce travail, trois dérivés du dextrane possédant des taux de substitution différents ont été préparés. Le tableau II.3 résume les conditions requises selon le taux de groupements phénoxy souhaité. Les dextrans hydrophobisés seront nommés DexPA, DexPB et DexPC selon leur teneur en groupes phénoxy et une extension numérique apparaîtra pour distinguer les différents lots préparés.

polymères DexP	rapport molaire R	durée (h)
Taux faibles : DexPC 0,05 à 0,06 mmol de groupes phénoxy / g de polymère	$0,8 < R < 1$	24
Taux intermédiaires : DexPA 0,10 à 0,15 mmol de groupes phénoxy / g de polymère	$1 \leq R < 2$	24
Taux élevés : DexPB 0,50 à 0,60 mmol de groupes phénoxy / g de polymère	$R \gg 50$	72

Tableau II.3 : Conditions de synthèse optimales des dextrans-phénoxy ($pH = 11$)

Toutes les réactions ont lieu à pH 11. En présence d'un grand excès de phénol (cas des DexPB), le pH du mélange réactionnel reste stable, les ions phénates en excès jouant un rôle tampon.

Dans les autres cas, la quantité d'ions phénates étant plus faible, il est nécessaire de maintenir le pH par addition de soude, pour éviter que le pH ne baisse rapidement au cours de la réaction de substitution.

Après la réaction de fixation du phénol, une étape de purification est nécessaire pour extraire les ions phénates en excès. Plusieurs méthodes ont été testées à savoir la dialyse, l'ultrafiltration, la précipitation dans l'éthanol et l'extraction solide/liquide par le dichlorométhane à reflux, l'éthanol et le dichlorométhane étant de bons solvants du phénol.

Étant donné le large excès de phénol dans certains cas, les méthodes classiques de purification par dialyse ou ultrafiltration s'avèrent longues et peu efficaces, et n'ont donc pas été utilisées par la suite.

La précipitation du polymère dans l'éthanol a alors été envisagée, après acidification du milieu à pH 6. Dans ces conditions, les ions phénates se protonent ($pK_a = 9$) et sont alors solubles dans le solvant organique. Le polymère est ensuite purifié par extraction au dichlorométhane.

2-2-2-4 Hydrolyse des chlores résiduels

Lorsque les polymères-phénoxy sont exempts de phénol, il convient d'hydrolyser les fonctions chlore restantes c'est-à-dire non substituées par des groupes phénoxy. La présence de chlore sur les dextrans n'est pas souhaitable compte tenu d'une part de leur caractère hydrophobe (adsorption, interaction parasite) et d'autre part de leur réactivité (réticulations, ...). Plusieurs essais d'hydrolyse de 48 heures ont été menés avec des concentrations en soude différentes.

[NaOH] en M	0,01	0,1	1
Taux de chlore résiduel (mmol/g)	0,15	0,1	< 0,05

Tableau II.4 : Influence de la concentration de soude utilisée sur l'hydrolyse des fonctions chlores

Quel que soit le polymère traité, le taux de chlore résiduel après 48 heures dans la soude 1M est inférieur à 0,05 mmol/g (limite de détection). Cette étape d'hydrolyse en milieu très alcalin ne provoque pas de changement du profil de distribution en masses molaires des DexP en SEC. Après hydrolyse des chlores résiduels, les polymères sont purifiés par une dialyse de 3 jours contre de l'eau distillée (seuil de coupure de la membrane de dialyse 6 000-8 000 g/mol).

3 - PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES POLYMÈRES EN SOLUTION

3-1 DÉTERMINATION DES MASSES MOLÉCULAIRES MOYENNES

3-1-1 Étude préliminaire par chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

De nombreux chromatogrammes ont été obtenus dans plusieurs éluants visant à mettre en évidence la pureté des polymères, les changements de volume hydrodynamique survenus au cours des diverses étapes de préparation, la répartition des noyaux aromatiques sur les dextrans et à estimer dans certains cas la masse molaire moyenne notée \overline{M}_{SEC} , en équivalents pullulanes. Dans le cadre de cette étude préliminaire, les conditions optimales requises ont été recherchées pour la détermination correcte des masses molaires moyennes des polymères par diffusion de la lumière laser .

3-1-1-1 Principe

La chromatographie d'exclusion stérique est fondée sur la rétention sélective des molécules de soluté en fonction de leur taille, en raison de leur différence de pénétration dans les pores du support qui constitue la phase stationnaire. Les espèces les plus petites pénètrent à l'intérieur des billes constituant le support et sont toutes éluées pour le même volume appelé volume de perméation totale noté V_t . Les espèces de taille supérieure cheminent d'autant moins facilement à l'intérieur des pores qu'elles sont volumineuses ; elles effectuent donc un trajet plus court et sont éluées dans la zone de fractionnement du support V_e .

Au delà d'une certaine limite, les macromolécules ne cheminent qu'à l'extérieur des particules et seront éluées ensemble au volume d'exclusion noté V_o ou volume mort.

Cette technique permet d'une part, de vérifier la pureté des polymères (présence de petites molécules) et d'autre part de mettre en évidence les changements de volume hydrodynamique des espèces après réaction.

Une détermination de la masse molaire \overline{M}_{SEC} fiable n'est possible que si l'on dispose d'étalons isomoléculaires de même nature (ramifications, substituants...) et en l'absence d'interaction support-polymère. Dans le cas contraire, les résultats obtenus pour une même série de polymères sont comparables entre eux mais ne permettent pas d'obtenir des valeurs exploitables de façon absolue.

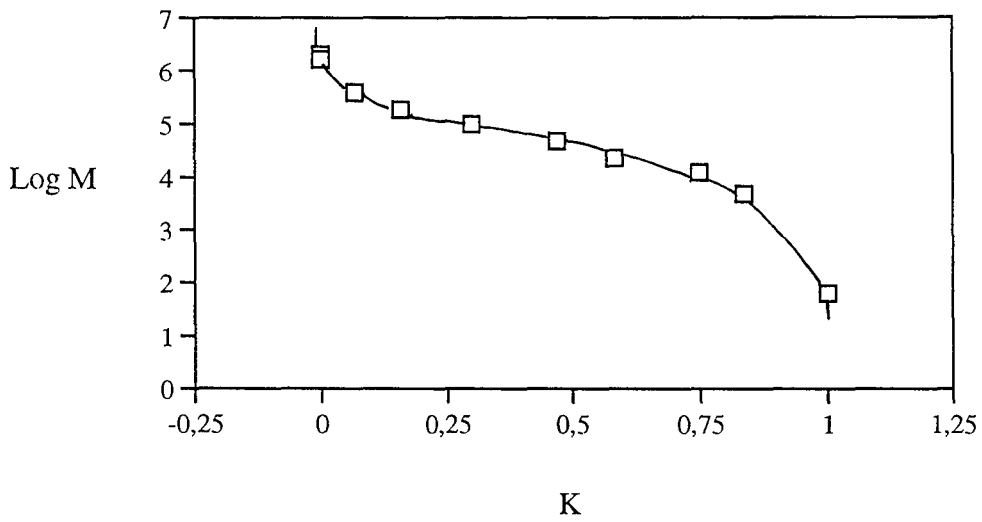


Figure II.5 : Courbe d'étalonnage de la colonne Lichrospher Diol Si 300 (250 X 10 mm de D. I.) en tampon phosphate 0,05M pH 7,2 avec des standards de pullulanes.

3-1-1-2 Conditions expérimentales

Les conditions dans lesquelles les divers chromatogrammes des polymères étudiés ont été obtenus sont détaillées ci-dessous :

La colonne est de type Lichrospher Diol Si 300 (250 x 10 mm) commercialisée par MERCK. Le diamètre moyen des particules est de 10 μm . La pompe utilisée est le modèle MERCK 655-A1LC. Une double détection simultanée est possible à l'aide d'un réfractomètre différentiel Waters noté RI, et d'un détecteur UV-Vis Spectraphysics à $\lambda = 269 \text{ nm}$ pour les dextrans-phénoxy ; les deux détecteurs sont couplés en série.

Le système CLHP utilisé contient une vanne rhéodyne équipée d'une boucle d'injection de 20 μL . L'enregistrement des signaux est réalisé au moyen d'un intégrateur Spectraphysics RP-4400 possédant 2 voies de fonctionnement. Enfin, cet appareillage est équipé d'un système de by-pass qui permet de vérifier si les solutés sont élués de façon quantitative. Ce système est constitué d'un tube de diamètre plus large (50 x 2,1 mm D.I.), placé entre la boucle d'injection et le détecteur. Il permet la dilution d'une injection, ce qui facilite l'intégration du signal obtenu. Les conditions d'éluion sont fixées dans chaque cas avec un débit de 0,7 mL/min et les solutés concentrés à 5 g/L sont préparés dans l'éluant utilisé. Avant injection, les solutions de polymères sont filtrées sur filtre Millipore (en esters de cellulose) ; moins de 2 % de produit sont retenus lors de cette filtration.

Quatre éluants ont été retenus pour la caractérisation chromatographique des polymères. Tous les éluants sont filtrés sur membrane Millipore de 0,45 μm .

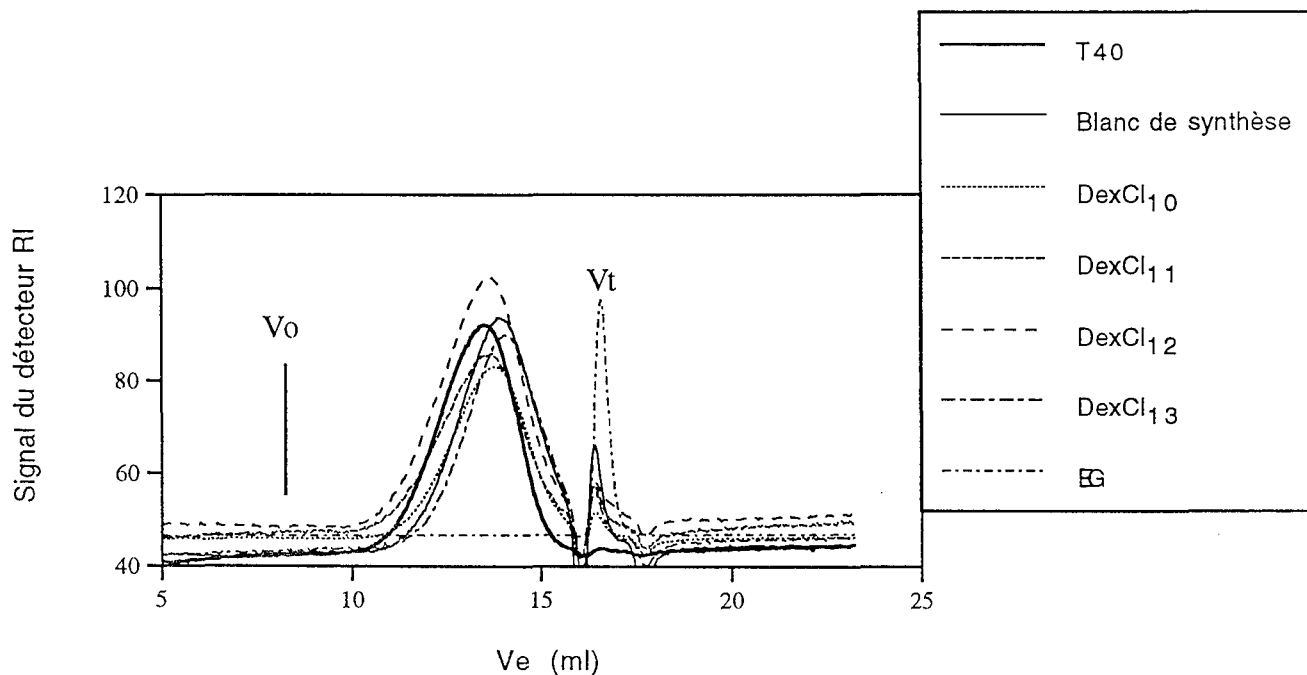
Une courbe d'étalonnage simple de la colonne a été réalisée à partir de standards de pullulanes (Pharmacia, Uppsala, Suède) comme le montre la figure II.5. Le domaine de fractionnement linéaire de la colonne est donc compris entre 200 000 et 10 000 g/mol en équivalents pullulanes.

3-1-1-3 Étude en milieu phosphate

Cet éluant (tampon phosphate à 0,05 M pH 7,2) est utilisé en première approche pour vérifier la pureté des dextrans après modification chimique et évaluer leur volume hydrodynamique.

a) Caractérisation des dextrans-chlorhydrines

Plusieurs dextrans-chlorhydrines ont été préparés et caractérisés quant à leur taux de substitution et leurs masses moléculaires moyennes. Un témoin nommé blanc de synthèse a également été traité en présence de $\text{Zn}(\text{BF}_4)_2$, en milieu acide, sans addition d'épichlorhydrine. La préparation de ce témoin, réalisée dans les conditions optimales de synthèse, permet de mettre clairement en évidence l'influence du pH réactionnel sur la diminution de la masse moléculaire des polymères. Les profils chromatographiques de plusieurs dextrans-chlorhydrines en tampon phosphate sont représentés sur la figure II.6. Les pics caractéristiques



*Figure II.6 : Chromatogrammes de dextrans-chlohydrines en tampon phosphate sur la colonne Lichrospher Diol Si 300 (250 x 10 mm de D. I.) à 0,7 mL/min.
Avec V_o : volume d'exclusion évalué par le P1600 (pullulane de $M = 1600$ kg/mol)
 V_t : volume de perméation totale de la colonne évalué par l'éthylène glycol noté EG*

des DexCl sont assez peu différents les uns des autres. Le tableau II.5 reprend les caractéristiques physico-chimiques des dextrans chlorés formés.

DexCl _i	Taux de chlore (mmol/g)	M _{SEC} (g/mol) en équivalents pullulanes
	Potentiométrie	
T40	—	22 200
T40 *	—	25 100
Blanc de synthèse	—	17 500
5	0,63	18 900
6	0,63	19 000
7	0,68	18 200
8	0,70	17 100
9	0,68 **0,685	12 200
10	0,65 ** 0,653	18 700
11*	0,65 ** 0,656	19 900
12*	0,69 ** 0,685	20 400
13	0,65 ** 0,653	16 000

Tableau II.5 : Caractéristiques des dextrans-chlorhydrines synthétisés à partir du dextrane T40 (* lot de T40 n°2) à pH compris entre 1,1 et 1,2. (** dosages CNRS)

Dans le tableau, on peut noter une bonne reproductibilité des résultats, tant en ce qui concerne les taux de chlore estimés à 0,65 mmol/g, qu'en ce qui concerne les profils chromatographiques des dérivés préparés. D'une manière générale, tous les DexCl (exception faite du DexCl₉) ont un volume hydrodynamique plus faible que celui du dextrane natif et équivalent à celui du blanc de synthèse. Cette diminution de volume hydrodynamique est de toute évidence attribuable aux coupures de chaînes survenues à pH acide et non à d'éventuelles réticulations intramoléculaires en présence d'épichlorhydrine.

b) Caractérisation des dextrans-phénoxy

Les figures II.7 a,b,c permettent de comparer les chromatogrammes représentatifs des dextrans natifs et hydrophobisés obtenus en tampon phosphate pH 7, 0,05 M. Il apparaît que le temps de séjour des dextrans-phénoxy dans la colonne est plus grand que celui de leur polymère parent. Ce phénomène est d'autant plus marqué que leur taux de substitution en groupements phénoxy est grand. L'augmentation du temps de rétention peut s'expliquer par une réduction du volume hydrodynamique V_H lié soit à une nouvelle dégradation des chaînes

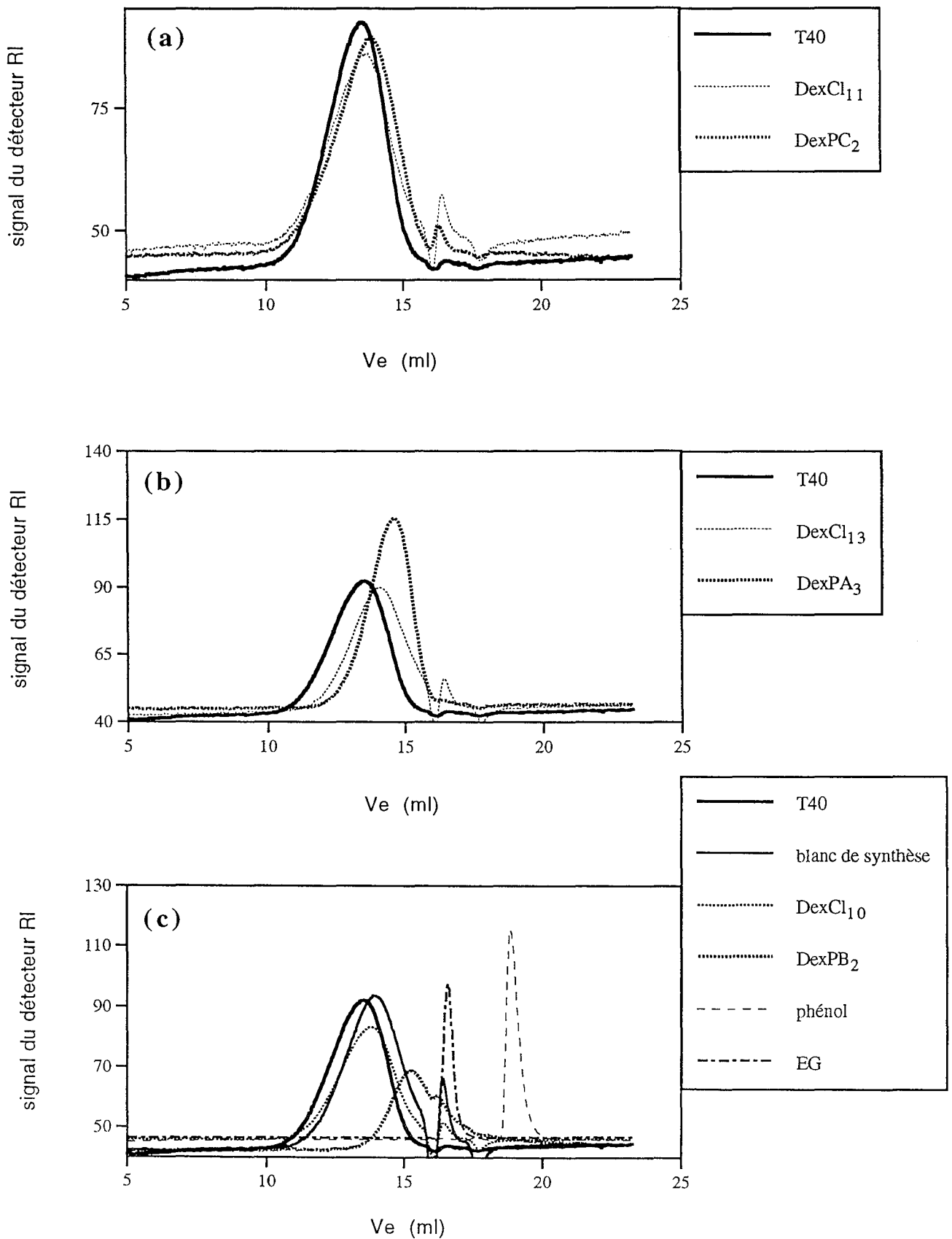


Figure II.7 : Chromatogrammes de divers dextrans-phénoxy et de leurs précurseurs chlorés en tampon phosphate sur la colonne Lichrospher Diol SI 300 avec (a) DexPC (0,05 mmol de phénoxy/g), (b) DexPA (0,10 mmol/g) et (c) DexPB (0,56 mmol/g).

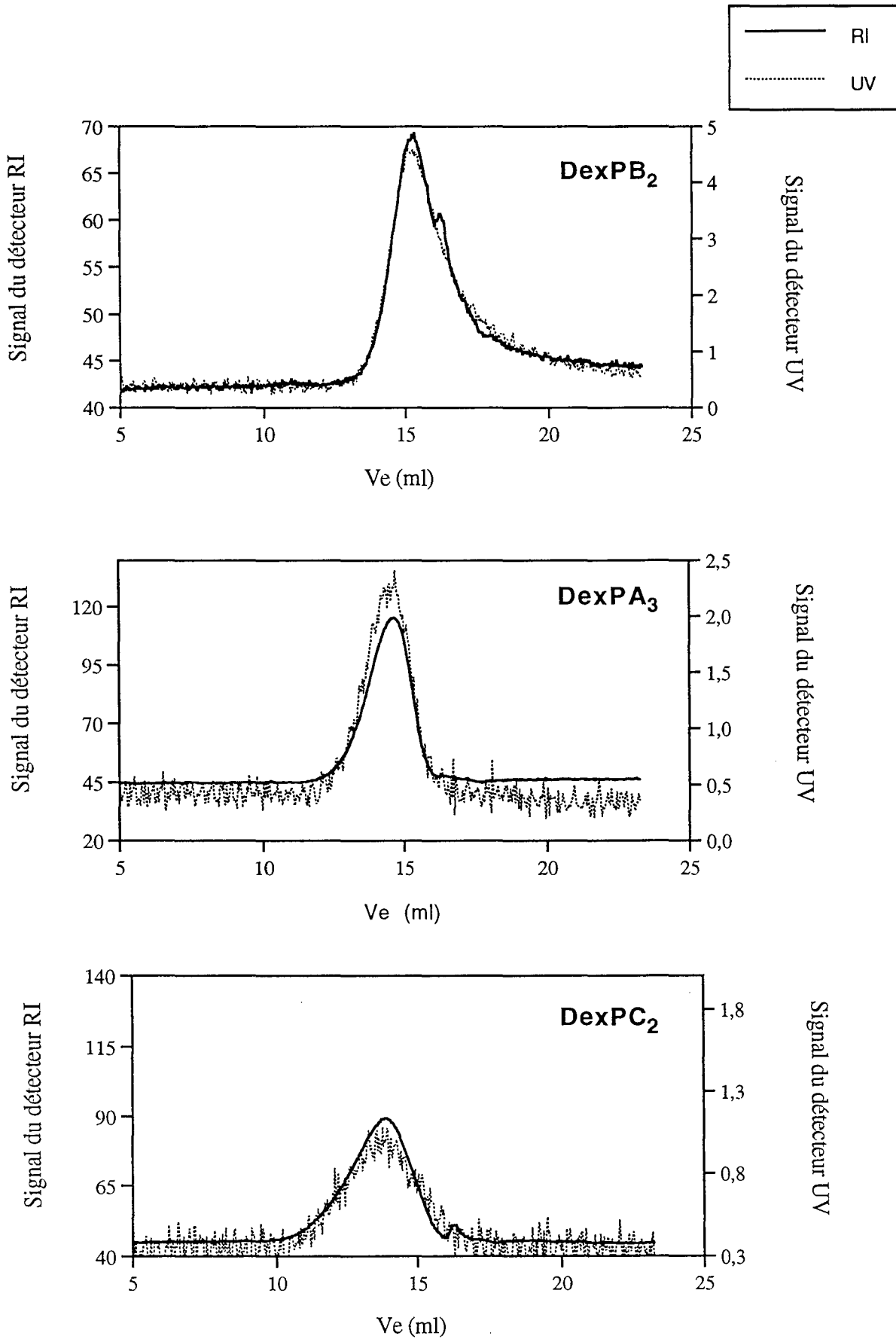


Figure II.8 : Chromatogrammes de dextrans-phénoxy en tampon phosphate sur la colonne Lichrospher Diol Si 300 - double détection UV-RI avec DexPB₂ (0,56 mmol de phénoxy /g), DexPA₃ (0,10 mmol/g) et DexPC₂ (0,05 mmol/g).

macromoléculaires au cours de la seconde étape de synthèse, soit à un changement de conformation de la pelote macromoléculaire (compacité).

On pourrait également expliquer cette augmentation du temps de rétention par la présence d'interactions non-spécifiques entre la colonne et les solutés, conduisant à une baisse apparente du volume hydrodynamique des espèces concernées. En effet, ces polymères sont élués de façon d'autant moins quantitative qu'ils possèdent un taux plus élevé en groupes phénoxy (tableau II.6), ce qui semble confirmer la présence d'interactions non-spécifiques avec le support dans ces conditions.

Polymère DexP	Taux de groupes phénoxy (mmol/g)	% de polymère élué
T40	—	100 %
blanc de synthèse	—	100 %
DexPA ₁ (7)	0,14	80 %
DexPA ₂ (9)	0,12	
DexPA ₃ (13)	0,10	
DexPB ₁ (8)	0,60	50 %
DexPB ₂ (10)	0,56	
DexPB ₃ (12)	0,52	
DexPC ₁ (8)	0,05	90 %
DexPC ₂ (11)	0,06	

Tableau II.6 : Pourcentages de dextranses-phénoxy élués en fonction de leur taux de substitution en groupes phénoxy . Le chiffre entre parenthèses indique le lot de dextrane-chloré dont le DexP est issu.

Les masses moléculaires moyennes \overline{M}_{SEC} ne peuvent donc pas être estimées à partir de la courbe d'étalonnage en pullulanes en raison de ces interactions non-spécifiques avec la phase stationnaire.

Le phénol est élué à un volume de rétention supérieur au volume de perméation totale de la colonne, lui-même estimé par l'éluion de l'éthylène glycol. Le pic caractéristique du phénol présente une traînée arrière très importante (figure II.7 c), liée probablement à la présence d'interactions non-spécifiques avec la colonne. Néanmoins, les chromatogrammes des DexP montrent clairement que les dextranses-phénoxy sont exempts de phénol résiduel.

De plus, les pics des dextranses modifiés issus de la double détection UV et réfractométrique sont superposables (figure II.8). Cette remarque permet de conclure quant à une répartition homogène des groupements phénoxy le long de la chaîne macromoléculaire, quelle que soit sa longueur.

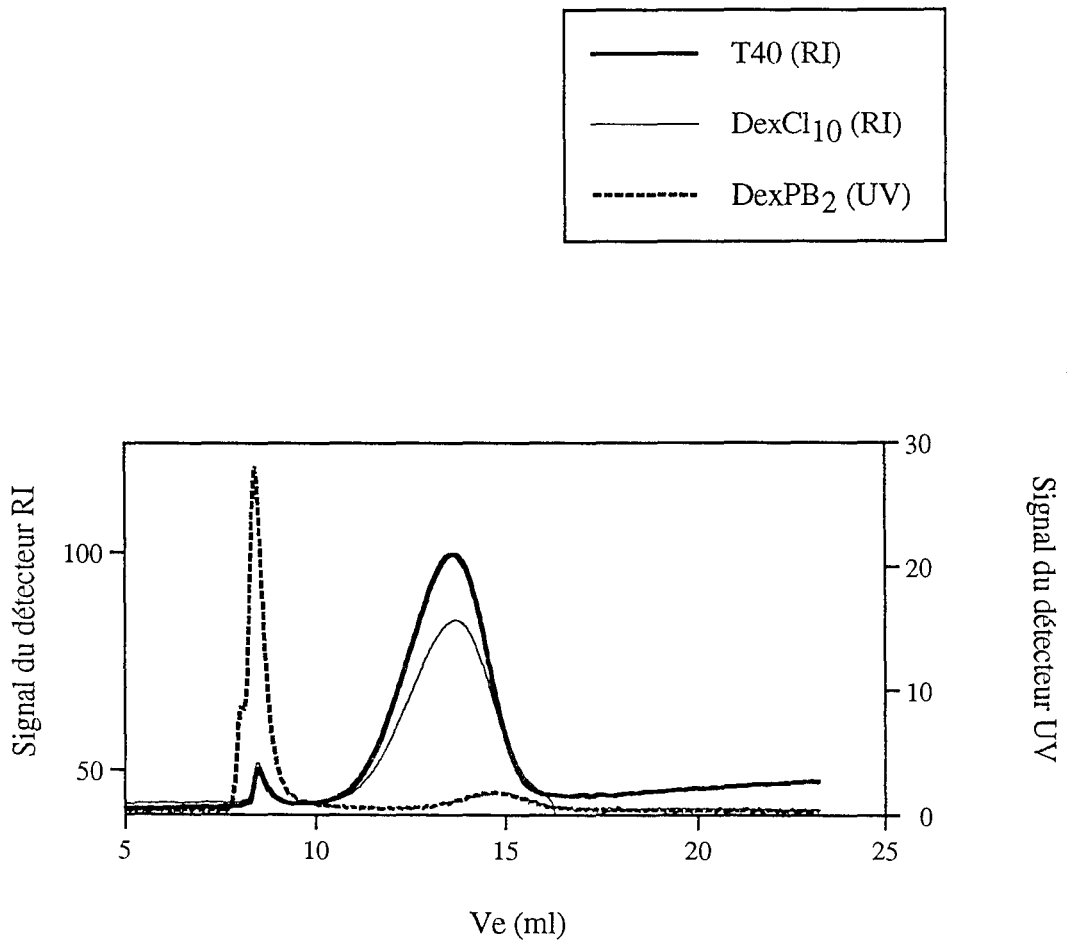


Figure II.9 : Chromatogrammes de divers dextrans en milieu eau/méthanol (80/20 %v/v) sur la colonne Lichrospher Diol SI 300

3-1-1-4 Étude en présence de solvant organique:

L'addition d'un solvant organique très polaire tel que l'acétonitrile ou le méthanol dans un éluant aqueux est une méthode couramment utilisée pour réduire les interactions non-spécifiques de type hydrophobe pouvant s'établir entre les polymères et la phase stationnaire. Dans un mélange eau/méthanol (80/20 % V/V), les profils chromatographiques des divers dextranses sont très significativement différents de ceux obtenus en présence de phosphate. Le dextrane et ses dérivés chlorés présentent un pic au volume exclu de la colonne. Les dextranses-phénoxy, quant à eux, sont exclus en quasi totalité (figure II.9). Ce profil particulier peut s'expliquer par un phénomène d'exclusion d'anions, provoqué par la présence simultanée de charges négatives sur les polymères et de silanolates à la surface des particules de silice qui composent la phase stationnaire. En ce qui concerne les dextranses non modifiés, cet effet a déjà été observé et décrit dans la littérature (16). Ceci laisse donc à penser que les dextranses sont porteurs de quelques charges négatives et que l'étape de greffage des groupes phénoxy génère des nouvelles charges. Le dosage de ces charges par potentiométrie a été entrepris mais leur quantité est trop faible et inférieure à la limite de détection de l'appareillage utilisé ($<10^{-5}$ mol/g de polymère).

Les chromatogrammes correspondants à l'élution des différents polymères en milieu tamponné phosphate/méthanol (80/20 % V/V) sont présentés sur la figure II.10. La présence de tampon phosphate tend à supprimer le phénomène d'exclusion d'ions précédemment observé, par écrantage des charges. Il convient de noter que le temps de rétention du dextrane sur la colonne augmente légèrement comparativement au temps de rétention obtenu en milieu phosphate. Ceci peut être attribué à une légère modification du volume hydrodynamique du polysaccharide dans cet éluant. Il est vraisemblable, en effet, que la présence de méthanol diminue le pouvoir solvatant de l'éluant vis-à-vis du dextrane, celui-ci adoptant alors une conformation plus compacte et donc un volume hydrodynamique plus faible. En ce qui concerne les dextranses-phénoxy, on note par contre une diminution de leur temps de rétention en présence de méthanol et une déformation moins importante des pics. Par ailleurs, les polymères sont cette fois élués de la colonne de façon quantitative. Il semble donc que la présence de méthanol dans l'éluant permette de réduire significativement l'adsorption du dextrane modifié sur le support chromatographique considéré.

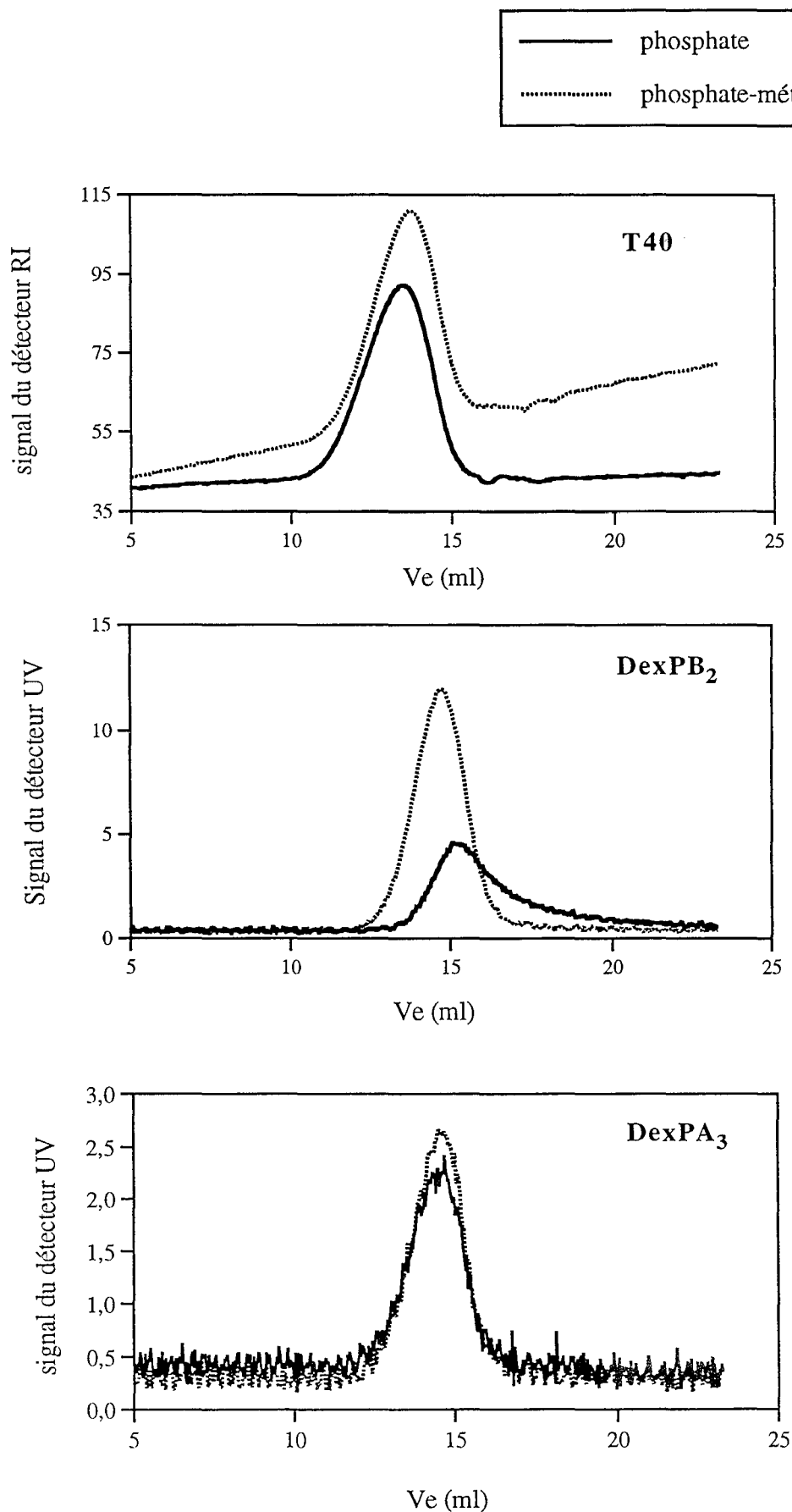


Figure II.10 : Chromatogrammes de divers dextrans : T40, DexPB₂ (0,56 mmol de phénoxy/g de polymère) et DexPA₃ (0,10 mmol de phénoxy/g de polymère) en milieu tamponné en l'absence ou non de méthanol sur la colonne Lichrospher Diol Si 300.

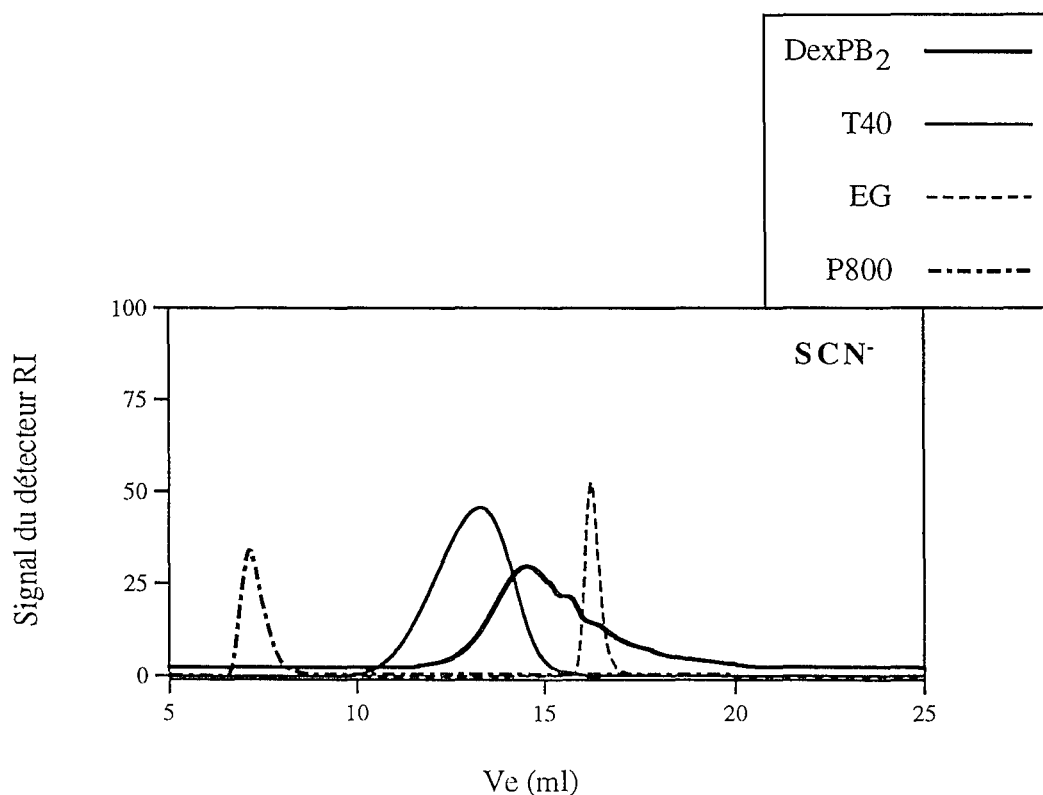
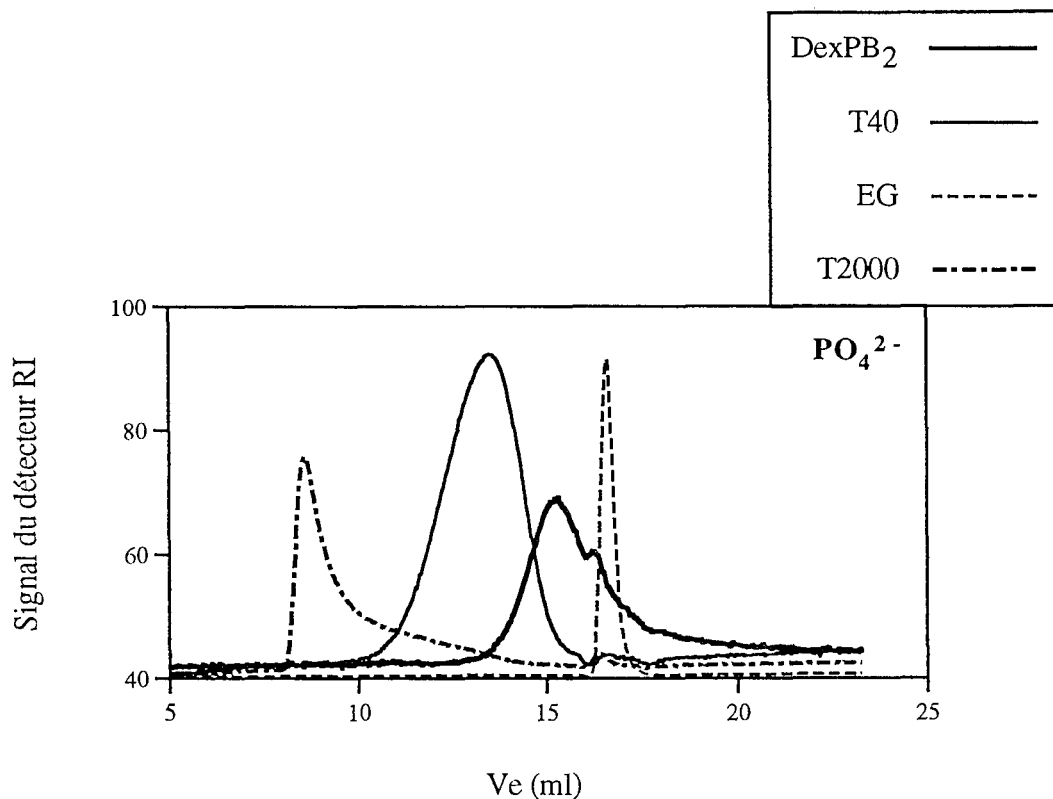


Figure II.11 : Comparaison des profils chromatographiques du dextrane natif et d'un dextrane modifié (0,56 mmol de phénoxy/g de polymère) obtenus sur la colonne Lichrospher Diol Si 300 à 0,7 ml/min dans un tampon phosphate à 0,05 M (a) et dans KSCN à 0,2 M (b).

Le volume total est évalué par le pic de l'éthylène glycol (EG), le volume d'exclusion est mesuré par des polysaccharides de masse moléculaire élevée .

(a : dextrane T2000 de $M_p = 2\,000$ kg/mol, b : pullulane P800 de $M_p = 800$ kg/mol)

Cependant, la présence de solvant organique dans l'éluant rend difficile la stabilisation du détecteur réfractométrique différentiel. Par la suite, nous avons pu constater que la mesure de dn/dC dans ces conditions était très difficile et les résultats obtenus peu précis. dn/dC représente la variation de l'indice de réfraction du solvant avec la concentration du polymère utilisé. Cette valeur est nécessaire au calcul des \overline{M}_p par diffusion de la lumière laser. Les chromatogrammes présentent dans de nombreux cas, une dérive de leur ligne de base, ainsi qu'un pic négatif (défaut de solvant) avoisinant le V_t . En raison de ces problèmes, l'utilisation de solvant mixte doit donc être évitée car les résultats obtenus pour la détermination des masses molaires des polymères ne sont pas reproductibles.

3-1-1-5 Étude en présence de thiocyanate de potassium (KSCN)

Nous avons donc été amené à considérer un nouvel éluant composé de KSCN 0,2M. La présence d'ions chaotropiques tels que SCN^- dans l'éluant défavorise la formation d'interactions hydrophobes. Les profils chromatographiques des dextrans de départ et modifiés obtenus dans cet éluant sont sensiblement équivalents à ceux obtenus en tampon phosphate (figure II.11). Néanmoins, les volumes sont comparables à ceux obtenus en phosphate/méthanol et les polymères sont élués quantitativement. Les interactions avec la colonne semblent donc minimisées dans ce milieu. A partir de ces considérations, la détermination des masses moléculaires moyennes par diffusion de la lumière laser en KSCN 0,2 M est possible.

3-1-2 Étude par diffusion de la lumière laser

3-1-2-1 Rappels théoriques

Un photogoniométrique permet de déterminer le rapport de Rayleigh défini par :

$$\Delta R(\theta) = \frac{I_\theta}{I_0} \times \frac{r^2}{V_0} \quad [1]$$

où I_θ est l'intensité de la lumière diffusée par le volume de diffusion V mesuré à la distance r de l'échantillon. I_0 est l'intensité de la lumière incidente.

A partir du rapport de Rayleigh, on accède à la masse molaire moyenne en poids \overline{M}_p par la relation [2] :

$$\frac{KC}{\Delta R(\theta)} = \left(\frac{1}{\overline{M}_p} + 2A_2 C + \dots \right) \frac{1}{P(\theta)} \quad [2]$$

où K a pour expression $K = 4\pi^2 n^2 \frac{(dn/dC)}{\lambda N}$ [3]

avec C : la concentration du polymère

A_2 : 2nd coefficient du Viriel

n : indice de réfraction du solvant pur

dn/dC : variation de l'indice de réfraction du solvant avec la concentration du polymère

λ : longueur d'onde incidente (632,8 nm)

N : nombre d'Avogadro

C : concentration du polymère en solution

$P(\theta)$ est appelé facteur de diffusion et tient compte de l'atténuation de l'intensité diffusée dans le cas de solutions diluées de polymères.

$P(\theta)$ a pour expression $P(\theta) = \Delta R(\theta)/\Delta R^0(\theta)$ et tend vers 1 dans le cas de solutions idéales (petites molécules) comme le montre l'équation [4] :

$$P(\theta) = 1 - \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \sin^2 \frac{\theta}{2} \quad [4]$$

$P(\theta)$ étant évalué par la relation [4] et les termes de l'expression [2] explicités, l'expression globale s'écrit finalement comme suit [5]:

$$\boxed{\frac{KC}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{\overline{M}_p} + 2A_2C + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} R_g \sin^2 \frac{\theta}{2}} \quad [5]$$

La méthode graphique de Zimm $\frac{KC}{\Delta R_\theta} = f(C, \theta)$ découle directement de cette expression. La double extrapolation à angle nul et à concentration nulle conduit à la détermination de $1/\overline{M}_p$. Les pentes à angle nul et à concentration nulle amènent respectivement aux valeurs de A_2 et du rayon de giration R_g ($\langle R_g^2 \rangle^{1/2}$ rayon moyen d'ordre z dans le cas de polymère polydispersé).

3-1-2-2 Équipements et conditions opératoires

Deux types d'appareils sont à notre disposition pour réaliser des mesures de masse moléculaire en poids par diffusion de la lumière laser. Nous avons eu recours à un appareil de diffusion de la lumière laser aux petits angles ou LALLS en mode statique et à un photodiffusiomètre multi-angles ou MALLS en mode dynamique, c'est à dire, couplé à une colonne chromatographique d'exclusion stérique.

a) Cas du LALLS

Les mesures de diffusion de la lumière laser sont réalisées au moyen du Chromatrix KMX 6 (Milton Roy, Wyatt Technology Corporation, E.U.) avec $\lambda = 632,8$ nm à un angle d'observation fixé à 6° . La variation de la concentration du polymère (0,5 à 2 g/l) conduit à la détermination de \overline{M}_p . Les solutions sont filtrées sur filtre Millex (Millipore) de $0,22 \mu\text{m}$ ainsi que l'éluant. Un filtre de même nature est placé on-line dans le dispositif.

Les mesures par diffusion de la lumière laser aux petits angles (LALLS) ont été réalisées exclusivement dans des conditions statiques, le logiciel en place n'étant pas adapté à une utilisation en mode dynamique.

b) Cas du MALLS

Le photodiffusiomètre ($\lambda = 632,8$ nm) Wyatt Dawn modèle F commercialisé par la firme précédente, est constitué de plusieurs photodiodes qui mesurent l'intensité diffusée à 18 angles d'observation compris entre 10° et 175° . Le couplage de cet appareil avec un système d'exclusion stérique muni d'un réfractomètre différentiel noté SEC-MALLS, permet l'accès aux diverses masses molaires moyennes en nombre, en poids, d'ordre z , aux indices de polymolécularité ainsi qu'à la distribution des masses molaires et au rayon de giration ($R_g > 100$ Å). Les mesures sont pilotées et traitées simultanément par le logiciel ASTRA (Wyatt Technology Corporation). Le système chromatographique est détaillé ci-dessous :

Pompe : Merck 655-A1LC

Détecteur : réfractomètre différentiel (Waters)

Colonne Lichrospher Diol SI 300 $10 \mu\text{m}$ (10x250) Merck

Débit : 0,7 mL/min

Injections de 20 μl

Les solutions à injecter sont préparées dans l'éluant à 2 g/L et agitées vigoureusement pendant plusieurs heures. Ce système et le traitement qui s'en suit permettent d'évaluer la quantité éluee exactement. Une seule concentration injectée suffit donc pour connaître \overline{M}_p , et la distribution des masses molaires. Les R_g des polymères que nous avons testés sont trop faibles pour être évalués de façon correcte et les \overline{M}_n sont surestimées. En effet, dans ce type de calcul, chaque tranche du chromatogramme est attribuée à une fraction isomoléculaire M_i du dextrane alors qu'il s'agit en fait de fractions polymoléculaires de masse moyenne M_{pi} . L'utilisation de colonnes plus résolutive aurait vraisemblablement permis d'obtenir des valeurs de \overline{M}_n plus exactes.

Les valeurs des dn/dc sont mesurées par un réfractomètre différentiel Optilab 903 (Wyatt Technology Corporation) en connaissant la teneur en eau de chaque polymère. Celle-ci est quantifiée par séchage sous vide de 2 heures à 65°C suivi d'un refroidissement jusqu'à température ambiante.

3-1-2-3 Détermination des masses molaires moyennes

Les dextrans-phénoxy et leurs précurseurs ont été caractérisés au LALLS et/ou au MALLS dans KSCN 0,2M. Les éluions effectuées en SEC-MALLS sont quantifiées par le logiciel en connaissant les valeurs de dn/dc , ce qui permet une correction de la concentration.

Les masses molaires moyennes en poids et en nombre sont données dans le tableau II.7. La précision des valeurs avoisine 10 %.

Polymère	Taux de groupes phénoxy en mmol/g	\overline{M}_p LALLS (g/mol)	\overline{M}_p MALLS (g/mol)	\overline{M}_n MALLS (g/mol)
T40 lot n°1	-	40 600	37 200	31 300
T40 lot n°2	-	45 300	43200	34 700
Blanc de synthèse (issu du lot n°1)	-	31 600	32000	25 700
DexCl ₇	-	35 700	ND	-
DexPA ₁ (7)	0,14	45 050	ND	-
DexCl ₉	-	11 850	ND	-
DexPA ₂ (9)	0,12	10 350	12 000	10 600
DexCl ₁₃	-	29 900	29 900	23 000
DexPA ₃ (13)	0,10	20 100	22 000	16 900
DexCl ₈	-	30 300	ND	-
DexPB ₁ (8)	0,60	157 300	32 400	-
DexCl ₁₀	-	37 300	36 600	29 950
DexPB ₂ (10)	0,56	65 600	29 200	23 150
DexCl ₁₂	-	41 500	38 600	29 300
DexPB ₃ (12)	0,51	127 300	36 800	32 000
DexCl ₈	-	30 300	ND	-
DexPC ₁ (8)	0,05	29 300	24 400	17 300
DexCl ₁₁	-	45 650	44 200	33 750
DexPC ₂ (11)	0,06	40 050	36 600	27 700

Tableau II.7 : \overline{M}_n et \overline{M}_p des dextrans et de leurs dérivés chlorés et phénoxy estimées au LALLS et au SEC/MALLS. Le chiffre entre parenthèses qui succède à un DexP, indique le lot de DexCl dont il provient. Seuls les DexCl₁₁ et DexCl₁₂ sont issus du lot de T40 n°2.

Les résultats obtenus sont riches en renseignements.

On notera : - une diminution des \overline{M}_p des dextrans chlorés par rapport au dextrane, confirmant déjà les résultats obtenus en SEC,

- une surestimation plus ou moins importante des \overline{M}_p des dextrans-phénoxy DexPB, à taux de substitution élevé en groupes phénoxy, par la mesure au LALLS.

Ceci est vraisemblablement lié à la présence d'agrégats de polymère de haute masse molaire dans la solution. Même en présence d'ions chaotropes, certaines interactions entre les chaînes de polymères subsistent, ce qui laisse supposer que ce dérivé présente un caractère associatif non négligeable. Notons que la formation d'agrégats a également été mise en évidence dans l'eau sur tous les DexP, même les moins substitués en groupes phénoxy. Concernant ces dérivés DexPB, la discordance des résultats obtenus au LALLS et au SEC/MALLS est liée au fait que, dans le second cas, la colonne interposée entre l'injecteur et le détecteur peut jouer le rôle de filtre, empêchant l'élution des agrégats. Quoiqu'il en soit, ces agrégats sont minoritaires car l'élution sur la colonne est quasi-quantitative.

- une bonne corrélation entre les analyses effectuées par les deux équipements lorsque les échantillons sont peu ou pas porteurs de noyaux aromatiques.

Tous les dextrans modifiés présentent des \overline{M}_p inférieures aux dextrans T40. Les DexP possèdent des masses molaires moyennes en poids comprises entre 20 000 et 30 000 g/mol à l'exception du DexPA₂ dont le précurseur chloré a subi des coupures de chaînes importantes. Soulignons aussi que les profils chromatographiques obtenus en SEC ne montrent pas de variation importante des indices de polymolécularité des divers dextrans à l'exception toujours du DexPA₂ et de son précurseur chloré.

En conclusion, la diffusion de la lumière laser couplée à une chromatographie d'exclusion stérique est une technique adéquate pour déterminer les \overline{M}_p et les profils de distribution de masses molaires de polymères particuliers tels que les polymères amphiphiles, lorsque les conditions d'analyse sont bien adaptées. Cette étude a permis de mettre en évidence la diminution des masses moléculaires moyennes des polymères après réaction à l'épichlorhydrine et la nature plus ou moins amphiphile des dérivés DexP, en fonction de leur taux de substitution en groupes phénoxy. En ce qui concerne le dextrane le plus substitué, la présence d'ions chaotropes tels que SCN⁻ ne suffit pas pour dissocier entièrement toutes les interactions phénoxy-phénoxy formées.

3-2 ÉTUDE VISCOSIMÉTRIQUE EN SOLUTION DILUÉE

3-2-1 Aspects théoriques

Les études viscosimétriques des polymères en régime dilué permettent d'accéder aux caractéristiques géométriques de la pelote macromoléculaire. Le comportement d'un polymère est mis en évidence dans un solvant donné, à une température donnée. Les paramètres accessibles par cette méthode sont la viscosité intrinsèque $[\eta]$, la masse moléculaire moyenne viscosimétrique notée \overline{M}_v en relation avec la loi de Mark-Houwink si celle-ci est connue et enfin les dimensions des chaînes. De plus, les mesures de viscosité reflètent l'état de solvation des macromolécules i.e. la qualité du solvant, et mettent en évidence la formation éventuelle d'interactions intra et intermoléculaires.

Le paramètre essentiel et accessible par simples mesures est $[\eta]$, définie comme étant la viscosité réduite à dilution infinie.

Les termes usuels et les définitions correspondantes sont repris dans le tableau II.8.

Symbole	Définition	Nom	Unité
η_s	$k \rho t_0$	Viscosité du solvant pur	Poiseuille ou Pa.s ⁻¹
η	$k \rho t$	Viscosité d'une solution de polymère	Poiseuille ou Pa.s ⁻¹
$[\eta]$	$\lim_{C \rightarrow 0} \frac{t-t_0}{t_0 C}$	Viscosité intrinsèque	dL/g
η_{sp}	$\frac{t-t_0}{t_0}$	Viscosité spécifique	sans dimension
η_r	$\frac{t}{t_0}$	Viscosité relative	sans dimension
$\frac{\eta_{sp}}{C}$	$\frac{t-t_0}{t_0 C}$	Viscosité réduite	dL/g
$\frac{\ln \eta_r}{C}$	$\frac{\ln(t/t_0)}{C}$	Viscosité inhérente	dL/g

Tableau II.8 : Nomenclature usuelle en viscosimétrie

t_0 : temps d'écoulement du solvant pur à la température T

t : temps d'écoulement d'une solution de polymère de concentration C à la température T

k est une constante, ρ est la densité du solvant pur

η et η_s sont mesurables directement à l'aide un rhéomètre. L'utilisation d'un viscosimètre capillaire revient à mesurer l'écoulement de solutions de polymères puis à évaluer les grandeurs mathématiques et physiques mentionnées dans le tableau.

La viscosité intrinsèque est accessible par interprétation graphique. En effet, la double extrapolation à concentration nulle des viscosités réduite et inhérente conduit à $[\eta]$ et repose sur les équations de Huggins et Kraemer :

$$\text{équation de Huggins : } \quad \frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_H [\eta]^2 C + \dots$$

$$\text{équation de Kraemer : } \quad \frac{\ln \eta_r}{C} = [\eta] - k_K [\eta]^2 C + \dots$$

où les constantes de Huggins k_H et de Kraemer k_K reflètent la qualité du solvant pour le polymère étudié. En effet, k_H compris généralement entre 0,3 et 0,8 est d'autant plus petit que les interactions polymère/solvant sont fortes ou en d'autres termes, que le milieu constitue un bon solvant pour le polymère considéré. Cette constante augmente avec la rigidité des chaînes macromoléculaires et/ou avec l'agrégation des macromolécules entre elles, jusqu'à devenir supérieur à 1 dans le cas des polymères associatifs. D'autre part, $[\eta]$ reflète la taille de la pelote macromoléculaire. Ainsi, à masse moléculaire équivalente, une compacité d'une pelote résultant de la présence d'interactions intramoléculaires sera révélée par une baisse de $[\eta]$. De même, une diminution de la taille de la pelote due à une réduction des masses moléculaires moyennes du polymère se traduira par une diminution de $[\eta]$. La qualité de deux solvants vis-à-vis d'un polymère est évaluée par comparaison des $[\eta]$ et des k_H .

3-2-2 Matériel et conditions opératoires

Les mesures de viscosité ont été réalisées au moyen d'un viscosimètre automatique TI.1 (Sematech) équipé d'un capillaire de type OSTWALD de 0,36 mm de diamètre, thermostaté à $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$. Ce type de capillaire est préconisé pour les polymères qui ont tendance à mousser, comme les dextrans-phénoxy. Les solutions-mères de polymères (6 g/dL) sont préparées dans l'eau ultra-pure (Milli-Q, système de purification Millipore) 24 heures avant dilution.

3-2-3 Influence du taux de substitution

A l'inverse des mesures de \overline{M}_p , la formation d'agrégats à faible concentration n'influence pas de façon significative $[\eta]$. Ainsi, le dextrane T40 et certains de ses homologues hydrophobisés ont été étudiés dans l'eau pure, milieu dans lequel ils ont été utilisés ultérieurement. Les études viscosimétriques en capillaire ne sont fiables que sur des solutions de polymères parfaitement newtoniennes. En effet, dans le capillaire, le gradient de cisaillement auquel les macromolécules sont soumises, augmente à l'approche de la paroi. Si les macromolécules se déforment sous

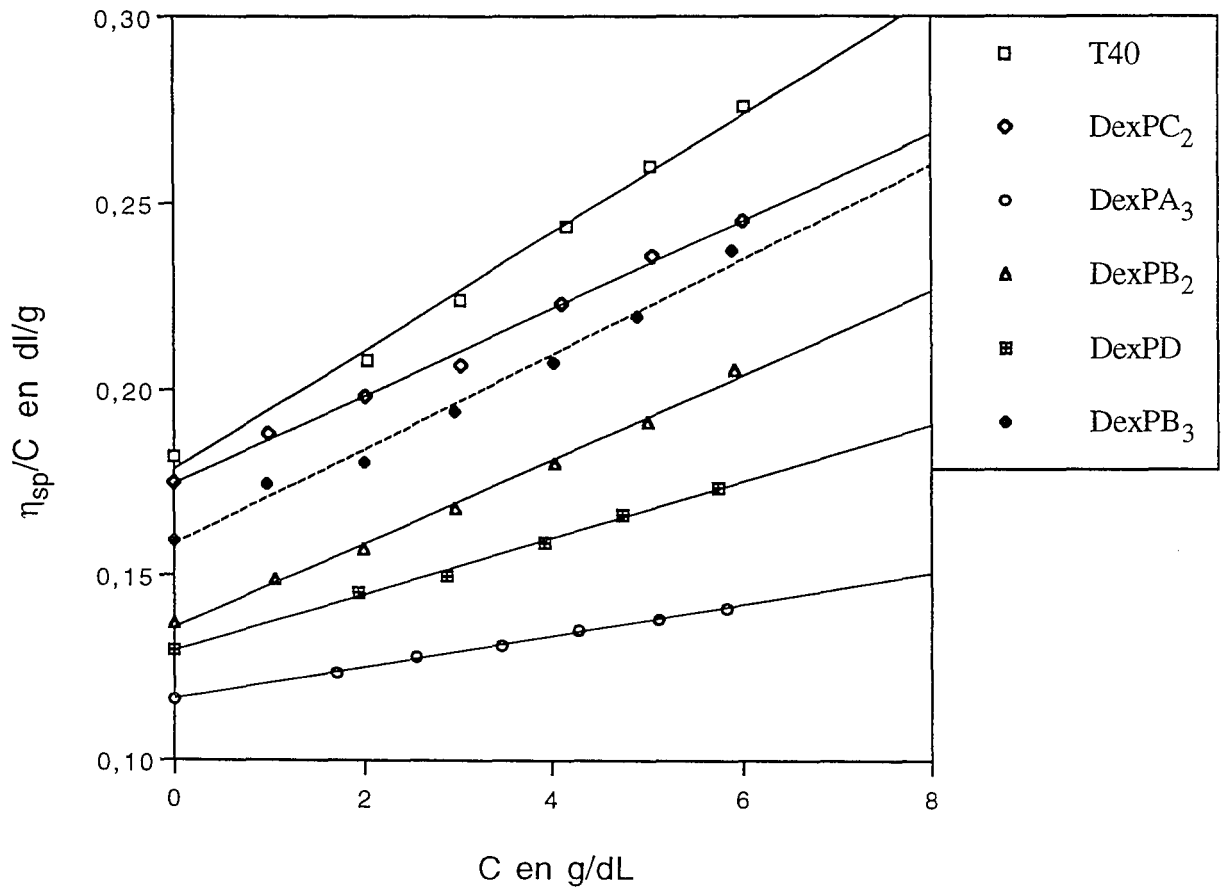


Figure II.12 : Courbes de viscosité de divers dextrans dans l'eau à 25°C

l'effet du gradient de cisaillement, leur comportement n'est plus newtonien, et il en résulte une sous-estimation des temps d'écoulement et donc des viscosités calculées.

Dans un premier temps, des mesures rhéologiques (Rheometrics, géométrie double couette) de diverses solutions de polymère ont permis de vérifier leur caractère newtonien dans une très large gamme de gradient de cisaillement et de concentration (0-100 g/L).

La figure II.12 compare les courbes de viscosités réduites de divers dextranses en fonction de leurs concentrations. Ces courbes répondent toutes à une loi linéaire selon l'équation d'Huggins et leur extrapolation conduit bien à la détermination des $[\eta]$ considérées.

Le tableau II.9 suivant reprend les viscosités intrinsèques, et les coefficients de Huggins k_H pour quelques dextranses.

Polymère	\overline{M}_p MALLS (g/mol)	taux de phénoxy (mmol/g)	$[\eta]$ dL/g	k_H
T40 lot 1	37 200	0	0,182	0,47
T40 lot 2	43 200	0	0,191	0,45
DexPC ₂	36 600	0,06	0,175	0,37
DexPA ₃	22 000	0,10	0,116	0,31
DexPD	25 450	0,33	0,130	0,45
DexPB ₂	29 150	0,56	0,136	0,60
DexPB ₃	36 800	0,51	0,159	0,51

Tableau II.9 : Caractéristiques de quelques dextranses par viscosimétrie capillaire dans l'eau à 25°C.

Les polymères DexPC₂, DexPB₃ et DexPD proviennent du dextrane T40 lot n°2 dont la \overline{M}_p estimée par SEC-MALLS est supérieure à celle du lot n°1.

Les valeurs de la viscosité intrinsèque des dextranses-phénoxy dans l'eau sont abaissées par rapport à celles des dextranses. Cet abaissement de $[\eta]$ correspond à une réduction des volumes hydrodynamiques de chacun des DexP. La première origine de cette variation est attribuée à la réduction des \overline{M}_p des dextranses modifiés, survenues essentiellement au cours de la synthèse des dérivés chlorés. Nous soulignons les valeurs de k_H inférieures à 0,8 dans tous les cas, ce qui traduit d'une part la bonne qualité du solvant pour les polymères étudiés et d'autre part, l'absence d'agrégats formés par association intermoléculaire dans des proportions significatives (ceci dans la gamme de concentration considérée).

Une loi de viscosité en fonction de la \overline{M}_p de dextranses, a été établie dans l'eau à 25°C à partir de trois dextranses dont les \overline{M}_p ont été estimées au MALLS.

Cette loi est donnée par l'équation suivante :

$$[\eta] = 2,91 \cdot 10^{-3} \cdot \overline{M}_p^{0,392} \text{ (en dL/g)}$$

Cette loi permet de calculer la viscosité intrinsèque théorique $[\eta]^*$ qu'aurait un dextrane non modifié de \overline{M}_p connue.

La connaissance de $[\eta]$ et de \overline{M}_n des dextrans modifiés ou non permet de calculer le rayon de giration moyen en nombre $\langle Rg_n^2 \rangle^{1/2}$ selon la théorie de Fox-Flory :

$$[\eta] = \varnothing' \frac{\langle Rg_n^2 \rangle^{3/2}}{M_n} \text{ en dL/g avec } \varnothing' = 4,23 \cdot 10^{28}$$

Les viscosités intrinsèques théoriques et expérimentales ainsi que les rayons de giration de dextrans étudiés sont résumés dans le tableau II.10 ci-après :

Polymère	$[\eta]_{\text{exp}}$ (dL/g)	$[\eta]^*$ (dL/g)	Taux de phénoxy (mmol/g)	$\langle Rg_n^2 \rangle^{1/2}$ (Å)
T40 lot 1	0,182	0,182	0	51
T40 lot 2	0,191	0,191	0	54
DexPC ₂	0,175	0,179	0,06	48
DexPA ₃	0,116	0,147	0,1	36
DexPD	0,130	0,153	0,33	40
DexPB ₂	0,136	0,164	0,56	42
DexPB ₃	0,159	0,179	0,51	49

Tableau II.10 : Comparaison des viscosités expérimentales $[\eta]$ et théoriques en équivalent dextrane $[\eta]^*$ de quelques polymères.

Pour chaque dextrane modifié, la viscosité intrinsèque est inférieure à celle d'un dextrane de \overline{M}_p équivalente. Ce phénomène est très marqué quand le taux de groupes phénoxy fixés sur le polysaccharide est élevé. Ainsi si l'on compare les échantillons T40 (lot n°2), le DexPC₂ et le DexPB₃ de \overline{M}_p équivalente, on note une nette diminution de $[\eta]$, d'autant plus importante que le polymère est plus riche en groupes phénoxy. Cela suggère l'établissement d'interactions hydrophobes de type intramoléculaire et/ou une diminution des interactions polymère/eau, conférant aux macromolécules un volume hydrodynamique plus faible que celui des dextrans de même masse molaire.

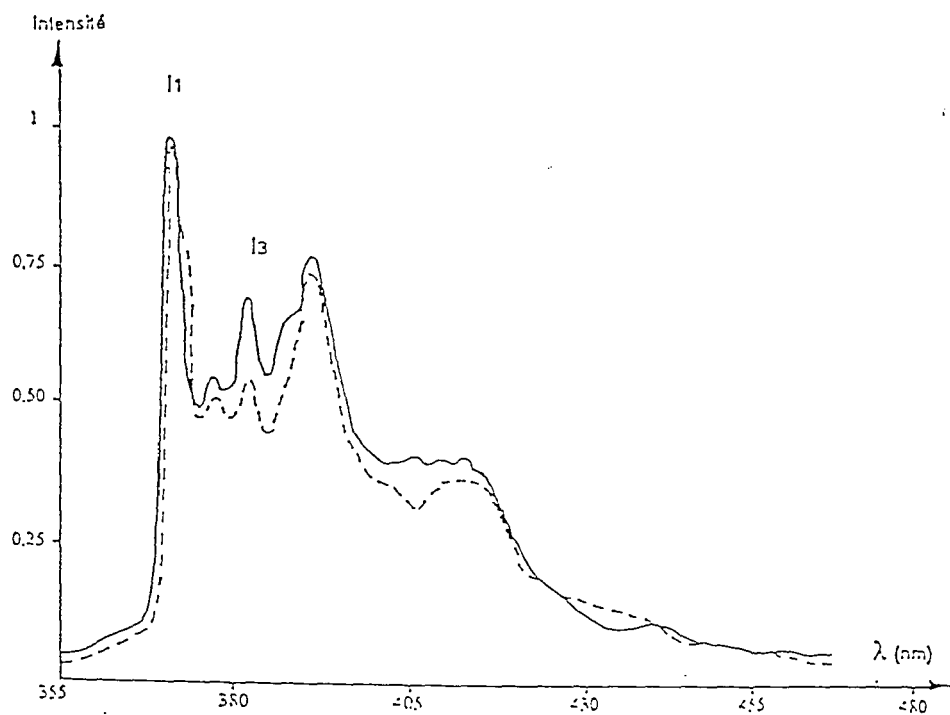


Figure II.13: Evolution du spectre d'émission de fluorescence du pyrène libre en solution en fonction de la polarité du milieu : - - - Milieu polaire
 ——— Milieu apolaire

3-3 ÉTUDE PAR SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE

La fluorescence est une technique susceptible de mettre en évidence la formation de microdomaines hydrophobes dans des solutions aqueuses de polymères. Cette technique nécessite l'usage d'une sonde telle que le pyrène, soit libre dans la solution de polymère, soit fixée sur ce dernier (17).

3-3-1 Principe

L'étude du spectre d'émission du pyrène en spectrométrie de fluorescence permet de déceler la présence de microdomaines hydrophobes dans des solutions aqueuses de tensioactifs et de polymères associatifs (17,18). En effet, le spectre d'émission du pyrène libre en solution présente la particularité d'évoluer selon la polarité du micro-environnement dans lequel il est dissous.

La figure II.13 illustre les différences des spectres d'émission du pyrène libre en fonction de la polarité du milieu. Le rapport des intensités de la première bande I_1 et de la troisième bande I_3 sera de l'ordre de 1,8 dans l'eau, milieu très polaire, mais ne sera que de 0,6 dans l'hexane, milieu très apolaire. L'intensité de la bande I_3 (à $\lambda = 382$ nm) est affectée par un changement de polarité alors que la bande I_1 (à $\lambda = 371,4$ nm) ne l'est que très peu. Les résultats seront commentés à partir de l'évolution du rapport des intensités des deux bandes considérées soit I_1/I_3 . Le pyrène très peu soluble dans l'eau se placera préférentiellement dans des micro-environnements apolaires présents en solution aqueuse. Cette propriété singulière du pyrène (et d'autres sondes) a été tout d'abord mise à profit pour déterminer les concentrations micellaires critiques (cmc) de tensio-actifs en solution aqueuse (17). Le rapport I_1/I_3 pour des solutions de sulfate de dodécyle de sodium est de l'ordre de 1,8 lorsque sa concentration est inférieure à sa cmc et de l'ordre de 1,2 au dessus de la cmc. Selon le même principe, l'étude de l'évolution du spectre d'émission du pyrène permet de déceler la présence de domaines hydrophobes dans des solutions aqueuses de polymères associatifs ou de mettre en évidence les interactions polymères/tensio-actifs. Cette technique est couramment employée au laboratoire pour caractériser des polysaccharides associatifs (19).

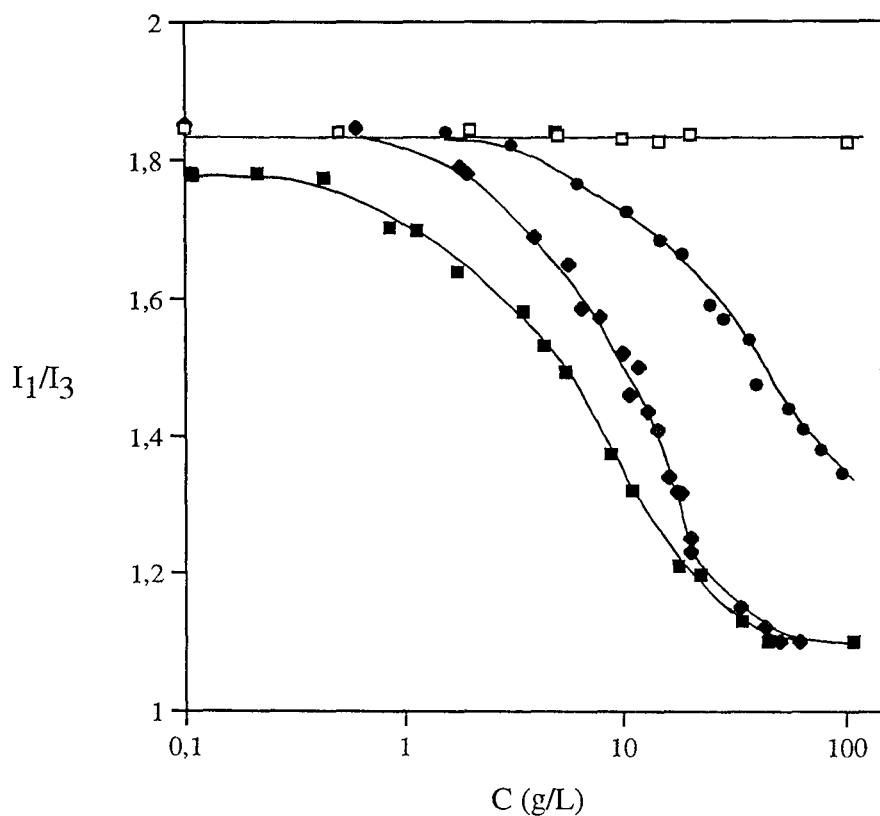
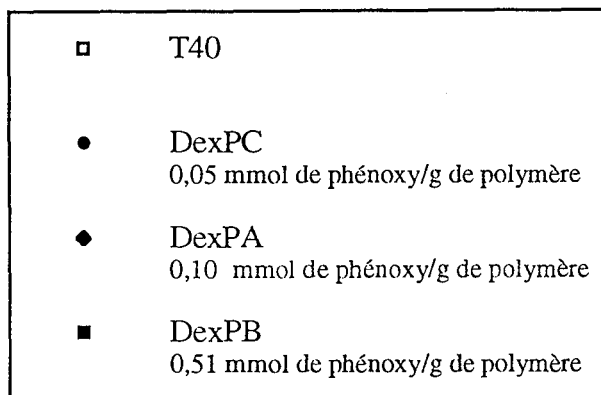


Figure II.14 : Variation du rapport I_1/I_3 du pyrène dans des solutions aqueuses de dextrans en fonction de la concentration des polymères et de leur teneur en groupes phénoxy.

3-3-2 Conditions expérimentales

L'évolution du rapport I_1/I_3 du spectre d'émission du pyrène a été étudiée en fonction de la concentration du polymère et du taux de groupements phénoxy.

Pour cette étude, le pyrène utilisé est de haute pureté (> 99,9 %, BCR, Bruxelles). Les solutions-mères de polymères (1 à 100 g/L) sont préparées dans l'eau Milli-Q et agitées pendant 20 heures. La concentration finale en pyrène dans les solutions (eau pure ou solutions de polymères) est constante et de l'ordre de 10^{-6} mol/L. Les solutions sont préparées par addition de pyrène préalablement dissous dans l'éthanol. La longueur d'onde d'excitation du pyrène est fixée à 335 nm. Les spectres d'émission sont obtenus à 25°C et enregistrés entre 350 et 500 nm sur un spectromètre SPEX Fluorolog 2. La largeur de fentes est fixée à 0,5 mm en excitation et en émission.

3-3-3 Variation du rapport I_1/I_3

Conformément aux conditions opératoires citées ci-dessus, les spectres d'émission du pyrène, dans les solutions d'eau Milli-Q de T40 et de ses dérivés le DexPC₁ (0,05 mmol de phénoxy/g), le DexPA₁ (0,1 mmol/g) et le DexPB₂ (0,51 mmol/g) ont été réalisés. La figure II.14 illustre l'évolution du rapport I_1/I_3 pour divers polymères en fonction de leurs concentrations.

Pour le dextrane de départ, le rapport I_1/I_3 est égal à 1,80 ($\pm 0,02$) dans toute la gamme de concentrations étudiée. Cette valeur est proche de celle obtenue pour le pyrène libre en solution dans l'eau ($I_1/I_3 \approx 1,80$). Le pyrène se trouve dans un micro-environnement polaire dans lequel on ne décèle pas de microdomaines hydrophobes. Ce polymère, très hydrophile, ne contient pas de segments hydrophobes, il est donc normal que le rapport I_1/I_3 ne varie pas quelle que soit sa concentration.

Les dérivés phénoxy du dextrane présentent, à partir de concentrations d'autant plus faibles que le taux de substitution des polymères en groupes phénoxy est élevé, des microdomaines hydrophobes mis en évidence par la chute du rapport I_1/I_3 .

Ce rapport décroît d'autant plus vite que la concentration du polymère augmente jusqu'à l'obtention d'un second plateau inférieur à I_1/I_3 équivalent à 1,1 ($\pm 0,03$). Cette valeur indique, de la même façon que dans le cas d'organisation micellaire des surfactants, que les groupements aromatiques du dextrane interagissent entre eux pour créer des microdomaines hydrophobes. Ceux-ci sont alors capables d'accueillir des molécules de pyrène et de les isoler du milieu aqueux.

Finalement, l'interprétation des courbes peut être réalisée en considérant 3 zones différentes (19) :

* La première zone correspond au plateau supérieur. Aux faibles concentrations en polymère, le rapport I_1/I_3 ne varie que très peu avoisinant 1,8 et signifie que le pyrène est situé dans un environnement polaire.

* La zone intermédiaire est représentée par la transition entre les deux plateaux où le rapport I_1/I_3 ne cesse de décroître avec la concentration du polymère. Cette zone de transition aurait pour origine l'établissement progressif des microdomaines intra et/ou intermoléculaires dans lesquels le pyrène pourrait être solubilisé. Avec l'accroissement de la concentration en polymère, la part des interactions intermoléculaires augmente vraisemblablement.

* La troisième zone équivaut au plateau inférieur où toutes les molécules de pyrène se retrouvent dans un environnement apolaire quelle qu'en soit sa nature.

Les dérivés étudiés et leur polymère parent présentent tous des courbes d'allure distincte. Plus le polymère est hydrophile, moins il aura tendance à former des poches hydrophobes susceptibles d'emprisonner les molécules de pyrène.

Plus le taux de groupements phénoxy portés par les DexP augmente, plus la concentration en polymère nécessaire pour que les macromolécules commencent à s'organiser pour former des microdomaines hydrophobes est faible. Néanmoins, la formation de ces microdomaines hydrophobes n'intervient qu'à des concentrations en polymère relativement élevées révélant un caractère amphiphile relativement peu prononcé (20).

Cette étude par spectroscopie de fluorescence du pyrène a permis de mettre en évidence le caractère légèrement amphiphile des dextrans hydrophobisés. La formation de microdomaines hydrophobes dans les solutions de dextrans est clairement visualisée par la chute plus ou moins importante du rapport I_1/I_3 quand la concentration en polymère augmente. C'est donc le dérivé DexPB qui possède la plus grande aptitude à former des interactions intra et intermoléculaires dans l'eau.

4- CONCLUSION

Différents dérivés du dextrane ont été préparés par introduction contrôlée de groupements phénoxy sur le polysaccharide. Les caractéristiques physico-chimiques des dextrans modifiés ont été déterminées en solution par diverses techniques telles que la viscosimétrie, la chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de lumière laser et la fluorescence.

La modification chimique du dextrane est réalisée de la façon suivante: dans un premier temps, le polysaccharide est traité par l'épichlorhydrine, ce qui conduit à la formation d'un intermédiaire chloré réactif. Cette étape a lieu en milieu acide, provoquant une hydrolyse partielle des liaisons glucosidiques et, par voie de conséquence, une diminution de la masse moléculaire moyenne des dérivés obtenus. Les conditions de réaction ont été optimisées afin de limiter au maximum cette réaction d'hydrolyse.

Le traitement des dérivés chlorés obtenus par une solution aqueuse de phénol conduit, dans des conditions bien définies, à des polymères DexP plus ou moins substitués en groupements phénoxy. La chromatographie d'exclusion stérique ainsi que les études de viscosité permettent de mettre en évidence une réduction du volume hydrodynamique des polymères-phénoxy par rapport au dextrane de départ. La réduction de masse moléculaire moyenne des polymères modifiés ne suffit pas à expliquer, à elle seule, la diminution de leur viscosité en solution. Cette réduction de viscosité est la conséquence directe de la présence des groupements phénoxy, sur la chaîne du polysaccharide. En régime dilué, ces groupes ont tendance à s'associer pour former des interactions hydrophobes intramoléculaires et les macromolécules adoptent de ce fait une conformation plus compacte.

L'étude viscosimétrique, réalisée en régime dilué, n'a pas permis de mettre en évidence la formation d'agrégats consécutifs à la mise en place d'interactions intermoléculaires. Néanmoins, l'utilisation de techniques beaucoup plus sensibles à la présence d'espèces de haut poids moléculaire telle que la diffusion de lumière laser aux petits angles en milieu aqueux, indique clairement la présence d'agrégats en milieu aqueux, particulièrement dans le cas du dextrane le plus substitué en groupes phénoxy. Enfin, des études de fluorescence à des concentrations en polymère beaucoup plus élevées montrent que des interactions hydrophobes se mettent également en place en régime semi-dilué et concentré.

L'ensemble de ces résultats traduit le caractère plus ou moins amphiphile des polymères préparés et leur aptitude à former des microdomaines hydrophobes par association intra et intermoléculaires. Le caractère amphiphile de ces polymères est d'autant plus prononcé que leur contenu en groupes phénoxy augmente. Dans les chapitres suivants, nous tenterons de corréler les propriétés physico-chimiques des différents DexP préparés, d'une part avec leurs propriétés d'adsorption à l'interface polystyrène-eau, et d'autre part avec les propriétés de surface des matériaux obtenus.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) A. Jeanes
Preparation of water-soluble dextran by enzymic synthesis
Methods Carbohyd. Chem., **5**, (1965), 127-132
- (2) A. Jeanes
Dextran Bibliography
Misc. Publication n°1355
U. S. Department of Agriculture, Washington, (1978)
- (3) R. M. Alsop
Industrial production of dextrans
Prog. Ind. Microbiol., **18**, (1968), 1-44
- (4) P. T. Murphy et R. L. Whistler
Dextrans in industrial gums : polysaccharides and their derivatives
2nd ED, Academic Press, New York, (1973), 513-542
- (5) S. Lindberg et S. Svensson
Structural studies on dextran from mesenteroides NRRL B-512
Acta Chem. Scand., **22**, (1968), 1907-1912
- (6) K. A. Granath
Solutions properties of branched dextrans
J. Colloid Sci., **13**, (1958), 308-328
- (7) A. M. Basedow et K. H. Ebert
Production, characterization and solution properties of dextran fractions of narrow molecular weight distributions
J. Polym. Sci., **66**, (1979), 101-115
- (8) E. Antonini, L. Bellilli, M. R. Bruzzesi, A. Caputo, E. Chiancone et A. Rossi-Fanelli
Studies on dextran and dextran derivatives
I. properties of native dextran in different solvents
Biopolymers, **2**, (1964), 27-34
- (9) A. B. Cohen et C. D. Sharklett
U.S. pat. N° 3203804, (1965)
- (10) F. Prouchayret
Synthèse et étude de dérivés du dextrane actifs vis-à-vis de l'hémoglobine. Application à la préparation de conjugués covalents utilisables comme transporteurs d'oxygène intravasculaires.
Thèse, INPL-Nancy, (1990)
- (11) F. Bonneaux
Place des dextrans aldéhydiques dans l'élaboration de conjugués covalents d'hémoglobine humaine utilisables comme transporteurs d'oxygène intravasculaires.
Thèse d'état, Université de Nancy I, (1992)
- (12) M. Baba, R. Pauwels, J. Balzarini, J. Arnout, J. Desmyter et E. De Clercq
Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci., **85**, (1988), 6132-6136

- (13) A. Serres
Supports de silice passivée à ligands biospécifiques : synthèse, caractérisation et propriétés de séparation en chromatographie des protéines.
Thèse, Institut de Galilée, Université de Paris-Nord, (1994)
- (14) H. Likiari, E. Legendre, D. Muller et J. Jozefonvicz
High performance affinity chromatography of insulin on coated silica grafted with sialic
J. Chromatogr. B, **664**, (1995), 163-173
- (15) Z. A. Rogovin, A. D. Virnik, K. P. Khomiakov, O. P. Laletina et M. A. Penenzhik
Study of the synthesis of dextran derivatives
J. Macromol. Sci. Chem., **A6**, (1972), 569-593
- (16) B. Porsch et L. O. Sundelöf
Size-exclusion chromatography and dynamic light scattering of dextrans in water :
explanation of ion-exclusion behaviour
J. Chromatogr. A, **669**, (1994), 21-30
- (17) F. M. Winnik
Photophysics of preassociated pyrenes in aqueous polymer solutions and in other
organized media
Chem. Rev., **93**, (1993), 587-614
- (18) A. Siquin, P. Hubert et E. Dellacherie
Intermolecular associations in hydrophobically modified derivatives of propylene
glycol alginate
Polymer, **35**, (1994), 3557-3560
- (19) A. Siquin
Alginates associatifs : synthèse et étude physico-chimique en milieu aqueux
Thèse, INPL-Nancy, (1995)
- (20) H. Ringsdorf, J. Venzmer et F. M. Winnik
Fluorescence studies of hydrophobically modified poly(N-isopropylacrylamides) or
how to play accordion on a liposome.
Makromol. Chem., Macromol. Symp., **46**, (1991), 427-431

CHAPITRE III

CHAPITRE III

ADSORPTION DES DEXTRANES AMPHIPHILES SUR LES PARTICULES DE POLYSTYRÈNE STABILISATION CHIMIQUE DE LA COUCHE ADSORBÉE

Les propriétés d'adsorption des différents dextrans hydrophobisés à la surface des particules de polystyrène-divinylbenzène ont été étudiées d'un point de vue cinétique et thermodynamique.

Le recouvrement des particules de PS-DVB a été réalisé en milieu aqueux, à partir de solutions plus ou moins concentrées en dextrans. Puis la couche adsorbée a été stabilisée par réticulation chimique. Enfin, les billes de polystyrène ont été lavées en présence d'un surfactant, afin d'éliminer le dextrane trop faiblement lié à la surface et susceptible de se désorber ultérieurement.

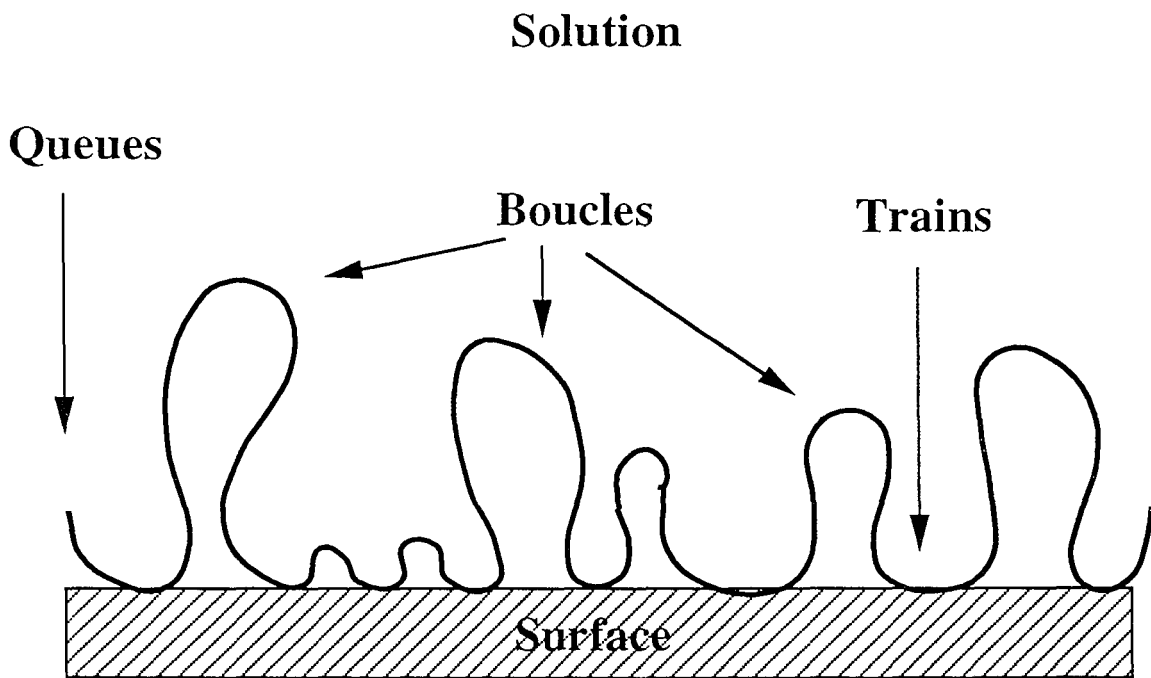


Figure III.1 : Conformation d'une chaîne de polymère à une interface liquide/solide avec des segments directement lié à la surface (trains) ou plus déployés en solution (boucles et queues) .

1 - GÉNÉRALITÉS SUR L'ADSORPTION DES POLYMÈRES AUX INTERFACES SOLIDE-LIQUIDE

Les phases de polystyrène-divinylbenzène présentent des propriétés mécaniques, une stabilité chimique et des caractéristiques granulométriques adaptées à la mise en oeuvre de séparations rapides et résolutive en C. L. H. P.

Cependant, leur caractère hydrophobe constitue un obstacle à leur utilisation pour les séparations chromatographiques de biopolymères en milieu aqueux. Pour pallier cet inconvénient, différentes technologies peuvent être mises en oeuvre, visant en particulier à recouvrir la surface des particules par adsorption d'un polymère amphiphile. Dans cette première partie, nous proposons d'exposer succinctement l'aspect théorique de l'adsorption des polymères aux interfaces solide-liquide.

1-1 INTRODUCTION

L'adsorption des polymères aux interfaces solide-liquide est un phénomène impliqué dans de nombreux procédés parmi lesquels on peut citer la stabilisation des colloïdes, la floculation, l'adhésion, l'enrobage...

Ce phénomène fait depuis une vingtaine d'années, l'objet de nombreuses recherches tant théoriques qu'expérimentales. La représentation usuelle d'une chaîne flexible de polymère adsorbée sur une surface solide comprend trois parties : les monomères en interaction directe avec la surface constituent les **trains**, les segments entre les trains sont déployés en solution sous forme de **boucles** et les extrémités de chaînes sont les **queues** (figure III.1).

Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer les phénomènes d'adsorption des polymères aux interfaces. Dès 1953, Frisch et coll. (1) ont proposé une approche théorique utilisant un modèle de chaîne isolée. Cette approche a été étendue à d'autres cas en tenant compte des effets de volume exclu et des interactions entre chaînes adsorbées sur une surface. La théorie de champ moyen exprime l'énergie d'interaction moyenne en fonction de la distribution de probabilité des configurations des chaînes adsorbées. En particulier, les prévisions les plus intéressantes du modèle de Scheutjens et Fleer (2) concernent les paramètres conformationnels : fraction de concentration de chaque espèce (boucles, queues, trains), taux de recouvrement, proportions de boucles, trains et queues. Mais ce modèle ne tient pas compte des effets de fluctuations qui doivent être importantes dans les couches diffuses et d'autres théories comme celle dite de lois d'échelle ont été proposées. L'application des lois d'échelle aux solutions de macromolécules a en particulier été montrée par De Gennes, qui a ainsi largement contribué à une meilleure compréhension des polymères aux interfaces solide/liquide (3). Plus récemment, de nouveaux modèles ont été établis et reflètent davantage la réalité en considérant

la polymolécularité des polymères (4), les copolymères statistiques, l'adsorption multicouche (5), les surfaces chargées...

Parallèlement à ces études théoriques se sont développées de nombreuses techniques expérimentales telles que l'Infra-Rouge, l'ellipsométrie, la spectroscopie de corrélation de photons, la diffusion de neutrons aux petits angles, la Résonance Paramagnétique Électronique (RPE) et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Ces méthodes permettent de mesurer la quantité de polymère adsorbée, l'épaisseur de la couche interfaciale, les profils de concentration en monomère quand on s'éloigne de la surface.

Toutes ces techniques ainsi que les différentes théories concernant l'adsorption des polymères aux interfaces ont fait l'objet de nombreuses revues détaillées (6, 7, 8).

1-2 CARACTÉRISTIQUES DU MÉCANISME D'ADSORPTION

L'adsorption d'un polymère à l'interface solide/liquide dépend des interactions mises en jeu entre le polymère, le solvant et la surface. Les propriétés physico-chimiques du polymère influencent son adsorption. Dans le cas simple d'un homopolymère, les facteurs-clé sont sa longueur de chaîne, sa polymolécularité, sa linéarité, sa flexibilité et bien sûr, sa nature chimique. Le cas des copolymères est beaucoup complexe car la structure primaire et la contribution des différents monomères interviennent de façon non négligeable dans le processus d'adsorption. Pour les polyélectrolytes, la charge nette doit être considérée.

La qualité du solvant vis-à-vis du polymère est à apprécier puisque certains auteurs suggèrent que la quantité de polymère adsorbée sur une surface solide est toujours supérieure dans un solvant θ que dans un bon solvant (9).

En ce qui concerne la surface, ses caractéristiques structurales sont à prendre en compte également. Les mécanismes d'adsorption ne sont pas les mêmes qu'il s'agisse d'une surface plane ou sphérique. Enfin, la rugosité et la porosité interviennent dans le phénomène d'adsorption.

La prise en compte de ces quelques considérations nous amène à discuter de quatre aspects de l'adsorption des polymères aux interfaces liquide/solide. Ces aspects sont classés d'un point de vue thermodynamique, cinétique, structural et dynamique d'après Cohen-Stuart et coll. (6).

** Aspect thermodynamique*

Le paramètre le plus accessible est la quantité de polymère adsorbée à la surface d'un solide. La quantité de chaînes adsorbées à la surface d'un solide notée Γ , exprimée en masse par unité de surface dépend des paramètres tels que :

- l'énergie d'interaction polymère/solide. Les interactions mises en jeu peuvent être du type Van der Waals, électrostatique, hydrophobe, liaisons hydrogène ;
- l'énergie d'interaction polymère/solvant. L'aptitude du solvant à former des liaisons hydrogène et son pouvoir de solvation pour le polymère sont importants ;
- la concentration du polymère à l'équilibre.

La réalisation d'une isotherme d'adsorption consiste à déterminer la quantité adsorbée Γ en fonction de la concentration du polymère à l'équilibre. La courbe obtenue est une caractéristique propre et fondamentale de chaque système solide/polymère/solvant à une température donnée. Sa forme globale indique le type d'isotherme en terme d'adsorption physique ou chimique et en terme du nombre de couches adsorbées.

L'épaisseur δ de la région interfaciale est un paramètre important. En effet, c'est dans cette région que se produisent les perturbations structurales; les termes énergétiques (enthalpiques et entropiques) du système ainsi que la tension interfaciale en dépendent. Toutes les théories supposent l'atteinte de l'équilibre thermodynamique mais il peut y avoir des barrières énergétiques qui empêchent l'équilibre d'être atteint dans une échelle de temps imposée par l'expérience. Ces barrières sont associées aux réarrangements conformationnels des chaînes de polymères dans la région interfaciale.

** Aspect cinétique*

Quand les caractéristiques d'un système solide/polymère/solvant sont changées (concentration, surface, température, solvant...), celui-ci évolue jusqu'à une nouvelle position d'équilibre. Quelques études ont démontré que les paramètres énergétiques et l'épaisseur interfaciale varient au cours du temps. Des études cinétiques sont nécessaires mais pas suffisantes pour indiquer l'équilibre thermodynamique.

** Aspect structural*

A l'interface, un polymère est adsorbé dans une conformation dynamique qui comprend des **trains** (segments directement liés à la surface), des **boucles** (segments libres entre deux trains) et des **queues** (segments libres à l'extrémité d'une chaîne ou chaîne pendante). L'extension des boucles et des queues détermine l'épaisseur de la région interfaciale. La fraction de segments en trains notée P_{ads} , accessible par diverses méthodes, est caractéristique d'un système solide/polymère/liquide.

CHAPITRE III : Adsorption des dextrans amphiphiles sur les particules de polystyrène

Le modèle de Scheutjens et Fleer (2) relie Pads à la quantité de polymère adsorbée :

- à faible taux de recouvrement, le polymère adopte une conformation aplatie entraînant un taux maximal de segments en trains ;
- à plus fort taux de recouvrement, l'augmentation de la densité de polymère conduit au repliement des chaînes et à l'apparition d'un plus grand nombre de segments libres.

** Aspect dynamique*

Enfin, ce dernier aspect relève des fluctuations conformationnelles des macromolécules liées au phénomène de diffusion des molécules à l'interface.

Adsorption par interactions hydrophobes d'un polymère hydrosoluble contenant une faible concentration de groupes hydrophobes => Formation d'une couche hydrophile

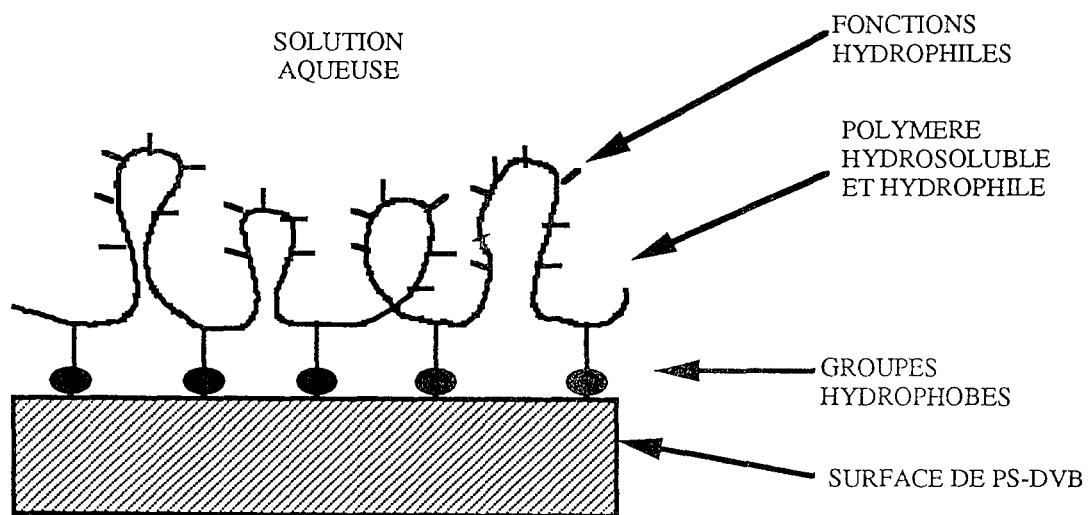


Figure III.2 : Concept de l'hydrophilisation de particules de PS-DVB par adsorption de polymères amphiphiles.

2 - ÉTUDE DE L'ADSORPTION DES DEXTRANES-PHÉNOXY SUR LE POLYSTYRÈNE

L'hydrophilisation des particules de PS-DVB par adsorption de dextrans-phénoxy à leur surface se déroule en plusieurs étapes :

- lavage et conditionnement des particules de PS-DVB,
- adsorption des polymères à la surface des billes, schématiquement représentée sur la figure III.2,
- stabilisation de la couche de polymère adsorbé par réticulation chimique,
- lavage des particules par un détergent,

Cette étude a été réalisée sur des particules poreuses fournies gracieusement par Rohm et Haas de type Amberchrom CG162s (Philadelphie, États-Unis). D'après le fournisseur, les caractéristiques principales de ces particules sont :

- un diamètre moyen d_p de 40 μm ,
- un diamètre moyen de pores de 1000 à 1500 Å,
- une surface spécifique de 200 m^2/g .

2-1 CONDITIONNEMENT DES PARTICULES

Cette opération consiste d'une part, à éliminer des billes les divers contaminants et impuretés provenant de leur fabrication et d'autre part, à éliminer les particules de petites tailles et débris nommées "fines". Ce protocole, indispensable avant l'usage des particules pour que les résultats obtenus soient reproductibles d'un lot à l'autre, repose sur un certain nombre d'étapes de lavages dans des solvants de polarités différentes :

- 10 g de billes sèches sont mises en suspension dans 50 mL un mélange méthanol et H_2O (1/3 V/V). Les particules de PS-DVB n'étant pas mouillées par l'eau, il convient de les imbiber préalablement de méthanol. La suspension est homogénéisée par agitation tournante pendant une nuit. Après une décantation de 24 heures, le surnageant opaque est éliminé.
- Les particules sont lavées dans 100 mL d'eau distillée, agitées pendant 10 minutes puis décantées. Cette opération de lavage à l'eau est répétée 3 fois. Les particules de polystyrène sont lavées sur fritté par des mélanges eau/acétonitrile, avec des pourcentages croissants en acétonitrile.
- La suspension est agitée pendant 48 heures dans l'acétonitrile. Après élimination du surnageant, les particules sont lavées sur fritté par des solvants eau/acétonitrile en pourcentages croissants en eau jusqu'à 100 % en eau.

- Enfin, les billes sont mouillées par 27 mL d'éthanol et 135 mL d'eau contenant de l'azide de sodium à 0,3 g/L sont ajoutés. Ce mélange constitue le solvant de stockage des billes.

- La concentration des particules dans la suspension doit être déterminée. Pour ce faire, le mélange est homogénéisé et le prélèvement d'1 mL de suspension est réalisé. Les particules sont lavées, filtrées, séchées puis pesées. En général, la composition du mélange est ajustée pour qu'un mL de suspension corresponde à 50 mg de billes de PS-DVB sèches.

- Avant leur utilisation, les particules sont de nouveau lavées dans l'éthanol pendant 3 heures (5 mL/mL de suspension) puis au moins 3 fois à l'eau distillée (5 mL/mL de suspension). Les divers surnageants sont prélevés après centrifugation de 15 minutes à 5000 tours/minute. L'absence d'impuretés dans la dernière eau de lavage est contrôlée par spectroscopie UV (200 à 300 nm).

2-2 MÉTHODES DE DÉTERMINATION DES PROPRIÉTÉS D'ADSORPTION

2-2-1 Principe

Les propriétés d'adsorption des DexP à la surface du polystyrène ont été étudiées d'un point de vue cinétique et thermodynamique.

La détermination de la cinétique d'adsorption repose sur la mesure de la quantité de polymère adsorbée en fonction du temps, dans des conditions expérimentales fixées (concentration initiale du polymère, solvant, température, volume de la suspension...).

50 mg de billes en suspension dans 1 mL d'eau sont mis en contact avec 4 mL d'une solution de polymère à ≈ 25 g/L. La quantité de polymère adsorbée sur les particules après des temps d'imprégnation variables est dosée dans les conditions décrites ci-dessous.

La réalisation d'une isotherme d'adsorption consiste à déterminer la quantité de polymère adsorbée en fonction de la concentration du polymère à l'équilibre dans des conditions expérimentales fixées (temps, solvant, température ...). En pratique, des solutions de dextrane à différentes concentrations sont préparées dans l'eau distillée. 4 mL de solution sont mis en contact avec 1 mL de billes (50 mg) en suspension dans l'eau sous agitation tournante pendant 20 heures puis la quantité de polymère adsorbée est évaluée.

2-2-2 Méthodes de détermination de la quantité adsorbée

Le taux de recouvrement des supports est caractérisé par la quantité de polymère adsorbé sur le polystyrène exprimée en mg/m² de billes sèches. La quantité de dextrane adsorbée peut être déterminée par deux méthodes, soit la méthode du surnageant, soit par spectroscopie Infra-Rouge.

Les particules en suspension dans la solution de dextrane sont centrifugées et le surnageant prélevé. La quantité de dextrane adsorbée est obtenue par différence entre la quantité initiale de polymère dans la solution et celle dosée dans le surnageant après imprégnation du support.

** Dosage des solutions de dextrans*

Les surnageants dilués de 1 à 2 g/L dans l'eau peuvent être dosés par la méthode à l'antrone (10) conformément à la méthodologie donnée en annexe. Le dextrane de départ exempt de chromophore est dosé systématiquement par cette méthode.

** Dosage spécifique des solutions de dextrans-phénoxy*

Les solutions sont dosées à 269 nm à partir d'une courbe d'étalonnage ($\epsilon = 1372 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Les dextrans-phénoxy sont couramment dosés par cette méthode, plus facile à mettre en oeuvre que la précédente.

** Calcul de la quantité adsorbée*

La quantité Γ de polymère adsorbée est calculée selon l'équation [1] suivante :

$$\Gamma \text{ (mg/m}^2\text{)} = \frac{C_i V - C_s V}{m.S} \quad [1]$$

avec V : volume total de la suspension (mL)

C_i : concentration initiale du polymère dans la suspension (g/L)

C_s : concentration du polymère dans le surnageant (g/L)

m : masse du support sec (g)

S : surface spécifique des billes de PS-DVB (S = 200 m²/g)

L'estimation de la quantité adsorbée par cette méthode exige une grande précision. En effet, compte tenu du nombre important de manipulations effectuées lors de la préparation et du dosage (pesées, dilutions, dosages), l'incertitude sur la détermination de Γ peut être élevée et ce d'autant plus que la concentration initiale en polymère augmente. L'incertitude sur Γ s'écrit selon l'équation [2] :

$$\frac{\Delta\Gamma}{\Gamma} = \frac{\Delta(C_i V - C_s V)}{V (C_i - C_s)} + \frac{\Delta m}{m} \quad [2]$$

$$\text{soit} \quad \frac{\Delta\Gamma}{\Gamma} = \frac{\Delta C_i + \Delta C_s}{C_i - C_s} + \frac{C_i + C_s}{C_i - C_s} \cdot \frac{\Delta V}{V} + \frac{\Delta m}{m} \quad [3]$$

Les erreurs liées à chaque terme sont estimées de la façon suivante :

$$\frac{\Delta m}{m} = \pm 2 \% \quad \frac{\Delta V}{V} = \pm 1 \% \quad \Delta C_i = \pm 0,05 \text{ g/L} ; \Delta C_s = \pm 0,1 \text{ g/L}$$

Les exemples ci-dessous illustrent l'augmentation de l'erreur commise sur la détermination de Γ en fonction de la concentration initiale en polymère ; cette erreur est d'autant plus grande que C_i augmente.

exemple 1 : $C_i = 37 \text{ g/L}$ $C_s = 33 \text{ g/L}$ $V = 5 \text{ mL}$ $m = 50 \text{ mg}$

on obtient $\frac{\Delta\Gamma}{\Gamma} = 23,2 \%$ soit $\Gamma = 2,10 \text{ mg/m}^2 \pm 0,45$

exemple 2 : $C_i = 1,3 \text{ g/L}$ $C_s = 0$ $V = 5 \text{ mL}$ $m = 50 \text{ mg}$

on obtient $\frac{\Delta\Gamma}{\Gamma} = 14,5 \%$ soit $\Gamma = 0,65 \text{ mg/m}^2 \pm 0,09$

La détermination des isothermes d'adsorption doit donc s'effectuer avec soin et rigueur. Ainsi, les volumes prélevés sont calculés par pesée en connaissant la densité de chaque solution ou suspension pour minimiser les erreurs.

2-2-2-2 Détermination directe par spectroscopie Infra-Rouge (IR)

La quantité de polymère adsorbée est directement mesurable par IR.

** Principe de la méthode*

Pour mesurer la quantité de DexP adsorbée sur le polystyrène, deux longueurs d'ondes de travail sont sélectionnées de façon à répondre aux équations ci-dessous :

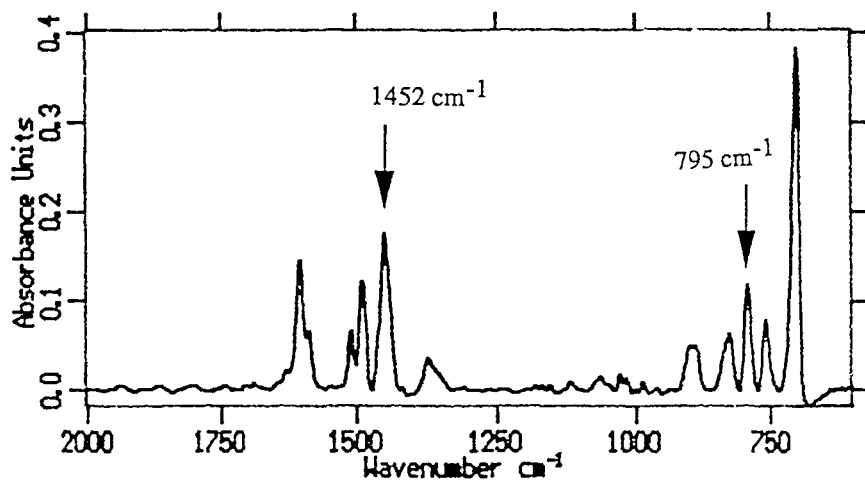
$$\text{à } \lambda_1 \text{ où seul le polystyrène présente une absorbance, on a } DO_1 = \epsilon_{PS}^{\lambda_1} \cdot C_{PS} \quad [4]$$

$$\text{à } \lambda_2, \text{ on a } DO_2 = \epsilon_{PS}^{\lambda_2} \cdot C_{PS} + \epsilon_{DexP}^{\lambda_2} \cdot C_{DexP} \quad [5]$$

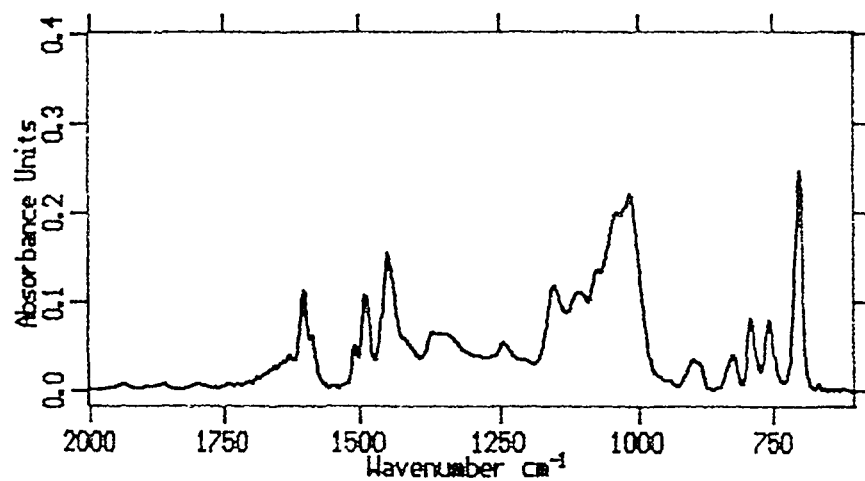
où C_{DexP} et C_{PS} sont les concentrations respectives (g/g) du DexP et des billes PS-DVB dans la pastille de KBr.

En divisant l'équation [5] par l'équation [4], membre à membre, on obtient :

(a) PS-DVB natif



(c) PS-DexPB



(b) DexPB

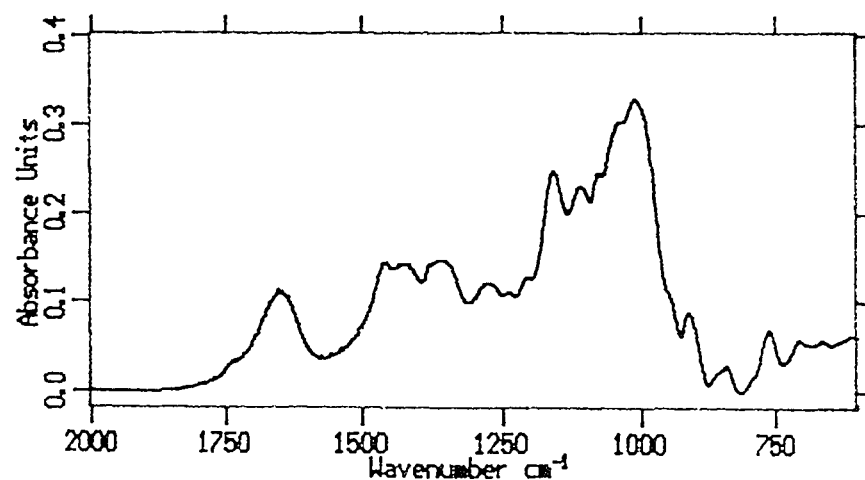


Figure III.3 : Spectres IRTF des particules de PS-DVB (a), d'un dextrane-phénoxy DexPB (à 0,56 mmol de phénoxy/g de polymère) (b) et des particules recouvertes de DexPB notées PS-DexPB (c).

$$\frac{DO_2}{DO_1} = \frac{\epsilon_{PS}^{\lambda_2}}{\epsilon_{PS}^{\lambda_1}} + \frac{\epsilon_{DexP}^{\lambda_2}}{\epsilon_{PS}^{\lambda_1}} \cdot \frac{C_{DexP}}{C_{PS}} \quad [6]$$

En posant $S = \frac{DO_2}{DO_1}$, $R = \frac{C_{DexP}}{C_{PS}}$, $k = \frac{\epsilon_{PS}^{\lambda_2}}{\epsilon_{PS}^{\lambda_1}}$ et $k' = \frac{\epsilon_{DexP}^{\lambda_2}}{\epsilon_{PS}^{\lambda_1}}$, l'équation [6] s'écrit plus simplement

$$S = k + k' R \quad [7]$$

k et k' sont déterminées graphiquement à partir d'une courbe d'étalonnage, selon la méthode décrite ci-dessous.

** Conditions expérimentales*

Les spectres en absorbance sont obtenus sur un spectrophotomètre IRTF Bruker IFS 25. A partir des spectres des polymères DexP et des billes de PS-DVB finement broyées en présence de KBr (2 mg de support dans 20 mg de KBr), deux longueurs d'ondes ont été choisies dont λ_1 à 795 cm^{-1} , correspondant aux bandes de déformation de C-H aromatiques prépondérantes dans le polystyrène-divinylbenzène, et λ_2 à 1452 cm^{-1} , bande de vibration des C-H dans les groupes CH_2 . La figure III.3 représente les spectres respectifs de 2000 à 600 cm^{-1} des billes de PS-DVB nues, d'un dextrane-phénoxy seul et d'un échantillon de polystyrène recouvert. Les dextrans-phénoxy n'absorbent pas de façon significative à 795 cm^{-1} .

** Préparation des échantillons-étalons*

Des échantillons-étalons sont préparés à partir de 50 mg de billes de PS-DVB, préalablement lavées à l'eau, filtrées et séchées sous vide.

A 50 mg de billes, on additionne des quantités variables de polymère (0 à 20 mg) en solution dans l'eau. Le mélange est homogénéisé pendant quelques heures puis lyophilisé. La connaissance des couples de valeurs (R, S) pour chaque polymère conduit à la détermination d'une courbe d'étalonnage et permet l'obtention des coefficients k et k'.

** Préparation des échantillons à analyser*

Après adsorption des polymères, les particules sont lavées trois fois successives à l'eau, filtrées puis séchées sous vide.

L'analyse du spectre d'un échantillon inconnu permet d'accéder à S, rapport des densités optiques (DO_2/DO_1). On en déduit la valeur R (C_{DexP}/C_{PS}) et donc la quantité Q de dextrane adsorbée par g de PS-DVB. En divisant Q par la surface spécifique du polystyrène, on obtient Γ en mg/m^2 . Cette méthode a été préalablement utilisée au laboratoire pour étudier des supports à base de polystyrène enrobé d'alcool polyvinylique (11).

2-3 INFLUENCE DU TAUX DE SUBSTITUTION DU DEXTRANE EN GROUPES PHÉNOXY

2-3-1 Comparaison des taux de recouvrement déterminés par diverses méthodes

L'objectif de cette étape préliminaire consiste à valider la méthode de détermination de Γ par dosage du surnageant. Pour ce faire, les résultats ainsi obtenus sont comparés à ceux calculés par dosage direct en IR, de la quantité de dextrane déposée sur les billes de PS-DVB.

Le tableau III.1 compare les valeurs de Γ obtenues par la méthode du surnageant et par IR.

Polymère adsorbé					
DexPA ₂		DexPB ₂		DexPC ₁	
Γ_{UV}	Γ_{IR}	Γ_{UV}	Γ_{IR}	Γ_{UV}	Γ_{IR}
0,70	1,06	0,55	0,83	0,48	0,66
1,41	1,31	1,79	2,04	1,09	1,11
1,51	1,45	2,02	2,15	1,36	1,48
1,88	1,74	2,11	2,25	1,84	1,90

Tableau III.1 : Comparaison des méthodes du surnageant et analyse IR pour la détermination du taux de recouvrement des billes enrobées. Les taux de recouvrement sont exprimés en mg/m^2 de PS-DVB.

Les valeurs de Γ obtenues par les deux méthodes sont en bon accord, les différences constatées sont peu significatives sauf aux faibles valeurs de Γ . En effet, les valeurs mesurées par IR sont moins précises que celles obtenues par la mesure UV du surnageant aux faibles valeurs de Γ . Il est à noter que les mesures ont été réalisées avant l'étape de réticulation du polymère adsorbé car la présence d'un agent réticulant serait source d'erreur supplémentaire pour l'analyse IR.

Cette étude nous a permis de vérifier que la détermination de Γ par analyse UV du surnageant donne des résultats comparables à ceux obtenus par analyse directe des particules. La méthode du surnageant est par ailleurs beaucoup plus simple à mettre en oeuvre que la méthode IR, et a donc été utilisée de manière systématique pour l'étude ultérieure.

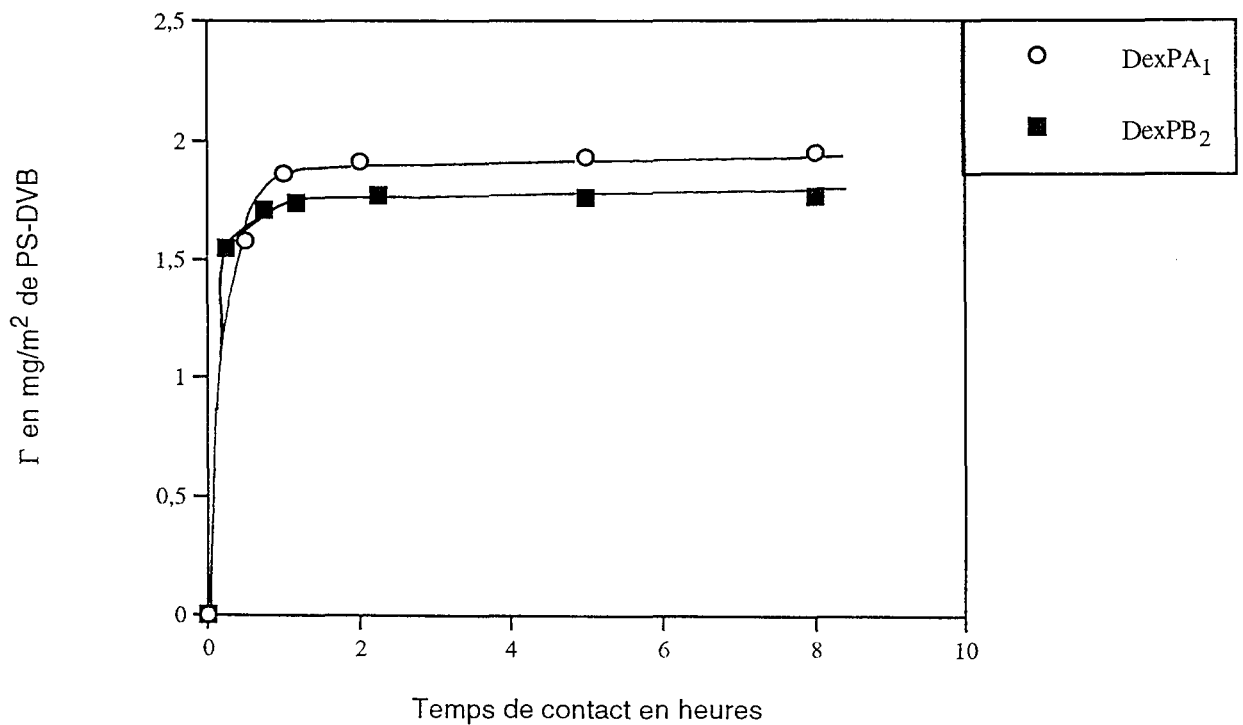


Figure III.4 : Cinétique d'adsorption de deux dextrans-phénoxy sur les particules de PS-DVB dans l'eau à température ambiante (5 mL de solution / 50 mg de billes).

DexPA₁ : 0,14 mmol de phénoxy/g de polymère, $M_p \approx 30000$ g/mol - concentration initiale 25 g/L
 DexPB₂ : 0,56 mmol de phénoxy/g de polymère, $M_p = 29150$ g/mol - concentration initiale 20 g/L

2-3-2 Cinétique d'adsorption

La détermination de la cinétique d'adsorption permet de connaître le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre d'adsorption et donc la quantité maximale de polymère adsorbée à la surface des particules, dans des conditions expérimentales de température, solvant, agitation et concentration fixées.

Il convient de noter à ce stade que l'équilibre d'adsorption ne correspond pas nécessairement à l'équilibre thermodynamique car des réarrangements conformationnels peuvent se produire sans variation notable de la quantité adsorbée (7).

Cette étude a été réalisée sur des dextrans-phénoxy à des teneurs différentes en groupes aromatiques. Les résultats présentés dans la figure III.4 appellent plusieurs commentaires :

- Tous les dextrans-phénoxy, quel que soit leur taux de substitution, présentent une affinité similaire et relativement élevée pour le polystyrène, l'équilibre d'adsorption étant atteint après moins de 2 heures. Un système à forte affinité sera en effet caractérisé par une cinétique très rapide de l'ordre de quelques secondes (12) alors que l'équilibre ne sera atteint qu'après plusieurs heures dans un système à faible affinité (13).

- Entre la phase initiale d'adsorption et le plateau final, existe une phase intermédiaire qui peut correspondre à une diffusion plus lente du polymère dans les pores et/ou au déplacement des petites chaînes par des chaînes de masses molaires plus élevées.

Pour les expériences suivantes, les temps de contact des particules de PS-DVB avec les DexP sont fixés par excès à 20 heures, les autres conditions expérimentales restant identiques.

2-3-3 Isothermes d'adsorption

Le dextrane très hydrophile par nature ne s'adsorbe pas sur le polystyrène-divinylbenzène.

Des isothermes d'adsorption de divers dextrans-phénoxy sont présentées sur la figure III.5.

La première partie des courbes où la concentration en polymère à l'équilibre (C_s) tend vers 0 correspond à une zone où le polymère possède une forte affinité pour le matériau, la quasi-totalité du polymère présente initialement en solution se dépose sur le polystyrène. Dans la deuxième partie des isothermes, la quantité de polymère adsorbé croît lentement jusqu'à atteindre un plateau de saturation.

Les valeurs à saturation notées Γ_{pl} , correspondant aux quantités maximales adsorbées, sont équivalentes quel que soit le taux de groupements phénoxy des dextrans et sont comprises entre 1,9 et 2,25 mg/m².

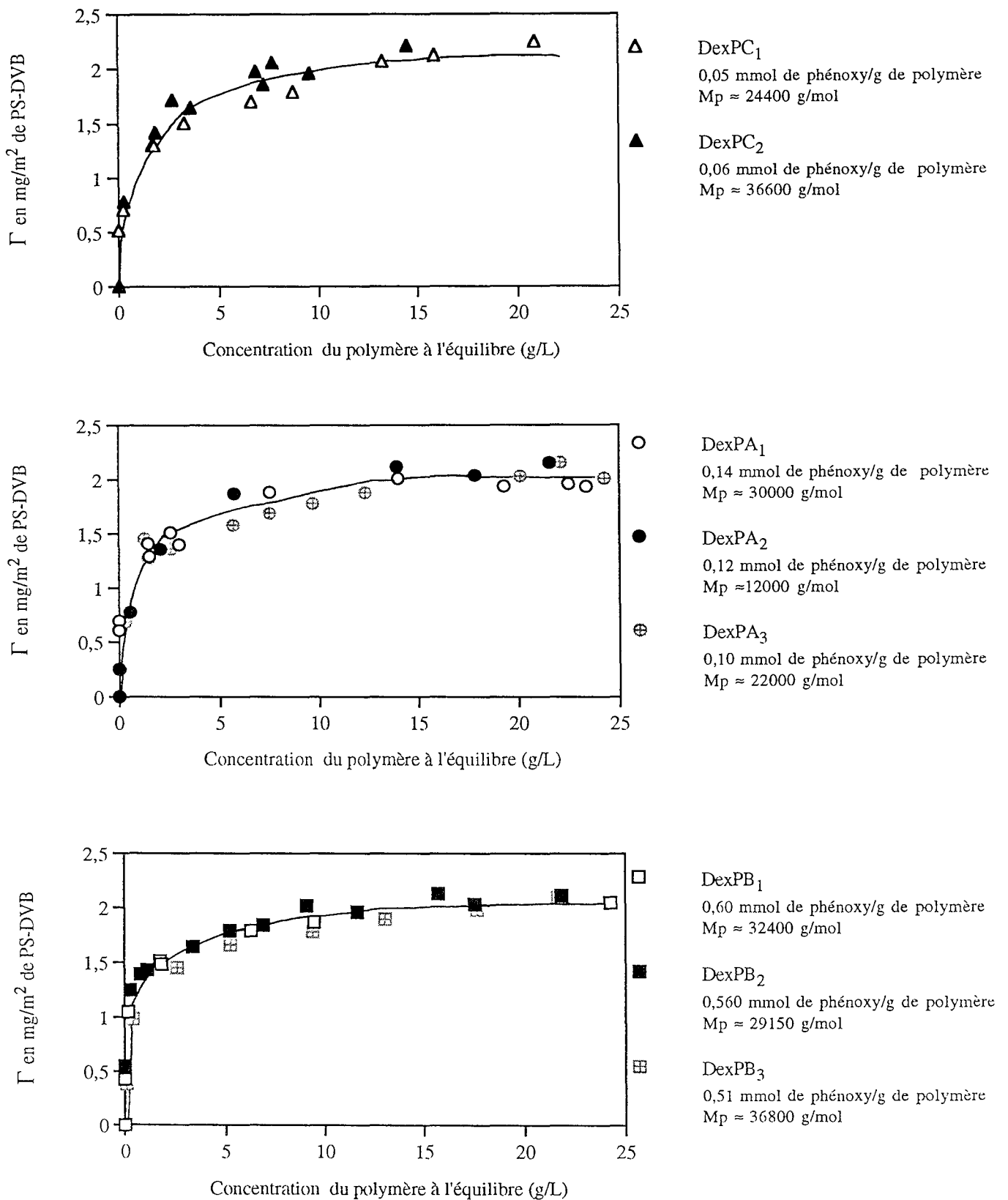


Figure III.5 : Isothermes d'adsorption des dextrans-phénoxy sur les particules de PS-DVB dans l'eau à température ambiante

Bien que les valeurs de Γ_{PI} obtenues pour les trois séries de dextrans soient comparables entre elles, on notera que les isothermes d'adsorption présentent une forme légèrement différente, plus aplatie pour les dextrans les moins substitués en phénoxy aux faibles concentrations en polymère à l'équilibre. Les dextrans DexPB, les plus substitués en groupes phénoxy, semblent avoir globalement une affinité plus grande pour le polystyrène.

Ces différences peuvent avoir des origines multiples, dont les principales sont énoncées ci-dessous :

- une différence de polymolécularité entre les trois séries de dextrans.

L'influence de ce paramètre est largement décrite dans la littérature. Dans le cas des homopolymères, l'adsorption de chaînes de haute masse est favorisée par rapport à l'adsorption de chaînes de masse molaire plus faible (4). A l'inverse, l'adsorption dans les cas de polymères téléchéliques (polymères associatifs dont le groupement hydrophobe est placé à l'extrémité des chaînes), l'adsorption des chaînes courtes est favorisée (14). Le cas des polymères dans lesquels des groupes hydrophobes sont placés de façon statistique le long de la chaîne macromoléculaire est moins étudié et cet aspect du phénomène d'adsorption n'a pas, à notre connaissance, été analysé.

Si l'on tient compte, en outre, de la porosité du support qui induit un fractionnement par la taille lors de l'adsorption, le phénomène devient alors très complexe (15).

En ce qui concerne nos résultats, il ne semble pas que la polymolécularité des échantillons soit un facteur déterminant pour l'allure des isothermes. En effet, les chromatogrammes correspondant à l'analyse par SEC de solutions de DexP, après et avant contact avec les particules de PS-DVB, ne sont pas significativement différents. Par ailleurs, on peut noter que l'influence de la masse molaire des polymères sur leurs propriétés d'adsorption est négligeable, dans le domaine étudié.

- le caractère hydrophobe plus marqué du polymère DexPB et une répartition vraisemblablement différente des groupements phénoxy sur le squelette de la macromolécule.

En général, une augmentation du caractère hydrophobe d'un polymère se traduit d'une part, par une augmentation de Γ_{PI} et d'autre part, par une pente initiale de l'isotherme plus grande (14, 16). Néanmoins, la plupart des études concernant ce phénomène porte sur des polymères dont le caractère hydrophobe est modulé par la nature du chaînon et non par une variation de son taux (14, 16) et les modèles proposés ne sont pas applicables au cas étudié ici.

- un pouvoir solvatant de l'eau moins grand pour le DexPB.

En effet, toutes théories prédisent que la quantité de polymère adsorbée croît quand la qualité du solvant diminue (17, 18). En d'autres termes, quand le pouvoir solvatant diminue, l'expansion de la macromolécule en solution est moindre et la quantité de polymère qui peut être déposée par m^2 augmente.

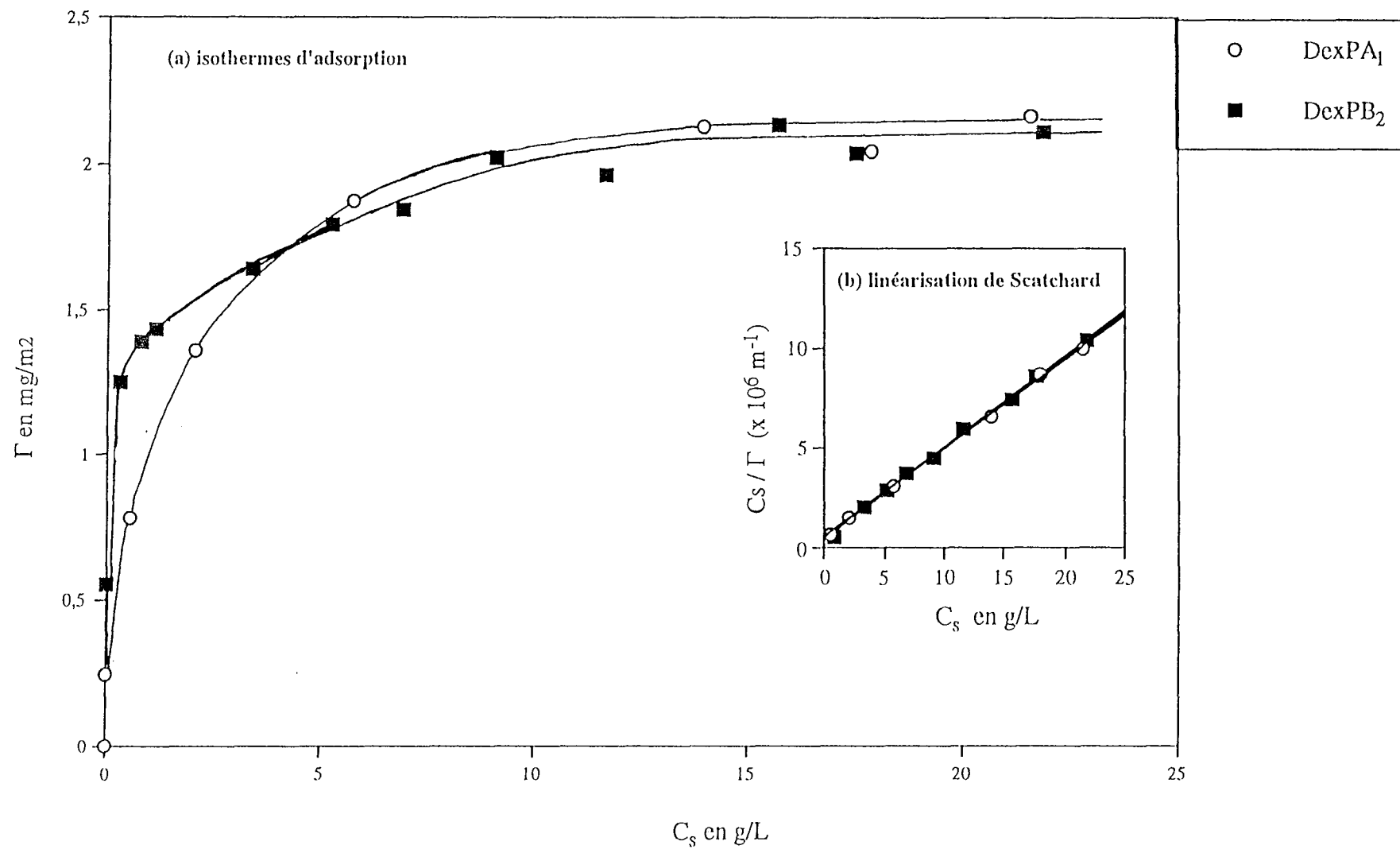


Figure III.6: Isothermes d'adsorption des DexPA₁ (0,14 mmol de phénoxy/g) et DexPB₂ (0,56 mmol/g) sur les particules de PS-DVB (a) et linéarisations de Scatchard (b)

De plus, la porosité du matériau intervient comme un paramètre non négligeable. En effet, l'adsorption d'un polymère ayant une faible affinité pour la surface dépendra non seulement de son énergie d'adsorption mais également de la taille des pores. L'épaisseur de la couche adsorbée sera alors plus importante au niveau des pores de grande taille qu'au niveau des pores de taille plus petite en raison de contraintes stériques moins grandes.

A l'examen de ces différents paramètres, on pourrait prédire qu'une augmentation du taux de substitution du dextrane en groupes phénoxy devrait se traduire par un accroissement de la pente de l'isotherme à l'origine et de la valeur de Γ_{pl} . Ceci est effectivement observé aux faibles concentrations en dextrane. A des concentrations en dextrane plus élevées, d'autres paramètres tels que l'interpénétration et la déformation des chaînes ou la formation d'interactions entre chaînes, associés à une plus grande erreur expérimentale, pourraient contribuer à masquer ce phénomène.

Enfin, nous pouvons remarquer que toutes les isothermes d'adsorption des dextrans modifiés sur le polystyrène s'apparentent à des isothermes de type Langmuir monocouche. Ce modèle repose sur le fait qu'il n'existe qu'une seule sorte d'interactions mises en jeu entre le polymère et l'adsorbant et que les sites de ce dernier sont saturables.

Pour vérifier l'applicabilité de ce modèle au cas des dextrans-phénoxy adsorbés sur le polystyrène, plusieurs linéarisations des isothermes sont envisageables dont celle de Scatchard qui repose sur l'équation [8] :

$$\frac{C_s}{\Gamma} = \frac{1}{K \cdot \Gamma_{pl}^*} + \frac{C_s}{\Gamma_{pl}^*} \quad [8]$$

où C_s est la concentration en polymère à l'équilibre (mg/m^3)

Γ est le taux de recouvrement des particules à la concentration C_s (mg/m^2)

Γ_{pl}^* est le taux de recouvrement maximal théorique des particules (mg/m^2)

K est la constante d'affinité entre les sites d'interaction du polymère et les sites d'interaction du polystyrène (m^3/mg)

Le tracé de $\frac{C_s}{\Gamma}$ en fonction de C_s permet de connaître Γ_{pl}^* ainsi que la constante K .

La figure III.6 donne un exemple d'isothermes d'adsorption de dextrans différemment hydrophobisés et de la linéarisation selon Scatchard qui en résulte.

La loi linéaire que suit $\frac{C_s}{\Gamma}$ en fonction de la concentration à l'équilibre confirme l'adsorption monocouche des DexP à la surface du polystyrène. Les valeurs calculées de Γ_{pl}^* sont équivalentes à celles obtenues expérimentalement. La détermination graphique des constantes d'affinité n'a pas été entreprise car elle semble peu précise.

A ce stade de la discussion, nous pouvons procéder au calcul de Γ théorique en choisissant le modèle de recouvrement en monocouche des particules le plus simple, c'est-à-dire correspondant à la juxtaposition de pelotes sphériques de polymère.

Le calcul du taux de recouvrement théorique Γ_{th} s'effectue à partir de la relation suivante :

$$\Gamma_{th} = \frac{\overline{M}_n}{\pi \cdot \langle Rg^2 \rangle_n \cdot N}$$

où N représente le nombre d'Avogadro.

Les \overline{M}_n sont évaluées au MALLS-SEC et les rayons de giration moyens en nombre calculés d'après la théorie de Fox-Flory (cf. chapitre II). Le tableau III.2 compare les taux de recouvrement théoriques et expérimentaux (à saturation) obtenus avec deux dextrans-phénoxy différents :

DexP	$\langle Rg^2 \rangle_n^{1/2}$ (Å)	\overline{M}_n (g/mol)	Γ_{th} (mg/m ² de PS-DVB)	Γ_{pl} (mg/m ² de PS-DVB)
DexPA ₂	46	17700	0,69	2,1
DexPB ₂	42	25500	0,70	2,0

Tableau III.2 : Comparaison des taux de recouvrement de particules de PS-DVB théoriques (Γ_{th}) et expérimentaux (Γ_{pl}) obtenus avec le DexPA₂ (0,10 mmol de phénoxy/g de polymère) et le DexPB₂.

Les valeurs de Γ_{th} sont très faibles devant celles de Γ_{pl} . Ce phénomène a déjà été observé par de nombreux auteurs. Le calcul suppose implicitement que les pelotes macromoléculaires sont des sphères de dimensions non perturbées et ne tient compte ni de la polymolécularité ni de la géométrie de la surface, ce qui explique les différences obtenues.

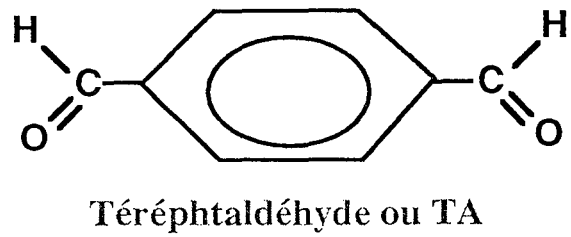
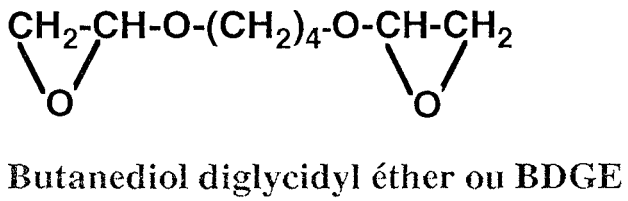
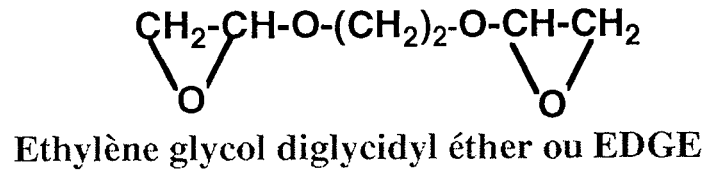
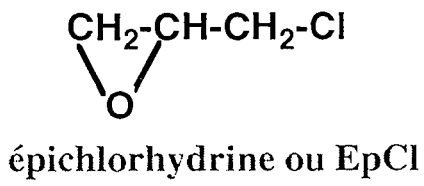


Figure III.7 : Formules des divers agents réticulants utilisés

3 - STABILISATION DE LA COUCHE DE POLYMÈRE DÉPOSÉ

3-1 PRÉSENTATION ET OBJECTIFS

Après adsorption du dextrane hydrophobisé à la surface des billes de PS-DVB, la couche formée peut être désorbée partiellement au contact de molécules hydrophobes telles que les solvants organiques, les protéines ou les détergents. Pour éviter cette désorption, il est nécessaire de procéder à la stabilisation du film de polymère déposé. Cette étape est réalisée classiquement par réticulation chimique des macromolécules entre elles et repose alors sur le choix et la concentration de l'agent réticulant.

Un lavage par un détergent tel que le sulfate de dodécyle de sodium (noté SDS) intervient dans un second temps. Cette étape contribue à éliminer les chaînes de polymères faiblement liées à la surface et donc susceptibles de se désorber ultérieurement, particulièrement lors de l'utilisation des particules comme support chromatographique.

Différents agents de réticulation ont été testés. Nous décrirons dans cette partie, l'influence de leurs propriétés chimiques ainsi que de leur concentration, sur la stabilité de la couche déposée et nous comparerons les résultats avec ceux obtenus en l'absence de réticulation chimique.

3-2 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX

3-2-1 Réticulation chimique

Les agents de réticulation que nous avons utilisés sont l'épichlorhydrine (EpCl), le butanediol diglycidyl éther (BDGE), l'éthylène glycol diglycidyl éther (EDGE) et le téréphtaldéhyde (TA) (figure III.7). Toutes les réticulations sont effectuées en milieu basique, exception faite du téréphtaldéhyde qui réagit en milieu acide.

** Mode opératoire général :*

Après adsorption du polymère, les billes sont lavées 3 fois à l'eau. Dans ces conditions, aucune désorption significative n'est observée. A 1 mL de billes recouvertes de DexP en suspension dans l'eau sont ajoutées des quantités variables d'agent réticulant et le volume est complété à 5 mL dans le milieu réactionnel par addition de soude ou d'acide chlorhydrique (les concentrations finales de base et d'acide sont respectivement de 1 et 0,1M). La suspension est agitée 24 heures à température ambiante.

** Dosage de la quantité de DexP désorbée pendant l'étape de réticulation*

La désorption des dextrans-phénoxy est quantifiée par le dosage des surnageants à l'antrone et non par spectroscopie UV, les agents de réticulation modifiant l'absorbance des solutions de dextrans. Des solutions étalons sont préparées par dissolution du polymère dans NaOH 1M ou HCl 0,1M en présence d'agent réticulant.

3-2-2 Lavage des particules par un détergent

** Mode opératoire*

1 mL de billes en suspension dans l'eau est mélangé à 4 mL de SDS à 2,5 % pour que la concentration en SDS soit de 2 % dans la suspension finale. Les billes restent au contact de la solution de SDS à 2 % (agitateur tournant) pendant une nuit dans une étuve thermostatée à 40°C. Après centrifugation, le prélèvement du surnageant est effectué. Les billes sont lavées plusieurs fois à l'eau à 40°C, jusqu'à ce que les eaux de lavage ne contiennent plus de SDS (vérification par spectroscopie 200-300 nm) avant tout usage ultérieur.

** Dosage de la quantité de DexP désorbée pendant le lavage au SDS*

Les quantités désorbées au cours de cette étape sont dosées à l'antrone. Une solution de DexP à 1 g/L environ dans le SDS 2 % est utilisée pour l'étalonnage (annexe).

3-2-3 Calcul du taux de recouvrement final

La différence entre la quantité initialement adsorbée de polymère et celles désorbées (ramenée par unité de surface) au cours de l'étape de réticulation et du lavage par un détergent permet d'accéder au taux de recouvrement réel des billes noté Γ_f à la fin de leur préparation.

$$\Gamma_f = \frac{Q_{\text{initiale}} - Q_{\text{désorbée}}}{m \cdot S}$$

avec m : poids de particules sèches de PS-DVB (en g)

S : surface spécifique en m²/mg (S = 0,2 m²/mg)

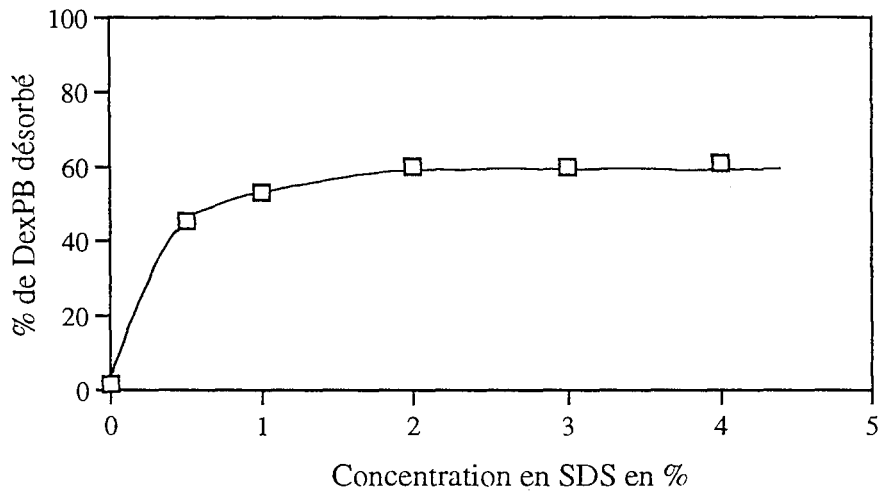


Figure III.8: Pourcentage de DexPB (0,6 mmol de phénoxy /g de dextrane) désorbé en présence de SDS (avant réticulation) en fonction de la concentration en détergent (% ou g/dL). Les particules ont un taux de recouvrement initial en DexPB de 2 mg/m².

3-3 INFLUENCE DE LA NATURE ET DE LA CONCENTRATION EN AGENT RÉTICULANT

Quatre agents de réticulation classiques ont été choisis afin de trouver les conditions optimales pour la stabilisation de la couche adsorbée. Parmi ces réactifs ont été utilisés trois époxydes de réactivité et de caractère hydrophobe différents et un dialdéhyde aromatique. Nous avons observé une désorption partielle de polymère en présence de ces réactifs. Afin d'optimiser les réactions, nous avons pour chacun d'entre eux, étudié l'influence de la concentration. Dans chaque cas, nous avons déterminé la quantité de polymère désorbé au cours de cette étape ainsi qu'après lavage au SDS. Avant réticulation de la couche déposée, le maximum de désorption ($\approx 60\%$) est obtenu pour des concentrations en SDS supérieures à 1% (g/dL). Pour exemple, la figure III.8 relie le pourcentage de DexPB ($0,6\text{ mmol/g}$ de polymère) relargué en fonction de la concentration du détergent utilisée, le polymère étant adsorbé à saturation soit 2 mg/m^2 . D'après cette courbe, la désorption totale n'est pas atteinte dans cette gamme de concentration en SDS. La solution de détergent que nous avons utilisée dans la suite pour laver les billes de PS-DVB modifiées a une concentration de 2% .

Les essais de réticulation ont été réalisés à partir de 50 mg de billes de PS-DVB recouvertes d'un dextrane-phénoxy à Γ_{pl} (soit 2 mg/m^2) de DexPA ($0,14\text{ mmol phénoxy/g}$ de dextrane).

Les résultats sont présentés dans la figure III.9 sous forme d'histogrammes cumulés donnant les pourcentages de polymère désorbés au cours de chaque étape (réticulation et lavage). Les conditions optimales de réticulation sont celles qui donnent lieu à la plus faible quantité de polymère désorbée au total (étape de réticulation + lavage au SDS).

Il est aisé de constater que lorsque la concentration en agent réticulant est trop faible, quelle que soit sa nature, la réticulation n'a qu'une efficacité limitée puisqu'une désorption importante du dextrane est constatée dans la solution de SDS à 2% . Cependant, peu de polymère est désorbé pendant l'étape même de réticulation.

A l'inverse, quand les concentrations en réactif augmentent, la quantité de dextrane éliminée de la surface pendant l'étape de réticulation augmente également. Le réactif en trop forte concentration déplace donc en partie le polymère adsorbé vraisemblablement par le biais d'interactions hydrophobes compétitives avec le polystyrène. Il semble en fait, toutes autres conditions égales par ailleurs, que la quantité de polymère désorbée augmente avec le caractère hydrophobe de l'agent réticulant.

Finalement, nous avons choisi l'épichlorhydrine comme agent de réticulation, à une concentration de $0,6\text{ mol/l}$ puisque la désorption du DexPA est minimale à l'issue des deux étapes. Dans ce cas, seulement 15% de dextrane sont désorbés contre 65% en l'absence de réticulation.

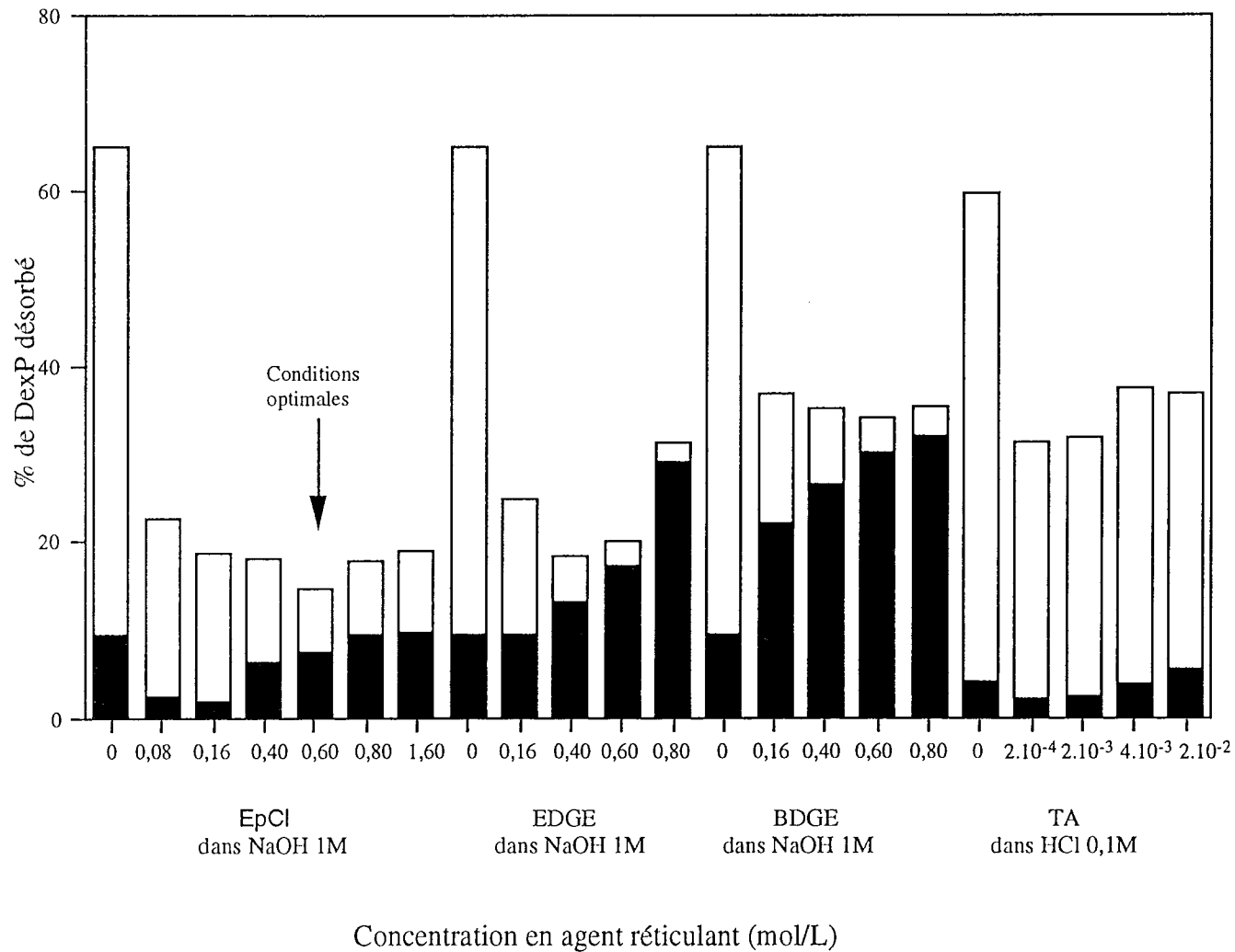


Figure III.9: Pourcentages de DexPA (0,14 mmol de phénoxy/g de dextrane) désorbé au cours de l'étape de réticulation (■) et de lavage au SDS à 2% (□) en fonction de la nature et de la concentration de l'agent réticulant. L'optimisation est réalisée sur 50 mg particules de PS-DVB recouvertes à $\Gamma_{pl} = 2 \pm 0,2 \text{ mg/m}^2$.

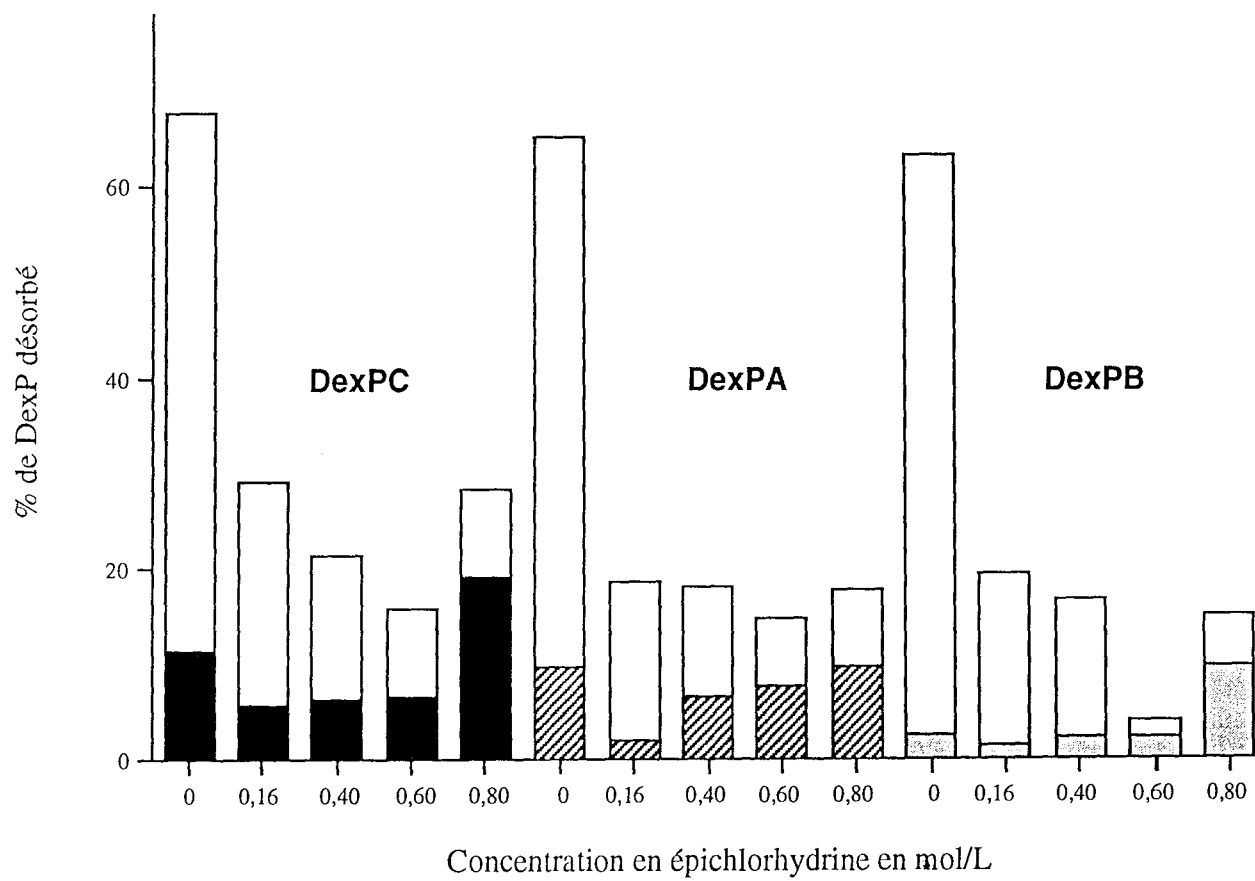


Figure III.10.: Pourcentages de DexP désorbés au cours des étapes de réticolation (▨) et de lavage au SDS à 2% (□) en fonction de la concentration en épichlorhydrine et du taux de groupes phénoxy du polymère. Les polymères DexPC, DexPA et DexPB sont adsorbés à Γ_p ($2 \pm 0,2 \text{ mg/m}^2$) dont les taux de phénoxy sont respectivement de 0,05, 0,14 et 0,56 mmol/g.

3-4 INFLUENCE DU TAUX DE SUBSTITUTION

Les conditions optimales requises pour la stabilisation ont été obtenues avec l'épichlorhydrine à 0,6 mol/l pour le DexPA adsorbé à 2 mg/m² sur les particules de PS-DVB. Il paraît intéressant de vérifier que ces conditions de stabilisation s'appliquent aussi aux autres supports obtenus par recouvrement du polystyrène à Γ_{pl} avec des dextrans-phénoxy différemment substitués.

La figure III.10 compare les pourcentages de polymère désorbé au cours de la stabilisation en fonction de la concentration d'épichlorhydrine et du taux de groupements phénoxy portés par le dextrane. Les effets concernant l'influence de la quantité de réactif utilisée sont similaires à ceux précédemment décrits. Dans des conditions identiques, la stabilité de la couche adsorbée semble d'autant plus grande que le contenu en groupes phénoxy du dextrane augmente. Quoiqu'il en soit, pour chacun de ces polymères, les conditions optimales sont atteintes pour une même concentration de 0,6 M en épichlorhydrine. Les pourcentages de polymère relargué durant ces étapes de stabilisation, par rapport aux quantités adsorbées au départ, sont respectivement de :

- 15 %, pour les supports recouverts de DexPC et de DexPA
- 8 %, pour les supports recouverts de DexPB.

Dans les études suivantes, toutes les couches de polymère adsorbé sont réticulées dans ces conditions optimales. Après réticulation et lavage au SDS, aucune désorption de polymère n'est observée en solution aqueuse de pH 1 à pH 14 après 20 heures à température ambiante. Néanmoins, l'utilisation des supports préparés à pH < 2 doit être évitée car une hydrolyse partielle du dextrane adsorbé est probable. Pour comparaison, les quantités de polymère désorbé, lorsque les supports non traités par l'agent réticulant sont placés dans les mêmes conditions, sont représentées sur la figure III.11.

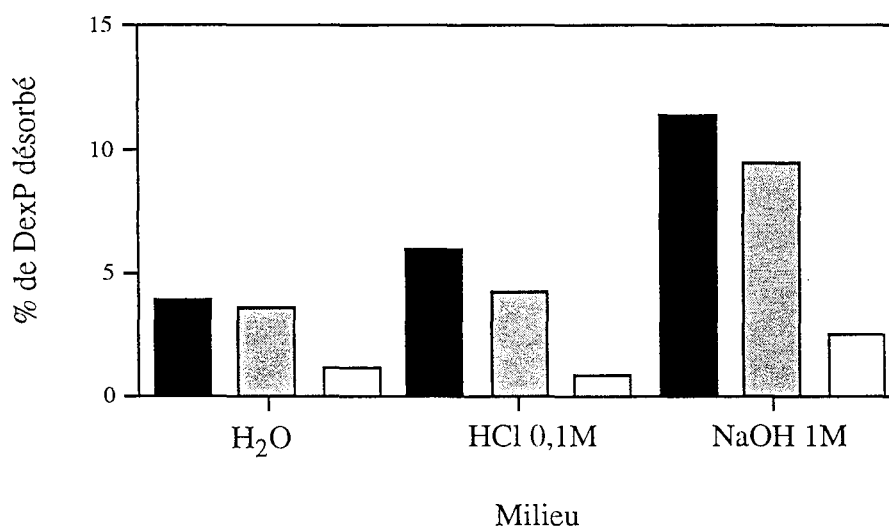


Figure III.11 : Stabilité de la couche de polymère adsorbée sur les particules de PS-DVB dans divers milieux aqueux . Les pourcentages de polymère désorbé sont donnés pour différents taux de groupes phénoxy des DexP:

(■) pour le DexPC à 0,05 mmol/g de polymère

(▨) pour le DexPA à 0,14 mmol/g de polymère

(□) pour le DexPB à 0,60 mmol/g de polymère

4 - CONCLUSION

Le dextrane ne s'adsorbe pas sur le polystyrène. La fixation covalente de groupes phénoxy sur le polysaccharide conduit à la formation de dérivés amphiphiles capables quant à eux de s'adsorber à la surface des particules par le biais d'interactions hydrophobes entre les groupes aromatiques et la surface de polystyrène.

Les isothermes d'adsorption des différents dextrans-phénoxy obtenues dans l'eau sont typiquement de type Langmuir-monocouche, c'est-à-dire que la quantité de polymère adsorbé croît avec la concentration du polymère en solution jusqu'à atteindre une valeur plateau. Le mécanisme d'adsorption des différents dextrans phénoxy à la surface des billes ne semble pas rigoureusement identique selon la teneur en groupes phénoxy. En effet, les isothermes d'adsorption n'ont pas la même allure aux faibles concentrations en polymère. Cependant la même valeur plateau est obtenue. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que dans tous les cas, des sites de même nature sont impliqués dans les interactions qui s'établissent avec la surface.

Bien que l'étude en spectroscopie de fluorescence montre que les dextrans hydrophobisés commencent à s'associer pour des concentrations supérieures à 1 g/L pour le DexPB (0,5 mmol de phénoxy/g de polymère), 2 g/L pour le DexPA (0,1 mmol de phénoxy/g de polymère) et 8 g/L pour le DexPC (0,05 mmol de phénoxy/g de polymère), les isothermes n'indiquent pas d'adsorption d'agrégats ni d'adsorption multicouches. Ceci suppose que des chaînes isolées s'adsorbent préférentiellement sur le polystyrène jusqu'à saturation de la surface, dans la gamme de concentration étudiée.

Afin d'éviter toute désorption de dextrane en présence de molécules hydrophobes ou surfactants, la couche de polymère adsorbé est ensuite stabilisée par réticulation chimique en présence d'agents réticulants. La désorption de dextrane pendant l'étape de réticulation augmente avec la concentration et le caractère hydrophobe du réactif et traduit la formation d'interactions hydrophobes compétitives avec la surface.

Les particules sont ensuite lavées en présence de SDS 2% afin d'éliminer les chaînes trop faiblement liées à la surface de polystyrène. Ceci permet également d'évaluer l'efficacité de la réticulation. Selon les résultats obtenus, la réticulation des dextrans par réaction avec l'épichlorhydrine à 0,6M conduit à une stabilisation maximale de la couche déposée et ce, indépendamment du taux de substitution en groupes phénoxy des polymères

BIBLIOGRAPHIE

- (1) H. L. Frish, R. Simha et F. R. Eirich
Statistical mechanics of polymer adsorption
J. Chem. Phys., **21**, (1953), 365-366
- (2) J. M. H. M. Scheutjens et G. J. Fleer
Statistical theory of the adsorption of interacting chain molecule .1. partition function, segment density distribution and adsorption isotherm
J. Chem. Phys., **83**, (1979), 1619-1635
- (3) P. G. De Gennes
Scaling concept in polymers
Cornell University Press, Ithaca, N Y, (1979)
- (4) S.P.F.M. Roefs, J. M. H. M. Schentjens et F.A.M. Leermakers
Adsorption theory of polydisperse polymers
Macromolecules, **27**, (1994), 4810-4816
- (5) R. J. Roe
Multilayer theory of adsorption from polymer solution
J. Chem. Phys., **60**, (1974), 4192-4207
- (6) M. A. Cohen-Stuart, T. Cosgrove et B. Vincent
Experimental aspects of polymers adsorption at solid/solution interfaces
Adv. Colloid Interface Sci., **24**, (1986), 143-239
- (7) M. Kawaguchi et A. Takahashi
Polymer adsorption at solid-liquid interfaces
Adv. Colloid Interface Sci., **37**, (1992), 219-317
- (8) H. Hommel
Polymers at solid interfaces : a spin labelling approach
Adv. Colloid Interface Sci., **54**, (1995), 209-277
- (9) P. G. De Gennes
Conformations of polymers attached to an interface.
Macromolecules, **13**, (1980), 1069-1075
- (10) T. A. Scott et E. H. Melvin
Determination of dextran with anthrone
Anal. Chem., **25**, (1953), 1656-1661
- (11) M. Léonard, C. Fournier et E. Dellacherie
Polyvinyl alcohol-coated macroporous polystyrene particles as stationary phases for the chromatography of proteins
J. Chromatogr. A, **664**, (1995), 39-46
- (12) R. R. Stromberg et G. M. Kline
Adsorption of polymers on glass and other substrates
Mod. Plast., **38**, (1961), 129-130
- (13) L. Gargallo et E. Cid
Adsorption characteristics of poly(vinylpyrrolidone) at the solid-liquid interface.
Colloid Polym. Sci., **255**, (1977), 556-559

- (14) M. S. Kelly and M. M. Santore
Adsorption behavior and potential interfacial morphology : impact of adsorbing hydrophobic groups in polymers with weakly adsorbing main backbones
J. Appl. Polym. Sci., **58**, (1995), 247-263

- (15) S. Anada et M. Kawaguchi
Effect of surface geometry on polymer adsorption. 3. Competitive adsorption at the θ point.
Macromolecules, **25**, (1992), 6824-6828

- (16) R. D. Jenkins, M. Durali, C. A. Silebi et M. S. El Aasser
Adsorption of model associative polymers on monodisperse polystyrene latex
J. Colloid. Interfac. Sci., **54**, (1992), 502-521

- (17) C.A. Hoeve
General theory of polymer absorption at a surface.
J. Polym. Sci., **30**, (1970), 361-367

- (18) P. G. De Gennes
Scaling theory of polymer adsorption.
J. Phys., **37**, (1976), 1445 -1442

CHAPITRE IV

CHAPITRE IV

CARACTÉRISATIONS PHYSICO-CIMIQUES DE LA COUCHE DE DEXTRANE DÉPOSÉE À LA SURFACE DU POLYSTYRÈNE

Le caractère plus ou moins hydrophile des particules de PS-DVB recouvertes de dextrans-phénoxy a été évalué en présence d'albumine de sérum bovin, protéine présentant une forte affinité pour les surfaces hydrophobes. L'influence de différents paramètres tels que le taux de recouvrement et la composition chimique du dextrane adsorbé a été étudiée.

La structure et les propriétés dynamiques de la couche adsorbée sont des facteurs déterminants dans les interactions entre la surface et le milieu environnant. Aussi, les résultats obtenus ont été interprétés en termes de conformation et mobilité des chaînes de dextrane à l'interface polystyrène-eau. Cette étude a été réalisée par Résonance Paramagnétique Électronique.

1 - CARACTÉRISATION CHIMIQUE DE LA SURFACE

Le dépôt d'un polymère amphiphile à la surface de particules de PS-DVB induit une modification de leurs propriétés initiales, tant chimiques que structurales.

L'analyse chimique d'une surface, dans ce cas précis, après adsorption de dextrane-phénoxy, se caractérise dans un premier temps par la quantité de polymère adsorbée. Cet aspect a été discuté dans le chapitre III où nous avons mis en évidence la variation importante du taux de recouvrement des particules avec la concentration des polymères à l'équilibre et en moindre proportion avec le taux de groupes phénoxy des dextrans. Quoiqu'il en soit, le taux de recouvrement maximal des particules est de $2 \pm 0,2 \text{ mg/m}^2$ quel que soit le polymère considéré.

La densité de charges de surface sur un matériau est un paramètre très important. Comme nous l'avons montré au cours du chapitre II, les dextrans-phénoxy sont porteurs de quelques charges négatives non quantifiables par potentiométrie. Des mesures de potentiel ζ sur les particules natives et modifiées par les divers DexP ne sont pas envisageables compte tenu de la granulométrie élevée des particules (20 à 60 μm) et de la différence de leur vitesse de sédimentation avant et après adsorption de polymère à leur surface.

L'objectif de notre étude est l'hydrophilisation de particules de PS-DVB en vue d'élaborer des supports biochromatographiques. En ce sens, les caractéristiques principales de la couche adsorbée concernent surtout le caractère hydrophile des particules modifiées et le comportement des polymères adsorbés en terme conformationnel, sachant que la flexibilité des chaînes de polymère adsorbé et que la densité de couche formée interviennent de façon non négligeable dans les phénomènes d'adsorption des protéines aux interfaces et donc dans les processus chromatographiques.

2 - RÉACTIVITÉ DE LA SURFACE VIS-À-VIS DE L'ALBUMINE

2-1 GÉNÉRALITÉS SUR L'ADSORPTION DES PROTÉINES SUR DES SURFACES

2-1-1 Caractérisation générale des protéines

Les protéines sont des macromolécules d'origine biologique souvent destinées à une fonction unique et spécifique. Elles sont constituées d'un enchaînement d'acides aminés dont la séquence détermine la structure et la propriété.

La composition en acides aminés, leur ordre et leur nombre est propre à chaque protéine et constitue la structure primaire. La structure secondaire résulte des liaisons hydrogène établies dans le squelette de la protéine qui peuvent donner naissance à une conformation en hélice α ou feuillets β . Les associations ioniques et hydrophobes, les liaisons hydrogène et les ponts disulfure donnent naissance à la structure tertiaire propre à chaque chaîne de polypeptide. Enfin, deux ou plusieurs chaînes peuvent s'associer de façon non covalente pour former la structure quaternaire.

Une protéine est donc caractérisée par sa masse moléculaire, son point isoélectrique (pI) et la distribution des charges à sa surface, par son hydrophobie, sa structure tridimensionnelle et la présence de sites actifs, sa forme et sa rigidité, sa solubilité dans divers milieux aqueux. Ces diverses propriétés résultent de la structure moléculaire globale des protéines et interviennent lors d'un processus d'adsorption. Néanmoins, l'ensemble de ces caractéristiques n'est connue que pour quelques protéines. Souvent seule leur double nature **amphotère** et **hydrophobe** sert d'élément de base et de comparaison pour tenter d'expliquer un phénomène d'adsorption, en particulier lors de séparations chromatographiques (1). Néanmoins, la purification d'une protéine par chromatographie d'affinité nécessite également une bonne connaissance des propriétés de son site actif.

Le point isoélectrique d'une protéine est le pH auquel sa charge nette ou globale est nulle. A $\text{pH} < \text{pI}$, la protéine porte une charge globale positive. A l'inverse, dans des conditions plus basiques ($\text{pH} > \text{pI}$), la protéine est globalement chargée négativement.

La présence d'acides aminés hydrophobes dans la composition de la protéine, c'est-à-dire ceux dont la chaîne latérale a un fort caractère apolaire, confère à la protéine un caractère hydrophobe. Des échelles d'hydrophobie des protéines ont été décrites dans la littérature (2,3).

La plupart des protéines sont des molécules fragiles. Elles peuvent se dénaturer sous l'effet de la chaleur, de l'addition d'agent dénaturant (solvant, détergent), d'une variation importante de pH ou de force ionique ou encore au contact de certaines surfaces. La dénaturation se caractérise par une modification réversible ou irréversible du repliement caractéristique des chaînes peptidiques dans la molécule native et se traduit également par une modification de leur activité.

2-1-2 Adsorption des protéines

Nous allons aborder l'aspect phénoménologique de l'adsorption des protéines sur une surface (4). Les paramètres qui gouvernent l'adsorption des protéines sont les caractéristiques propres de la surface et de la protéine ainsi que la nature et la composition du solvant.

A l'instar des polymères, les protéines sont adsorbées sur des surfaces par le biais d'interactions de natures variées :

* Les interactions ioniques : elles proviennent de forces coulombiennes entre charges opposées. Il y a corrélation directe entre charge et adsorption. Une charge nette globalement nulle ne signifie pas pour autant que la protéine n'ait pas de charge de surface mais seulement que ces charges se compensent.

Sur une surface chargée, seule une partie de la surface protéique rentre en contact avec le matériau adsorbant. Les contraintes stériques et la distribution des charges (zones \pm chargées) indépendamment de la charge nette gouvernent le processus d'adsorption. Ces interactions peuvent être rompues en augmentant la force ionique du milieu, par effet de compétition pour la surface entre les ions du sel et la protéine. Une variation de pH modifie également ces interactions car conduit de toute évidence à une modification du nombre et de la nature des charges.

* Les liaisons hydrogène : elles résultent de l'interaction électrostatique entre un atome d'hydrogène "acide" et un atome électronégatif. Un solvant polaire tel que l'eau participe à leur mise en place. Ces liaisons sont stables mais réversibles et sont rompues par augmentation de la température ou par addition d'un ion chaotrope.

* Les interactions de transfert de charge : dans l'eau, ces interactions ont pour principale origine les interactions (π - π).

* Les interactions hydrophobes: elles sont induites par les propriétés structurantes des molécules d'eau. Lorsque plusieurs chaînes hydrophobes sont présentes dans le milieu, tout se passe comme si les molécules d'eau repoussaient les segments hydrophobes les uns vers les autres puis se réorganisaient autour de la structure hydrophobe formée. Elles sont renforcées par une élévation de température et une augmentation de la force ionique, lorsque les ions sont non chaotropiques.

Les forces hydrophobes assurent en partie le maintien et la compacité des structures tertiaire et quaternaire d'une protéine. Cependant si les interactions entre la protéine et la surface sont trop fortes, la protéine peut subir un changement de conformation de façon à présenter à la surface un maximum de groupements hydrophobes, ce qui peut provoquer ainsi sa dénaturation (4,5). Il a été montré logiquement que l'interaction d'une protéine sur une surface se renforce avec les caractères hydrophobes de la surface et de la protéine (5).

De plus, à pH égal au pI, les répulsions électrostatiques au sein des molécules protéiques sont minimisées et les propriétés hydrophobes de la protéine sont exacerbées. Sur une surface hydrophobe, les protéines s'adsorbent généralement davantage à leur pI.

Les interactions biospécifiques sont quant à elles, créées par une combinaison singulière et bien définie de plusieurs types d'interactions. Ainsi, une surface ayant une affinité spécifique pour une seule protéine permet la séparation de cette protéine dans un mélange donné.

Quoiqu'il en soit, la complexité de ces molécules rend difficile la modélisation de leur adsorption. Néanmoins, de nombreux auteurs traitent de ces mécanismes d'adsorption dans la perspective d'étudier le comportement des protéines au cours des processus chromatographiques selon un mode de séparation donné (6,7,8).

Dans l'élaboration de biomatériaux, la réduction de l'adsorption non-spécifique de protéines est un critère essentiel. Aussi la détermination de la quantité de protéines hydrophobes adsorbées sur un matériau, est une excellente stratégie pour évaluer l'inertie de ce matériau, en terme d'hydrophobie. Cette démarche a été suivie par de nombreux auteurs (9,10) et la protéine la plus couramment utilisée est l'albumine.

2-2 ADSORPTION DE L'ALBUMINE DU SÉRUM BOVIN

2-2-1 Généralités sur l'albumine

L'albumine de sérum bovin notée BSA est la protéine la plus abondante dans le plasma sanguin où elle assure un rôle de dépôt et de transport (11). Elle sert très couramment de modèle en terme d'adsorption en raison de la bonne caractérisation de sa structure et de son caractère hydrophobe prononcé (2,3). De plus, cette protéine est robuste et facilement dosable. Sa masse molaire est de 67000 g/mol et son pI avoisine 4,8.

2-2-2 Protocoles expérimentaux

2-2-2-1 Principe et conditions d'adsorption

Le caractère plus ou moins hydrophile des particules de polystyrène est évalué en présence d'albumine.

La détermination des isothermes d'adsorption consiste à relier la quantité de protéine adsorbée Q (en mg/g d'adsorbant) sur les particules de PS-DVB en fonction de sa concentration à l'équilibre (g/L).

Les solvants d'adsorption utilisés sont un tampon phosphate 0,05 M, à pH 7 et un tampon citrate 0,05 M, à pH 5. Les divers échantillons de particules modifiées diffèrent par la quantité de dextrane adsorbée et par le contenu des polymères en groupes phénoxy. La couche de polymère a été stabilisée, dans tous les cas, par réticulation chimique à l'épichlorhydrine à 0,6 M suivie d'un traitement au sulfate dodécyle de sodium à 2 %.

50 mg de billes natives ou modifiées (équivalent poids sec de PS-DVB) sont mis en suspension dans 5 mL de solutions d'albumine bovine (Sigma, pureté de 99 %) de concentrations variables. Les suspensions sont agitées pendant 20 heures à température ambiante. Après centrifugation, les surnageants sont prélevés et dosés dans les conditions décrites ci-dessous.

2-2-2-2 Dosage des solutions d'albumine

Les solutions d'albumine sont dosées en spectroscopie UV à 3 longueurs d'ondes distinctes : 260, 270, 280 nm à partir de courbes d'étalonnage préalablement établies. Les densités optiques des surnageants de BSA sont mesurées aux 3 longueurs d'onde. Les concentrations sont déterminées en reportant les 3 densités optiques sur les courbes d'étalonnage correspondantes. Les concentrations en BSA obtenues aux trois longueurs d'onde sont identiques, ce qui indique que seule la protéine est dosée et qu'il n'y a pas de désorption de

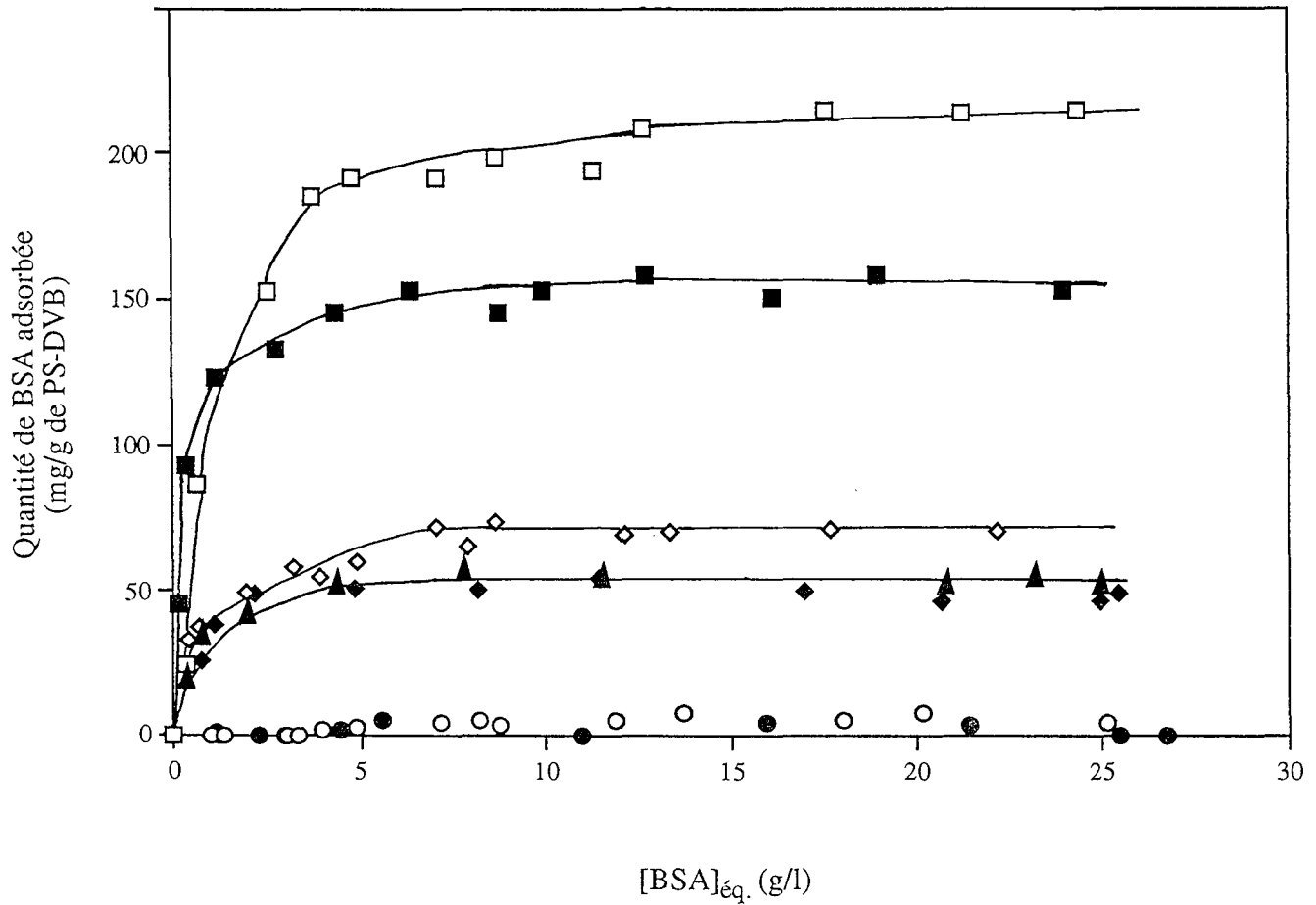


Figure IV.1 : Isothermes d'adsorption de l'albumine de sérum bovin à pH 5 (en blanc) et à pH 7 (en noir) sur divers supports à base de PS-DVB natif (■) ou modifiés par dépôt de divers dextrans-phénoxy :
 (▲) DexPC à 0,05 mmol de phénoxy/g de polymère
 (◆) DexPA à 0,12 mmol de phénoxy/g de polymère
 (●) DexPB à 0,56 mmol de phénoxy/g de polymère

Les dextrans sont adsorbés à saturation (Γ_{pl}) et les couches déposées ont été stabilisées par réticulation chimique à l'épichlorhydrine suivie d'un lavage au sulfate de dodécyle de sodium.

dextrane ($\lambda_{\max} = 269 \text{ nm}$). Ces mêmes surnageants peuvent être dosés par une solution d'anthrone (12) conformément à la méthode décrite en annexe (page 199), pour confirmer l'absence de désorption de polymère.

La quantité de protéine adsorbée est déterminée par différence entre la quantité d'albumine initiale et celle résiduelle, dosée dans le surnageant.

2-2-3 Isothermes d'adsorption de l'albumine

Divers lots de particules de PS-DVB ont été préparés par adsorption à saturation de trois dextrans phénoxy. Par souci de clarté, les polymères ne sont différenciés que par leur teneur en groupes phénoxy. Les quantités de polymère contenues dans chaque lot, avant et après réticulation, sont données dans le tableau IV.1.

Echantillons	Taux de phénoxy (mmol/g)	Γ (mg/m ²) avant réticulation	Γ_f (mg/m ²) après réticulation
PS-DexPC	0,05	2,15	1,90
PS-DexPA	0,12	2,10	1,90
PS-DexPB	0,56	1,78	1,60

Tableau IV.1 : Composition de divers échantillons de PS-DexP

Les isothermes d'adsorption de l'albumine à pH 7 et à pH 5 sur ces trois lots de particules sont représentées sur la figure IV.1 et comparées à celles obtenues sur les particules initiales de PS-DVB. Dans tous les cas, les isothermes d'adsorption de la protéine s'apparentent à celles de type Langmuir monocouche.

2-2-3-1 Influence du taux de substitution en groupes phénoxy des polymères

La quantité maximale de BSA adsorbée sur les particules natives est de 158 mg/g de PS-DVB à pH 7. La détermination de la quantité de BSA résiduellement adsorbée sur les particules après modification, a été préalablement réalisée sur le support PS-DexPA. La réduction de l'adsorption de la protéine de 70% montre d'ores et déjà un caractère hydrophile nouveau des particules de PS-DVB ainsi modifiées.

L'adsorption non-spécifique résiduelle de la protéine a été attribuée dans un premier temps à une concentration trop élevée en groupes phénoxy, conduisant à une interaction de la protéine avec quelques groupements hydrophobes orientés vers la solution et non vers la surface polystyrénique (13). Cette première hypothèse nous a amené à préparer des polymères DexPC et DexPB contenant des taux en groupes phénoxy respectivement plus faibles et plus élevés. Néanmoins, des résultats similaires ont été obtenus avec les supports PS-DexPC pour lesquels les polymères ont des taux de groupes phénoxy plus faibles.

Par ailleurs, seul le support obtenu par dépôt de polymère DexPB, le plus riche en groupes phénoxy, présente un caractère parfaitement hydrophile, puisqu'aucune adsorption résiduelle de la protéine n'est observée, dans la gamme de concentrations étudiée.

De toute évidence, les interactions entre les groupes phénoxy et la BSA ne sont pas en cause dans l'adsorption de la protéine sur les supports PS-DexPC et PS-DexPA. La différence entre ces supports et le support PS-DexPB peut s'expliquer par une différence du nombre de points d'ancrage des polymères sur la surface polystyrénique ou/et par des différences de conformation des polymères adsorbés.

2-2-3-2 Influence du pH

Les quantités de BSA adsorbées sur un même support sont toujours plus grandes à pH 5 qu'à pH 7. Ce pH correspond au point isoélectrique de l'albumine. Comme nous l'avons souligné dans la partie introductive, les répulsions électrostatiques au sein des protéines sont minimisées à leur pI, les interactions de nature hydrophobe entre la protéine et la surface sont alors renforcées, en accord avec les isothermes présentées sur la figure IV.1.

Quoiqu'il en soit, l'évolution des résultats, en fonction de la teneur du dextrane en groupes phénoxy, est comparable à celle obtenue à pH 7.

2-2-4 Influence du taux de recouvrement des particules

L'objectif de cette étude est de minimiser la quantité de polymère déposé sur le polystyrène sachant qu'une épaisseur trop importante de la couche adsorbée peut conduire à une augmentation de la résistance au transfert de masse en phase stationnaire et donc diminuer les performances chromatographiques du matériau.

Nous avons donc déterminé, pour chacun des polymères étudiés, la quantité nécessaire et suffisante de polymère à déposer sur la surface pour obtenir un matériau parfaitement hydrophile.

Divers lots de particules de PS-DVB recouvertes de dextrans-phénoxy ont été préparés. Ils diffèrent par leur taux de recouvrement Γ et par la composition des dextrans adsorbés. Les quantités de BSA adsorbées à pH 5 sont déterminées à partir d'une seule concentration initiale

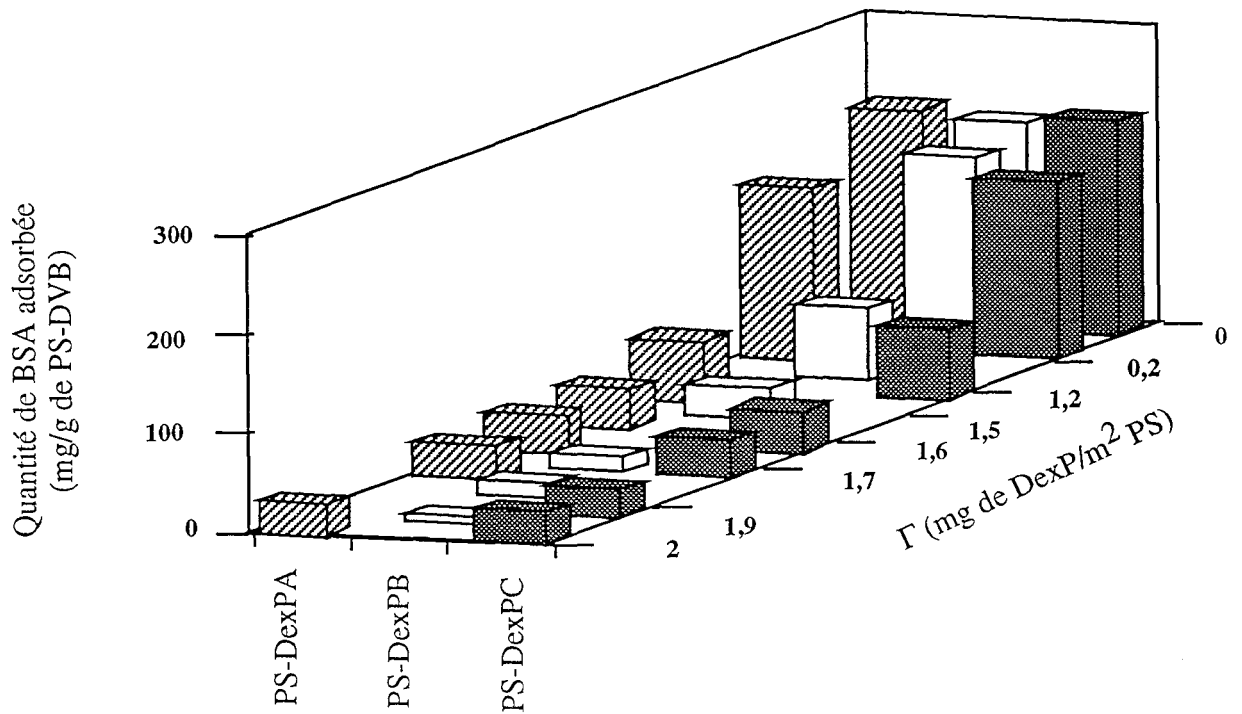


Figure IV.2 : Influence de la composition du polymère adsorbé et du taux de recouvrement des particules de PS-DVB sur la quantité d'albumine du sérum bovin (BSA) adsorbée à pH 5. La concentration initiale de BSA est de 5 g/l en tampon citrate à 0,05M. Les couches de dextrane adsorbé ont été stabilisées par réticulation chimique à l'épichlorhydrine suivie d'un lavage au sulfate de dodécyl de sodium et sont composées de :

- (■) DexPC à 0,05 mmol de phénoxy/g de polymère
- (▨) DexPA à 0,14 mmol de phénoxy/g de polymère
- (□) DexPB à 0,56 mmol de phénoxy/g de polymère

de protéine fixée à 5 g/L puis comparées entre elles comme le montrent les histogrammes de la figure IV.2.

L'augmentation du taux de recouvrement des particules, indépendamment de la nature du polymère adsorbé, conduit à une réduction significative de la quantité de protéine adsorbée. A des Γ équivalents, la BSA s'adsorbe d'autant moins que le polymère est riche en groupes phénoxy, confirmant les résultats précédents. Dans tous les cas, la quantité résiduelle de BSA adsorbée est minimale lorsque les particules sont recouvertes à Γ_{pl} .

2-2-5 Conclusion

L'efficacité du recouvrement, du point de vue de son caractère hydrophile, a été évaluée sur divers lots de particules par comparaison des quantités d'albumine adsorbées de façon non spécifique. Le caractère hydrophile des particules croît avec les augmentations conjointes du taux de recouvrement des particules et du taux de groupements phénoxy des polymères adsorbés.

Le support PS-DexPB préparé par adsorption à Γ_{pl} du dextrane le plus riche en groupes phénoxy ($\approx 0,50$ mmol/g de polymère), est parfaitement hydrophile car l'adsorption résiduelle de la BSA est inférieure à 5%, même au pI de la protéine. L'adsorption des dérivés amphiphiles du dextrane conduit donc à l'obtention de matériaux où les interactions non spécifiques sont minimisées voir totalement supprimées.

Cependant, il convient de s'assurer que la réduction de l'adsorption de la protéine est due exclusivement au caractère hydrophile des particules et non à une réduction de la surface spécifique. Les caractérisations de porosité et de surface spécifique des divers matériaux préparés feront l'objet d'une étude détaillée qui sera reportée dans le chapitre V. Nous pouvons, dès à présent souligner le fait que la réduction de l'adsorption de la BSA n'est en aucun cas, due à une réduction de la surface accessible à la protéine.

3 - CONFORMATION DES CHAÎNES DE DEXTRANE À LA SURFACE DU POLYSTYRÈNE

Cette étude a fait l'objet d'une collaboration avec M. Chikhi sous la direction de M. Hommel au Laboratoire de Physique Quantique de l'ESPCI-Paris dirigé par le Professeur A. P. Legrand.

3-1 RAPPELS THÉORIQUES SUR LA RÉSONANCE PARAMAGNÉTIQUE ÉLECTRONIQUE

3-1-1 Introduction

La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE), comme d'autres formes de spectroscopie, est basée sur l'absorption de l'énergie d'une radiation par les atomes ou molécules qui changent d'état d'énergie. A toutes radiations sont associés un champ magnétique et un champ électrique perpendiculaires entre eux. Les spectres d'absorption résultent des transitions des électrons entre l'état fondamental et les états excités. L'énergie permettant ces transitions est absorbée sous forme de quantum de radiation électromagnétique d'énergie $h\nu$; ainsi une transition a lieu si d'une part, l'énergie contenue dans le quantum de radiation est égale à la séparation entre les deux niveaux d'énergie concernés par la transition, soit $h\nu = \Delta E$ qui répond à la condition de résonance, et si d'autre part, une des composantes du champ de radiation est capable de stimuler un dipôle dans le système étudié, auquel cas la transition est alors permise.

Les spectres détectés en RPE proviennent d'un centre paramagnétique soit endogène (cas des métaux Cu^{2+} , Mn^{2+} , radicaux libres), soit exogène. Dans ce deuxième cas c'est-à-dire pour des matériaux naturellement diamagnétiques, il est nécessaire de fixer de façon covalente un marqueur de spin possédant au moins un électron célibataire.

Sans le cas simple d'un radical libre dont le spin électronique interagit, par l'interaction hyperfine avec un seul noyau dont le spin nucléaire est noté I , l'expression de l'hamiltonien de spin s'écrit :

$$\mathcal{H} = \beta S g H + A I S$$

avec S : spin de l'électron non apparié ($1/2$)

I : nombre quantique de spin nucléaire d'un noyau

g et A sont respectivement des tenseurs gyromagnétiques et hyperfins

β : magnéton de Bohr

H : champ magnétique

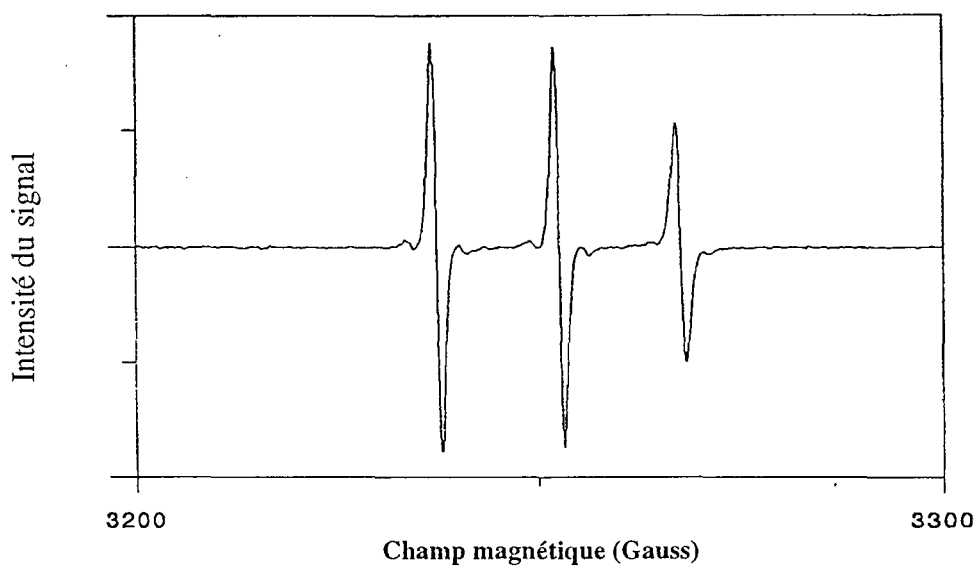


Figure IV.3 : Spectre RPE d'un radical nitroxyde avec un mouvement rapide

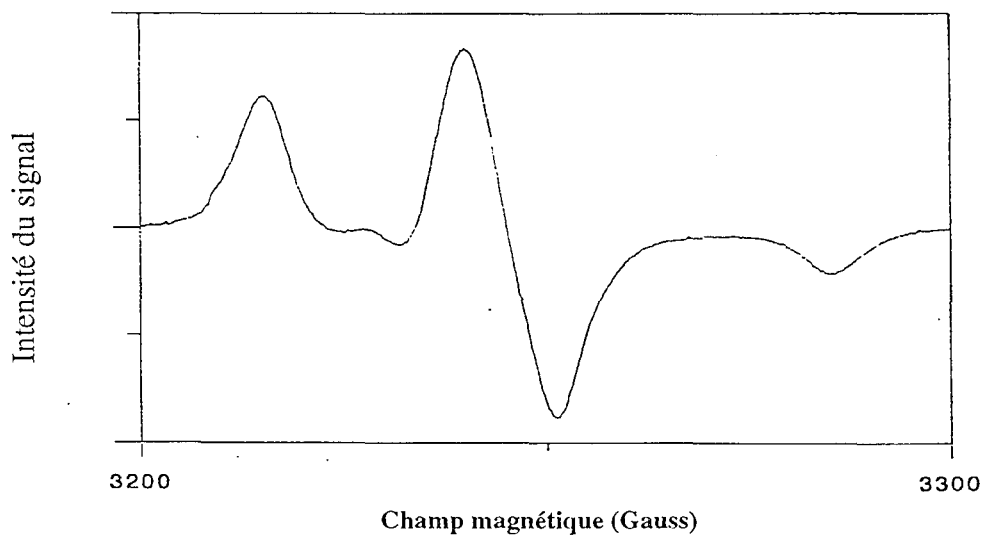


Figure IV.4 : Spectre RPE d'un radical nitroxyde avec un mouvement lent

3-1-2 Analyse et exploitation des spectres

Pour étudier les polymères aux interfaces par cette technique, les polymères sont marqués par une molécule possédant un électron libre (14). Il s'agit en général de radicaux nitroxydes stables et inertes (15) dont l'atome d'oxygène présente un électron non apparié. Les spectres de RPE de ces marqueurs se composent en $2I + 1$ soit trois raies qui résultent du couplage hyperfin entre le spin électronique et le noyau d'azote pour lequel $I = 1$. Les marqueurs sont très sensibles à la mobilité des segments sur lesquels ils sont fixés.

Même si les évolutions sont continues, selon le domaine de température exploré et la viscosité du milieu dans lequel sont localisés les centres paramagnétiques, les spectres de RPE peuvent être classés en trois grandes formes : les spectres rapides, lents et composites. Pour chaque forme, il existe une approche théorique adaptée.

En principe, un mouvement du marqueur fixé est dit rapide si le temps de corrélation de réorientation τ_c est inférieur à $2 \cdot 10^{-9}$ s. Il correspond au temps pendant lequel le marqueur persiste dans une orientation donnée si la réorientation se fait par sauts ou au temps nécessaire au marqueur de se retourner si son mouvement est continu. Des spectres relatifs aux mouvements rapides sont observés lorsque le marqueur est placé dans un environnement de faible viscosité (viscosité locale) et à hautes températures. Le traitement de ces spectres repose sur la théorie de Kivelson (16). L'allure générale des spectres d'un radical nitroxyde en solution avec un mouvement rapide est représentée sur la figure IV.3 et le signal est sous forme de trois lorentziennes dérivées parfaitement résolues.

Les mouvements lents (τ_c entre 10^{-6} et 10^{-9} s) sont observés dans les milieux de très forte viscosité locale et aux basses températures. Dans ce cas, les spectres RPE ne peuvent être interprétés comme des raies lorentziennes, la contribution anisotrope de l'hamiltonien est trop importante et de nouveaux pics identifiables apparaissent comme le montre la figure IV.4. J.H. Freed a développé une théorie (17) plus complète, laquelle après simulation permet de déduire les paramètres de l'hamiltonien.

Dans une plage intermédiaire, un spectre expérimental pour des polymères marqués, adsorbés ou fixés sur une surface, apparaît comme la superposition des contributions des trois raies fines attribuables au mouvement rapide correspondant à des segments mobiles (P_{sol}) et une autre partie qui traduit le mouvement gêné de quelques marqueurs correspondant à des segments proches de la surface donc moins mobiles (P_{ads}) comme le montre la figure IV.5. L'allure d'un spectre composite est représenté sur la figure IV.6.

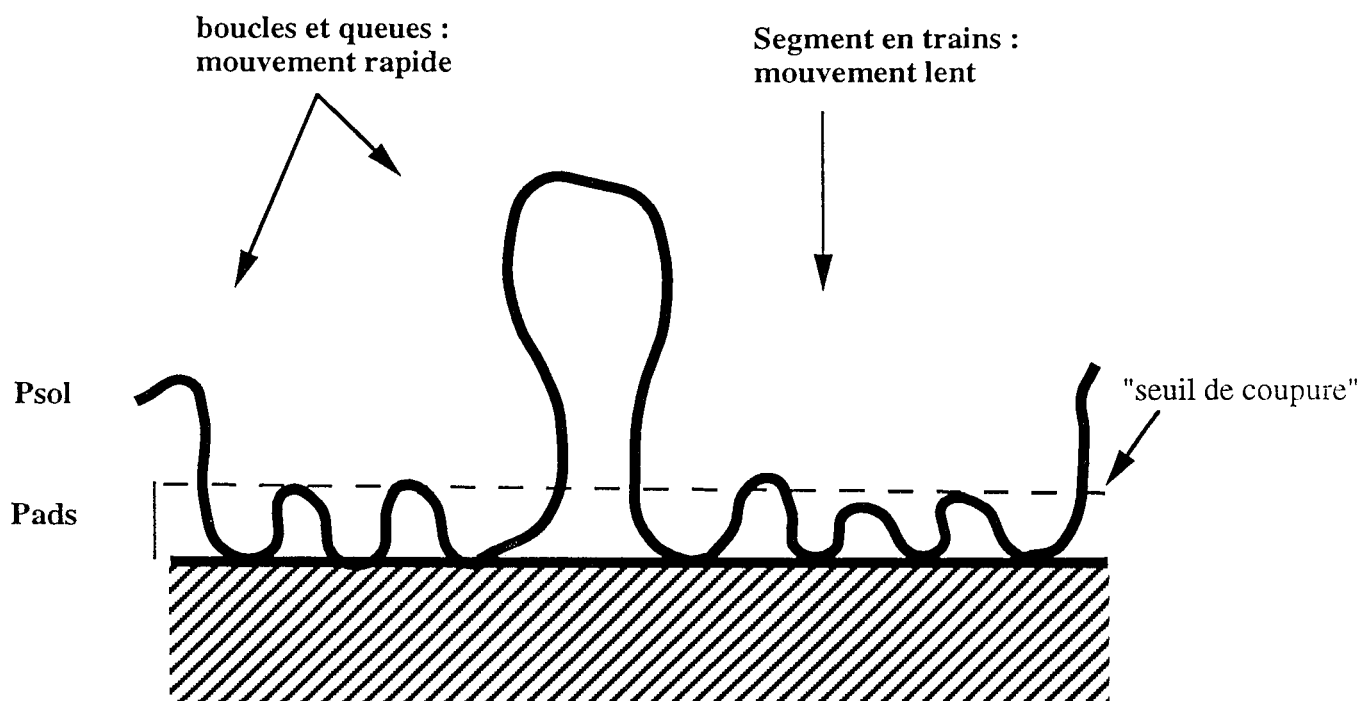


Figure IV.5 : Fractions rapide et lente. Parties du profil de concentration d'une chaîne macromoléculaire adsorbée sur une surface

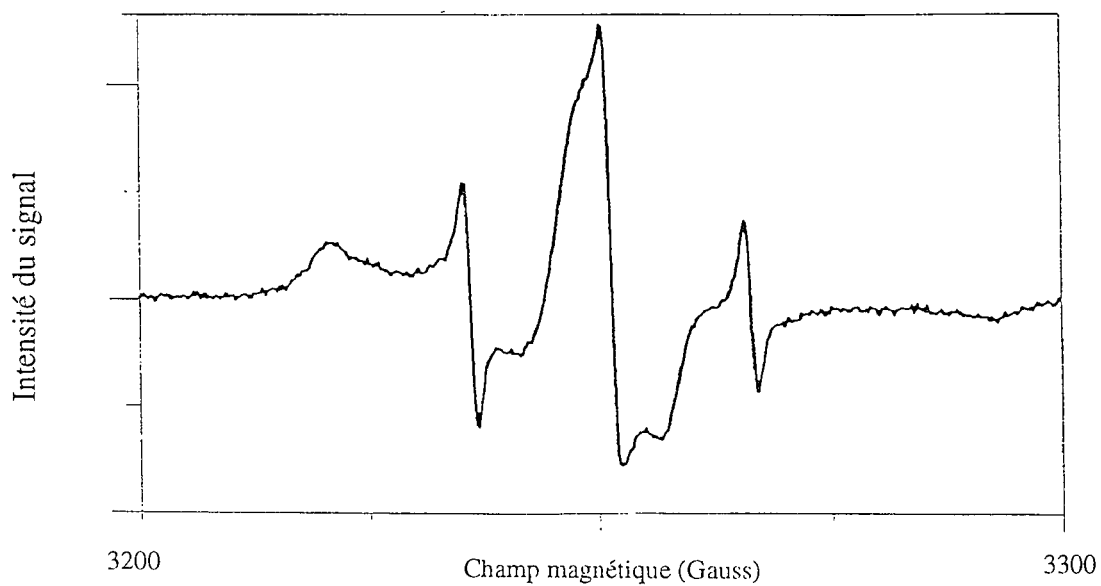


Figure IV.6 : Spectre RPE composite d'un radical nitroxyde

Finalement, par une double intégration des spectres expérimental et calculé (les spectres RPE donnent en fait la dérivée des raies de résonance), la surface de chaque spectre est évaluée. On simule sur ordinateur surtout le spectre de mouvement rapide. La surface du spectre simulé est proportionnelle au nombre de centres paramagnétiques ayant un mouvement de réorientation rapide. La différence entre les surfaces calculée et expérimentale donne accès à la fraction de marqueurs ayant un mouvement lent. L'apparition d'un mouvement lent du marqueur, est due principalement à l'adsorption sur la surface, du segment sur lequel il est fixé. Les τ_c de la population rapide sont évalués à partir de la largeur des raies fines.

En résumé, les informations extraites de l'exploitation des spectres sont de deux natures :

- Les temps de corrélation de réorientation de la fraction rapide sont des données de **nature dynamique**. De plus, la mobilité des marqueurs est reliée à la température par la loi d'Arrhénius:

$$\ln \tau_c = \frac{\Delta E_{\text{activation}}}{kT} + \Delta S_{\text{activation}} \quad [2]$$

Pour l'étude des polymères aux interfaces, de nombreux paramètres rentrent en ligne de compte. En effet, la mobilité des marqueurs est sensible aux caractéristiques intrinsèques du polymère sur lequel les marqueurs sont fixés telles que sa rigidité propre et sa nature chimique (18) et à sa longueur (19). Les temps de corrélation des marqueurs sont également affectés par la présence de chaînes réticulées (20), de chaînons ou ligands latéraux (20, 21, 22). Ils dépendent aussi des modes (adsorption ou greffage) (22) et taux de recouvrement de la surface concernée (23, 24).

- Le calcul des surfaces des spectres renseigne sur les fractions des populations lentes (segments en trains) et rapides (boucles et queues) respectivement notées P_{ads} et P_{sol} , informations d'**ordre statistique**. La proportion des deux fractions est reliée à la température par une loi de Van't Hoff :

$$\ln \frac{P_{\text{sol}}}{P_{\text{ads}}} = - \frac{\Delta E_{\text{eff}}}{kT} + \frac{\Delta S_{\text{eff}}}{k} \quad [3]$$

ΔE_{eff} est l'énergie d'adsorption effective ; elle inclut plusieurs contributions et résulte de l'adsorption d'un segment de polymère et du déplacement des molécules d'eau.

Le tracé de $\ln \frac{P_{\text{sol}}}{P_{\text{ads}}} = f(1/T)$ permet l'évaluation de l'énergie d'adsorption d'une unité monomère ou d'un court segment de chaîne.

3-2 CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

3-2-1 Dispositif expérimental

Les spectres dont nous discuterons les analyses sont réalisés au moyen d'un spectromètre Varian E-4. Les échantillons sont placés dans un porte-échantillon en verre pyrex de 4 mm de diamètre, la détection se fait sur une hauteur de 1 cm. Les échantillons sont portés à la température désirée par un régulateur de température balayant ainsi la gamme de 5 à 95°C par une montée progressive de 5°C.

Une cellule spéciale à section rectangulaire est utilisée pour les études en solvant aqueux qui induit de fortes pertes diélectriques.

Les spectres RPE correspondent à la dérivée première du signal d'absorption grâce à une détection synchrone autour de 100 kHz. Enfin, les échantillons en suspension en milieu aqueux sont soumis à un balayage en champ entre 3200 et 3300 Gauss.

3-2-2 Marquage des polymères par le 4-amino-TEMPO

Le marqueur de spin choisi pour cette étude est le 4-amino-TEMPO représenté sur la figure IV.7. Ce radical est stable et inerte grâce à l'écrantage par les 4 groupes méthyles. De plus, la présence de la fonction amine primaire facilite sa fixation sur un grand nombre de fonctions.

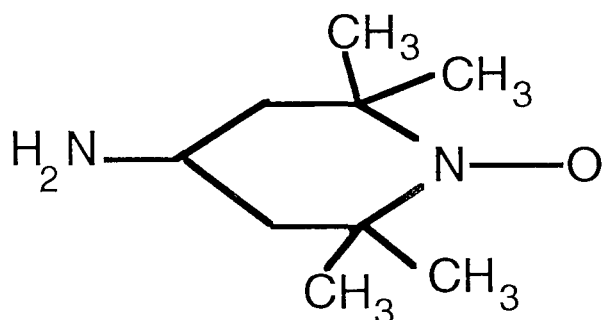


Figure IV.7 : Formule du 4-amino-TEMPO noté AT

La fixation du marqueur sur les dextranses est réalisée avant leur adsorption sur les particules de PS-DVB afin de favoriser une répartition statistique du radical nitroxyde le long des chaînes macromoléculaires. La richesse des dextranses en groupes hydroxyles les rend facilement modifiables. Néanmoins, une activation de ces fonctions est requise pour réagir avec la fonction amine primaire du marqueur. L'activation peut s'effectuer par divers agents de couplage classiques tels que le carbonyl diimidazole (CDI) ou le chlorure de trétyl (TrCl).

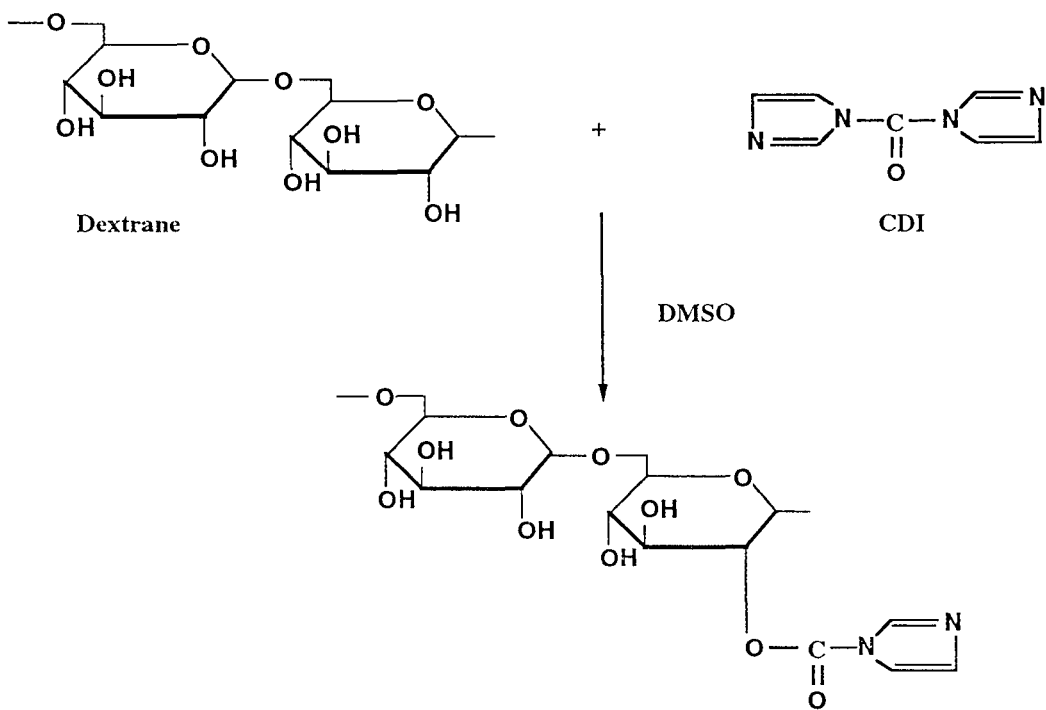


Figure IV.8 : Activation du dextrane par l'intermédiaire du carbonyldiimidazole (CDI)

3-2-2-1 Activation au carbonyl diimidazole

Cet agent de couplage classique réagit sur des fonctions hydroxyles tel que le montre le schéma de la figure IV.8. En raison de sa grande réactivité, le CDI est hydrolysé très facilement en présence d'eau. Aussi, le solvant de couplage doit solubiliser le dextrane et le réactif et être dépourvu de traces d'eau. Le solvant qui répond le mieux à ces critères est le diméthyl-sulfoxyde anhydre (Prolabo) noté DMSO.

** Mode opératoire*

1g de dextrane T40 préalablement séché (2 heures sous vide à 60°C), est dissous dans 15 mL de DMSO anhydre. Après dissolution du polymère, 5 mmol de CDI sont ajoutées au mélange lequel est agité pendant 30 minutes à température ambiante.

** Résultats*

Les conditions d'activation correspondent à celles préconisées par Bethell et coll. pour activer des gels polysaccharidiques (25). Néanmoins après activation, le dextrane se trouve à l'état de gel, en raison de réactions secondaires de réticulation. La fixation de l'amino-TEMPO par l'intermédiaire du carbonyl diimidazole n'a donc pas été envisagée car la réaction modifie les caractéristiques des polymères.

Dans un second temps, nous avons choisi le chlorure de trétylène comme agent d'activation. Cet agent de couplage est également très réactif mais ne provoque pas de réactions secondaires.

3-2-2-2 Activation au chlorure de trétylène

L'activation au chlorure de trétylène est utilisée pour immobiliser des ligands contenant des groupes thiol ou amino sur des supports solides et doit être réalisée en milieu organique anhydre selon la méthode décrite par Nilsson et Mosbach (26). Le solvant organique choisi pour cette étape d'activation est le diméthyl-sulfoxyde pour les raisons précédemment évoquées. Le schéma réactionnel du greffage du marqueur dans ces conditions d'activation se déroule en trois étapes comme le montre la figure IV.9 et le protocole expérimental est décrit ci-dessous :

** Protocole expérimental*

Activation : 1g de dextrane séché (2 heures sous vide à 60°C) est mis en solution dans 20 mL de diméthyl-sulfoxyde anhydre en présence de 1 mmol de TrCl et de 1,5 mmol de pyridine par gramme de dextrane. La réaction se déroule à température ambiante pendant 2 heures. La purification des dextrans activés s'effectue par précipitation dans l'éthanol suivie d'une filtration sur fritté et d'un séchage sous vide à 40°C pendant une nuit.

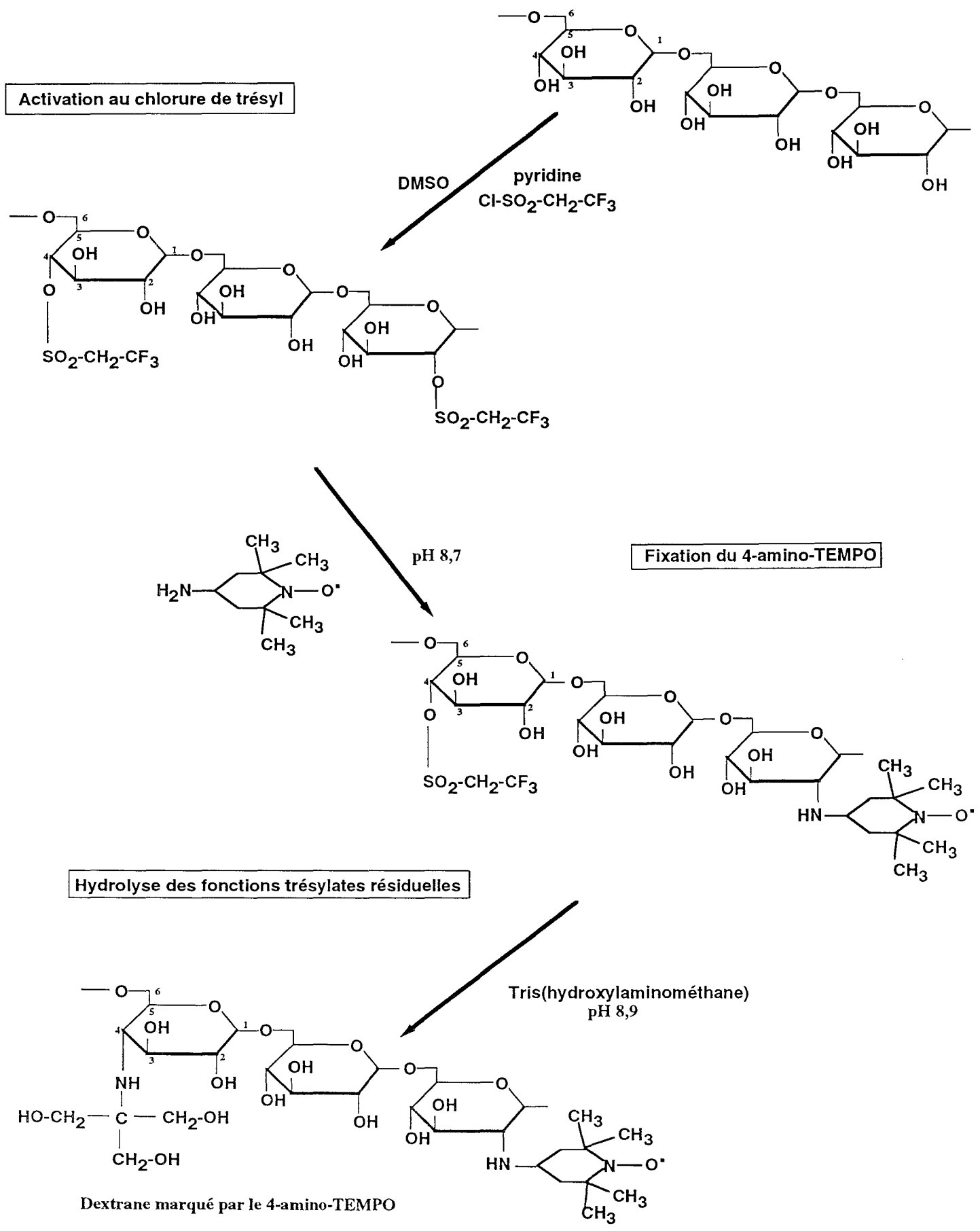


Figure IV.9 : Fixation du 4-amino-TEMPO sur le dextrane par l'intermédiaire du chlorure de trétyl

fixation du radical nitroxyde : Une solution-mère de 4-amino-TEMPO à 3,40 g/L est préparée dans un tampon carbonate 0,1M à pH 8,7. 1 g de dextrane activé est mis en solution dans 5 mL de solution-mère d' amino-TEMPO (10^{-4} mol/g de dextrane) à température ambiante pendant 48 heures. La purification des polymères marqués s'effectue comme précédemment.

Désactivation : Pour éliminer les groupes trésylates résiduels, le polymère est mis en solution dans un tampon tris-HCl à pH 8,9 pendant 4 heures à température ambiante. Finalement, le polymère est précipité dans l'éthanol, filtré, séché, redissous dans 20 mL d'eau distillée puis précipité à nouveau dans l'éthanol et enfin séché sous vide à 40°C.

3-2-3 Adsorption des polymères marqués sur le polystyrène

Après marquage des polymères, ceux-ci sont adsorbés à la surface des particules. 200 mg de billes de PS-DVB sont mis en suspension dans 20 mL de solution aqueuse de polymère marqué (à différentes concentrations) pendant une nuit à température ambiante sous agitation tournante. La concentration initiale en polymère est choisie à partir de l'isotherme d'adsorption (chapitre III) selon le taux de recouvrement désiré des particules. Après centrifugation, le surnageant est prélevé et dosé par une solution d'anthrone (12) conformément au procédé décrit en annexe. Les billes recouvertes de dextrane marqué sont lavées trois fois à l'eau distillée avant d'être séchées.

Nous avons vérifié que la présence d' amino-TEMPO ne modifiait pas les propriétés d'adsorption des DexP sur le polystyrène. Les taux de recouvrement Γ obtenus pour une concentration donnée en polymère sont similaires, que le dextrane soit ou non marqué.

Certains échantillons sont ensuite soumis à la réticulation en présence d'épichlorhydrine puis lavés au sulfate de dodécyle de sodium dans les conditions de réticulation optimales décrites dans le chapitre III.3.

3-3 ANALYSE DES SPECTRES EXPÉRIMENTAUX

La conformation des dextrans-phénoxy adsorbés à la surface du polystyrène est étudiée en termes de mobilité des chaînes, reliée au temps de corrélation τ_c des marqueurs, et de proportion de populations adsorbées à la surface ou déployées en solution notées respectivement P_{ads} et P_{sol} .

Les spectres RPE ont été réalisés sur des particules en suspension en solutions aqueuses et sont de formes rapide, lente ou composite selon la nature du recouvrement, la température et le milieu.

La précision des paramètres τ_c et $\frac{P_{sol}}{P_{ads}}$ à une seule température est faible. C'est pourquoi, les courbes $\ln \tau_c$ et $\ln \frac{P_{sol}}{P_{ads}}$ sont tracées en fonction de l'inverse de la température (en K) dans une

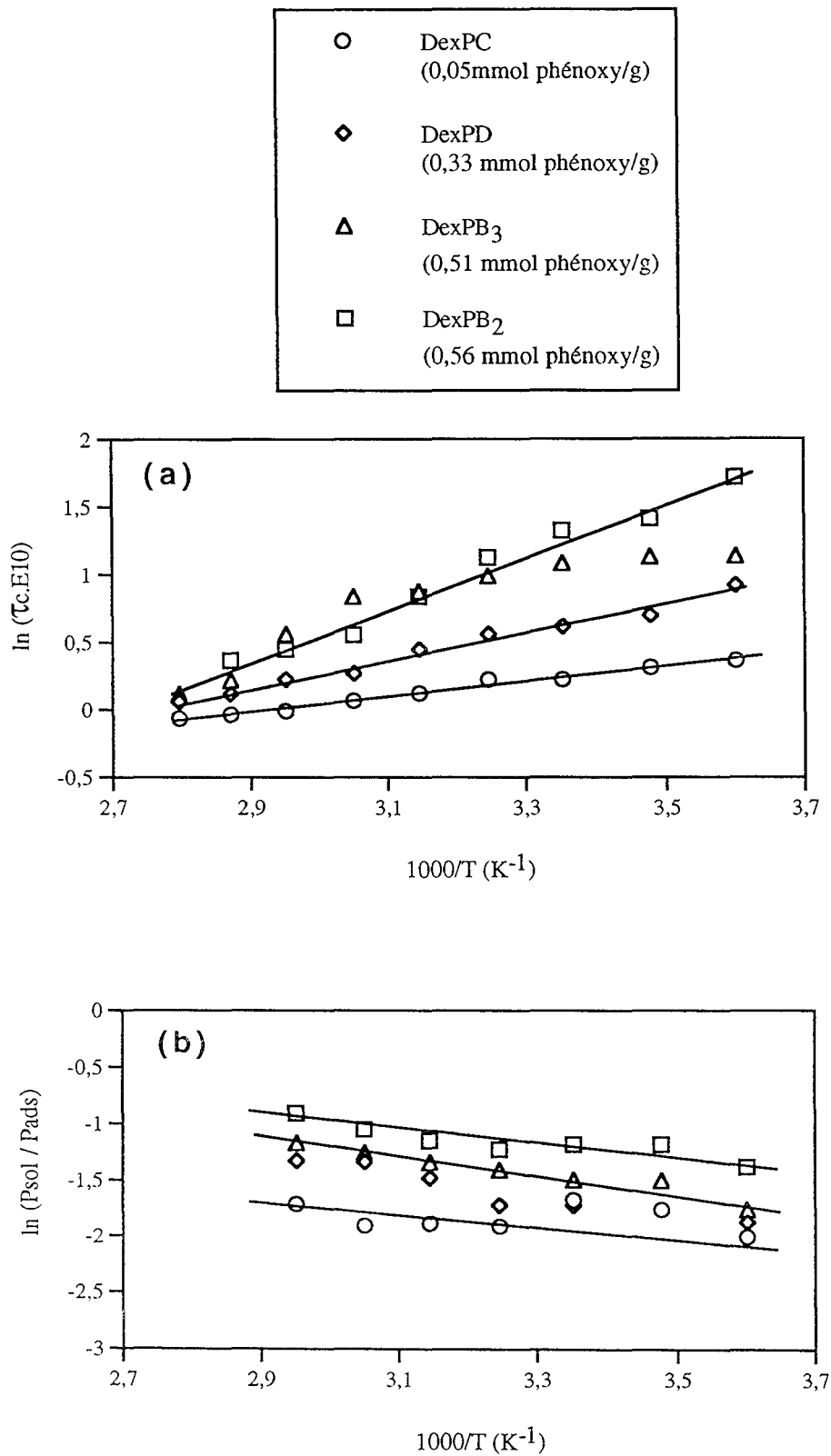


Figure IV.10: Influence du taux de groupements phénoxy des dextrans sur l'évolution des temps de corrélation (a) et du $\ln(P_{sol} / P_{ads})$ (b) des marqueurs avec l'inverse de la température absolue. Les particules de PS-DVB sont recouvertes de divers DexP (adsorbés à Γ_{pl}) en suspension dans l'eau.

grande gamme de température. Les courbes moyennes sont comparées entre elles ; la précision est de l'ordre de 10 %.

Dans ce paragraphe, nous montrerons l'influence du taux de groupements phénoxy des polymères et celle du taux de recouvrement, sur la conformation des chaînes à l'interface liquide/solide. Nous verrons également l'effet de la réticulation et de la présence d'albumine ou de solvant organique sur le comportement des polymères adsorbés.

3-3-1 Influence du taux de substitution des dextrans en groupes phénoxy

Dans le cas présent, les chaînes macromoléculaires de dextrans sont adsorbées sur le polystyrène par l'intermédiaire d'interactions établies avec des chaînons hydrophobes fixés sur le polymère. A notre connaissance, l'influence du taux de chaînons hydrophobes latéraux fixés sur un polymère n'a pas été étudiée en terme de comportement à un interface liquide/solide. Les paramètres les plus étudiés sont la nature chimique des chaînons, leur longueur et/ou leur position dans la chaîne macromoléculaire.

Pour caractériser au mieux l'influence de ce paramètre sur le comportement des polymères à l'interface, l'étude a été réalisée sur quatre dextrans-phénoxy marqués et adsorbés à la surface des particules de PS-DVB à une concentration correspondant à l'obtention de Γ_{pl} . Un dextrane-phénoxy noté DexPD a été spécialement introduit pour cette étude, son taux de groupements phénoxy est intermédiaire entre celui du DexPB et DexPC comme le montre le tableau IV.2.

Polymère marqué	Taux de phénoxy mmol/g	Taux de recouvrement Γ_{pl} en mg/m ²
DexPC	0,05	2,5
DexPD	0,33	1,9
DexPB ₃	0,51	1,9
DexPB ₂	0,56	1,8

Tableau IV.2: Caractéristiques de divers supports de PS-DVB recouverts à saturation de dextrans-phénoxy marqués à taux de phénoxy variable.

Les figures IV.10 a et b relient respectivement les temps de corrélation des marqueurs et $\ln \frac{P_{sol}}{P_{ads}}$ en fonction de l'inverse de la température absolue pour les quatre échantillons décrits dans le tableau IV.2.

D'une manière générale, les τ_c augmentent de façon monotone pour tous les supports quand la température diminue. Les temps de corrélation étant sensibles à l'environnement local des marqueurs, une baisse de température provoque une diminution du mouvement brownien et ralentit considérablement leurs mouvements. Les rapports $\frac{P_{sol}}{P_{ads}}$ diminuent lentement lorsque la température diminue : l'agitation thermique est de moins en moins efficace pour décoller les chaînes de dextrans de la surface.

De ces courbes sont déduites les informations suivantes :

- Globalement, les polymères semblent relativement aplatis sur la surface et ceci, quel que soit leur contenu en groupes phénoxy. Le calcul de la population des marqueurs proches de la surface (P_{ads}) peut être effectué à chaque température, à titre indicatif. Ainsi, à 25°C par exemple, P_{ads} représente 90% de la population pour les polymères les plus faiblement substitués et 80% pour les plus fortement substitués. Néanmoins, ces valeurs ne reflètent pas la quantité de monomère directement lié à la surface. En effet, la RPE est une méthode très sensible et l'immobilisation d'un monomère sur une surface peut réduire la mobilité d'un marqueur selon la flexibilité du polymère. Il a été montré que l'immobilisation d'un monomère pouvait réduire la mobilité du marqueur jusqu'à 5 unités monomères plus loin dans le cas d'un polymère peu flexible (24).

- La fraction des segments dont le mouvement est rapide, est plus importante pour les échantillons à fort taux de phénoxy (P_{sol}/P_{ads} augmente).

- Les temps de corrélation augmentent quand augmente le taux de substitution du polymère adsorbé en groupes phénoxy, ce qui revient à dire que la mobilité des segments en solution diminue. Ceci est d'autant plus marqué que la température baisse.

Il est possible que la présence de groupements phénoxy rende la chaîne macromoléculaire plus compacte et plus rigide, par la mise en place d'interactions phénoxy-phénoxy, ainsi que nous l'avons observé lors de la caractérisation des polymères en solution (chapitre II.3). Par conséquent, plus les chaînes sont riches en phénoxy, moins elles peuvent s'étendre à la surface. Un plus grand nombre de segments vont alors rester déployés en solution, ce qui expliquerait l'augmentation du rapport de la population de marqueurs mobiles à celle des marqueurs près de la surface. Cependant, les boucles en solution seraient plus petites, plus denses et plus concentrées, entraînant une augmentation de la viscosité locale et donc une augmentation des τ_c . Le mouvement des chaînes serait donc ralenti. Une représentation schématique du phénomène est donnée ci-dessous :

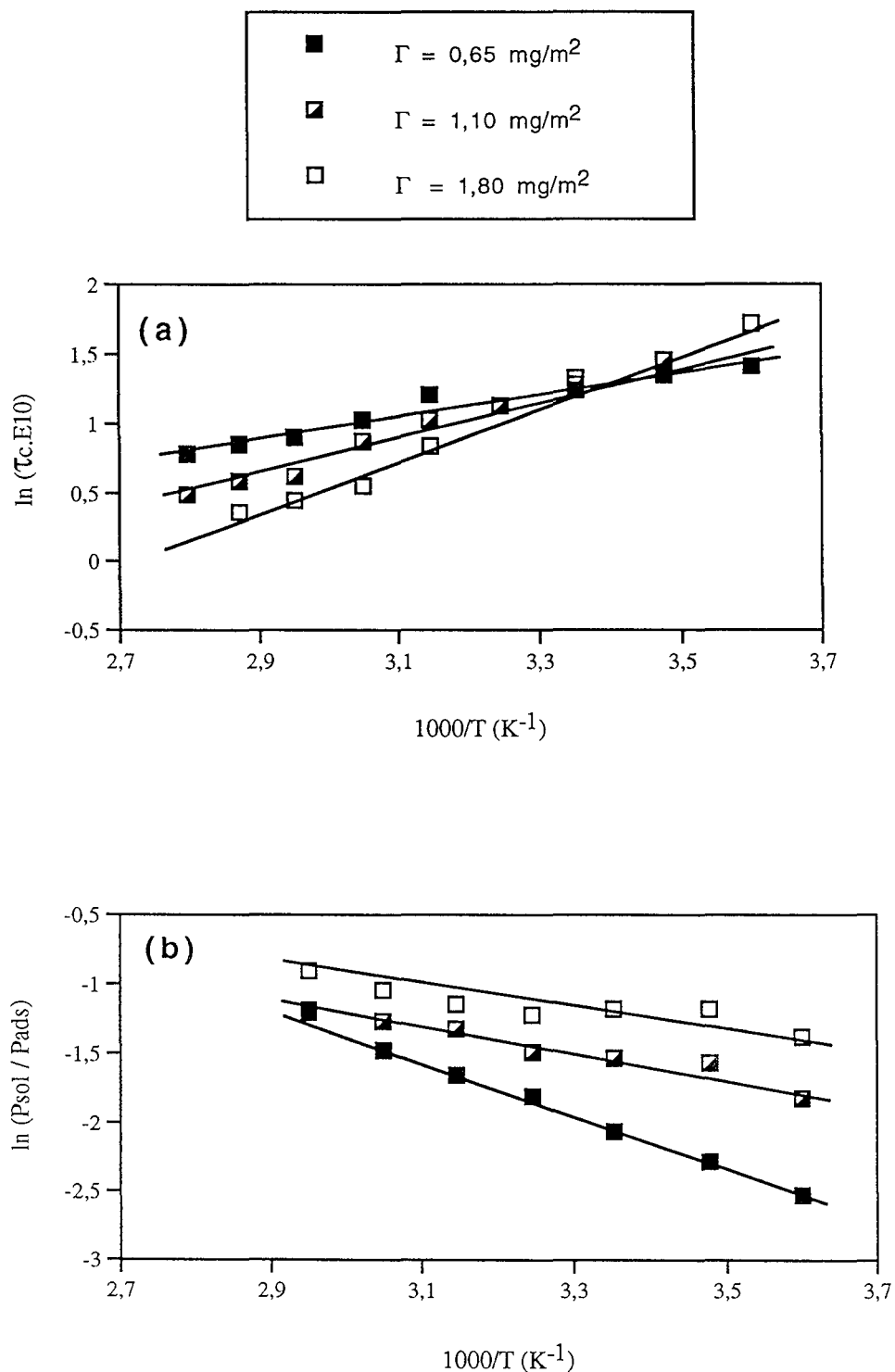
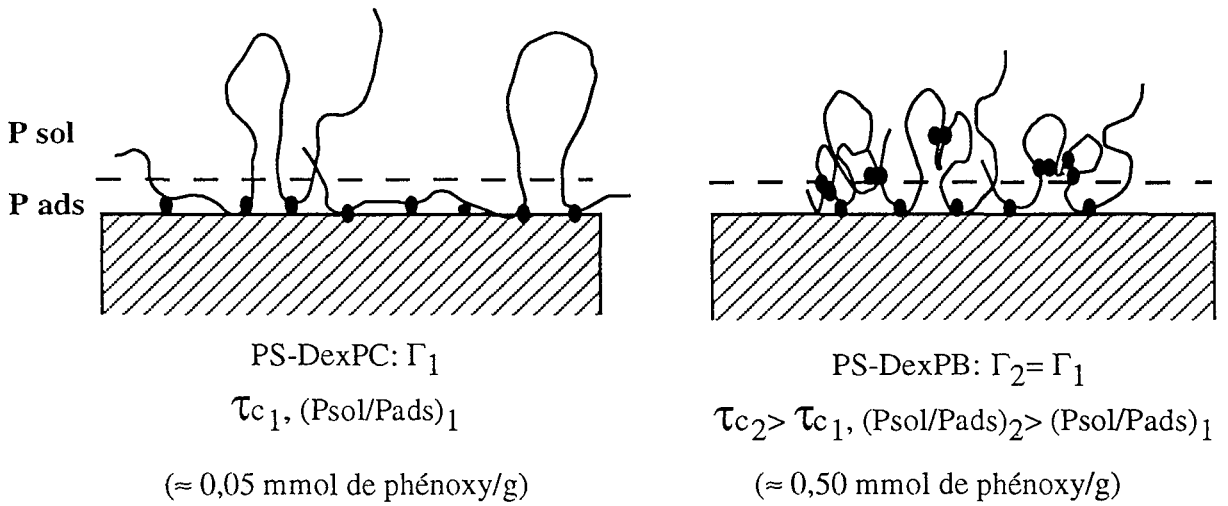


Figure IV.11 : Influence du taux de recouvrement des particules sur l'évolution des temps de corrélation (a) et du $\ln(P_{\text{sol}} / P_{\text{ads}})$ (b) des marqueurs avec l'inverse de la température absolue. Les particules sont recouvertes de DexPB₂ (0,56 mmol de phénoxy /g) à divers taux de recouvrement et sont en suspension dans l'eau.



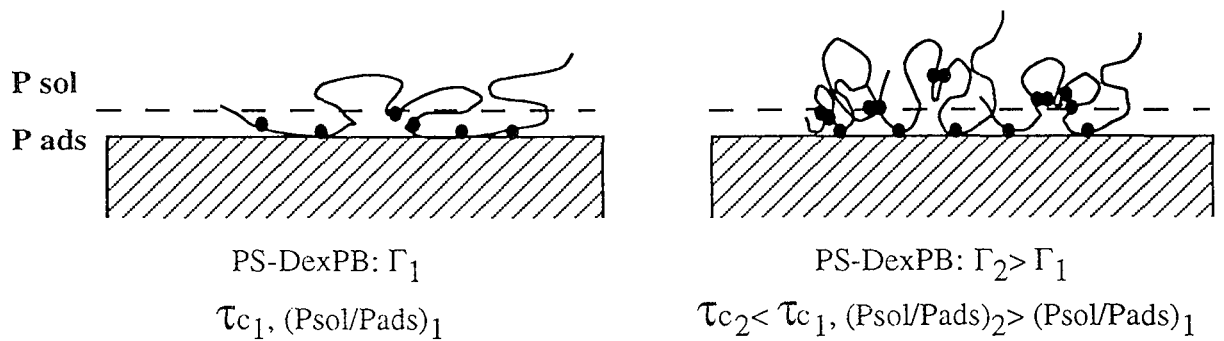
3-3-2 Influence du taux de recouvrement des particules

L'influence du taux de recouvrement des particules a été étudiée dans l'eau à partir de PS-DVB recouvert par du dextrane-phénoxy DexPB₂ (0,56 mmol de phénoxy/g) à trois Γ différents : 0,65 - 1,10 et 1,80 mg/m².

Comme nous pouvons le remarquer sur la figure IV.11 a et b, quand le taux de recouvrement des particules de PS-DVB augmente, les temps caractéristiques des populations rapides diminuent légèrement et le polymère se déploie en solution, ce qui conduit à une augmentation du nombre de segments mobiles.

On peut schématiser ce processus d'adsorption de la façon suivante :

A faible taux de recouvrement, le polymère se déforme et adopte une conformation plus aplatie à la surface du polystyrène. Lorsque la quantité de polymère augmente, les chaînes interagissent entre elles, se repoussent et se déploient en solution avec un mouvement de plus en plus rapide.



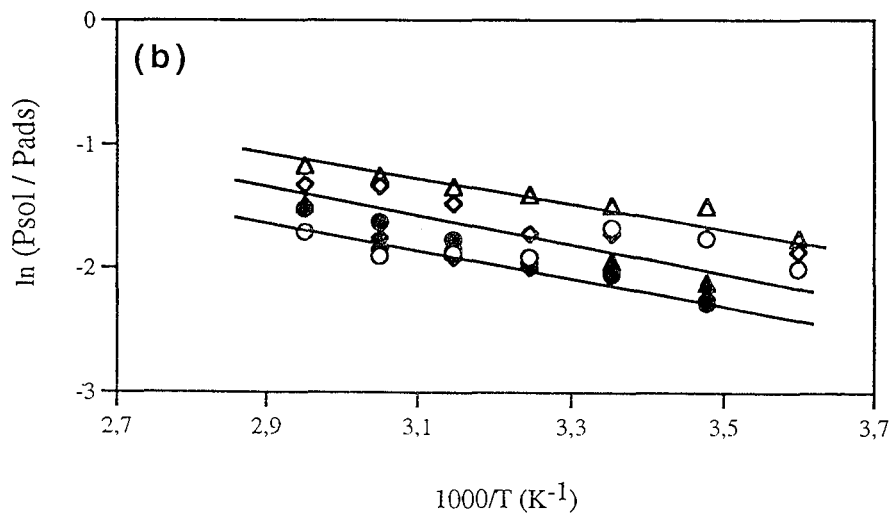
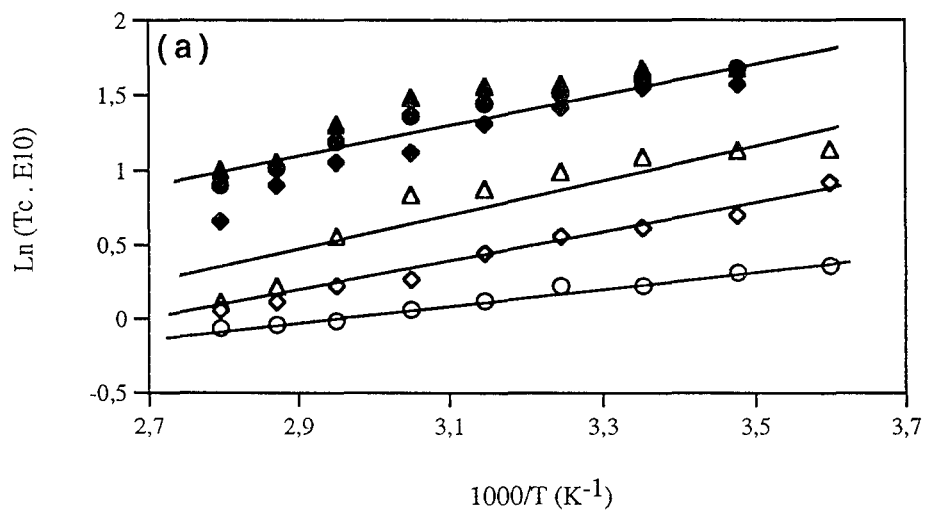
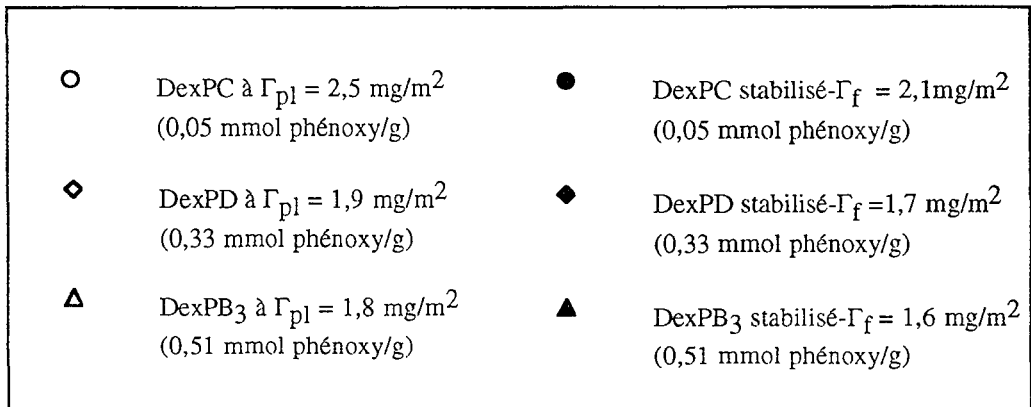


Figure IV.12 : Influence de la réticulation sur l'évolution des temps de corrélation (a) et du $\text{Ln}(\text{Psol}/\text{Pads})$ (b) des marqueurs avec l'inverse de la température absolue pour des supports recouverts par divers DexP (à Γ_{pl}) en suspension dans l'eau.

3-3-3 Effet de réticulation

Nous avons montré la nécessité de la procédure de stabilisation de la couche de dextrane adsorbée sur les particules de PS-DVB qui se déroule, dans notre cas en deux étapes (cf. chapitre III.3) :

- une réticulation chimique est réalisée en présence d'épichlorhydrine à 0,6 M dans NaOH 1M.
- un lavage des particules dans une solution de sulfate de dodécyle de sodium à 2 %.

Nous avons étudié l'effet de la réticulation sur la mobilité des chaînes de dextrans différemment substituées en groupes phénoxy et adsorbées sur le polystyrène à Γ_{PI} . Les résultats obtenus sont présentés sur les figures IV.12 a et b. Après réticulation, les temps de corrélation des segments mobiles sont considérablement augmentés et la population de segments en solution diminue.

Si l'on compare un même support, avant et après réticulation, l'interprétation des résultats paraît simple. La réticulation a pour effet une rigidification de la molécule, ce qui conduit à un ralentissement sensible des mouvements locaux segmentaires. Cette diminution des τ_c contribue à la baisse du nombre de segments mobiles.

Par ailleurs, après réticulation, les particules sont lavées par un surfactant. Durant cette étape, les chaînes de dextrans les plus faiblement liées au polystyrène et donc celles qui étaient vraisemblablement les plus mobiles et les plus déployées en solution sont éliminées. Ceci contribue de façon évidente à l'augmentation des τ_c et à la diminution de $Psol/Pads$.

Avant réticulation, les différents polymères présentent à la surface du polystyrène des conformations qui dépendent de leur teneur en groupes phénoxy. Après réticulation, tous les supports semblent équivalents (mêmes valeurs de τ_c et de $Psol/Pads$).

Ce phénomène est beaucoup plus difficile à expliquer car le comportement des supports en présence d'albumine est significativement différent tant en terme d'adsorption de la protéine (paragraphe IV.2) qu'en terme de conformation des chaînes (paragraphe IV.3.3.5).

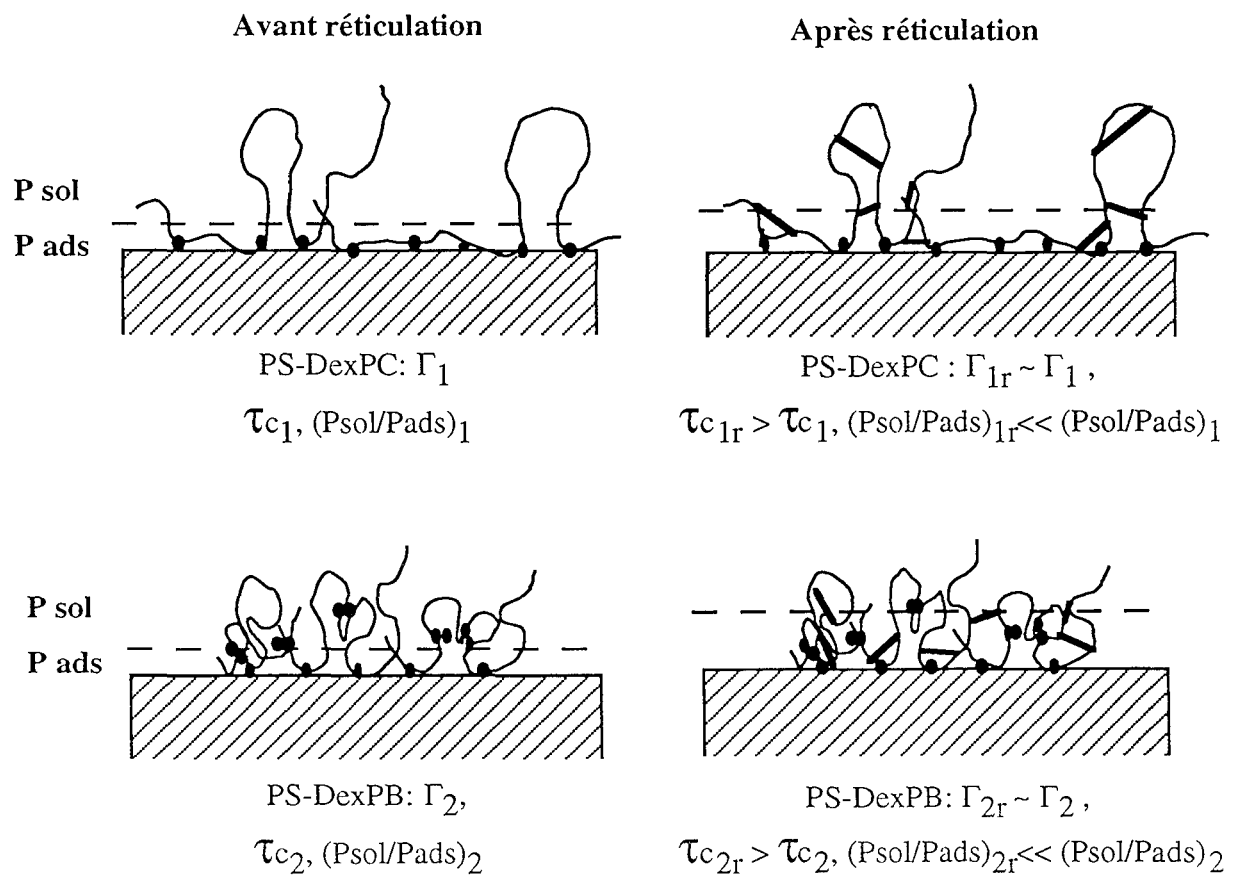
En fait, les grandeurs mesurées τ_c et $Psol/Pads$ sont des grandeurs moyennes qui résultent de la contribution de différents paramètres, dont les effets peuvent selon les cas, s'additionner ou se soustraire. Il se trouve dans le cas présent que les phénomènes moyens mesurés sont équivalents, ce qui n'implique pas nécessairement que les couches de polymères adsorbées sont elles-mêmes toutes identiques. Ainsi, si l'on se réfère de nouveau aux figures IV.12 a et b, on observe que l'effet de la réticulation sur la mobilité des chaînes est d'autant plus marqué que le dextrane contient peu de groupes phénoxy. A l'inverse, l'effet sur la diminution du nombre de boucles est plus prononcé dans le cas du dextrane fortement substitué en groupes phénoxy.

L'effet de la réticulation sur la conformation des chaînes de dextrane adsorbé dépend donc de la composition du dextrane. On peut émettre les hypothèses suivantes :

Le dextrane le moins substitué en groupes phénoxy (DexPC) est très aplati à la surface du polystyrène mais présente en solution des boucles mobiles. Si la réticulation a lieu principalement au niveau des boucles qui sont plus accessibles que les segments en trains, l'effet mesuré sera essentiellement une augmentation des temps de corrélation. Néanmoins ces boucles déjà très mobiles, le resteront suffisamment pour être comptabilisées dans la population P_{sol} .

Le dextrane le plus substitué en groupes phénoxy (DexPB), est quant à lui, moins aplati à la surface des particules mais les boucles sont plus petites et leur mobilité plus faible. Ces boucles, déjà peu mobiles au départ, deviendront plus rigides après réticulation, ce qui aura pour effet de déplacer le seuil de coupure entre P_{sol} et P_{ads} d'où une augmentation de P_{ads} .

Ceci est représenté sur le schéma ci-dessous :



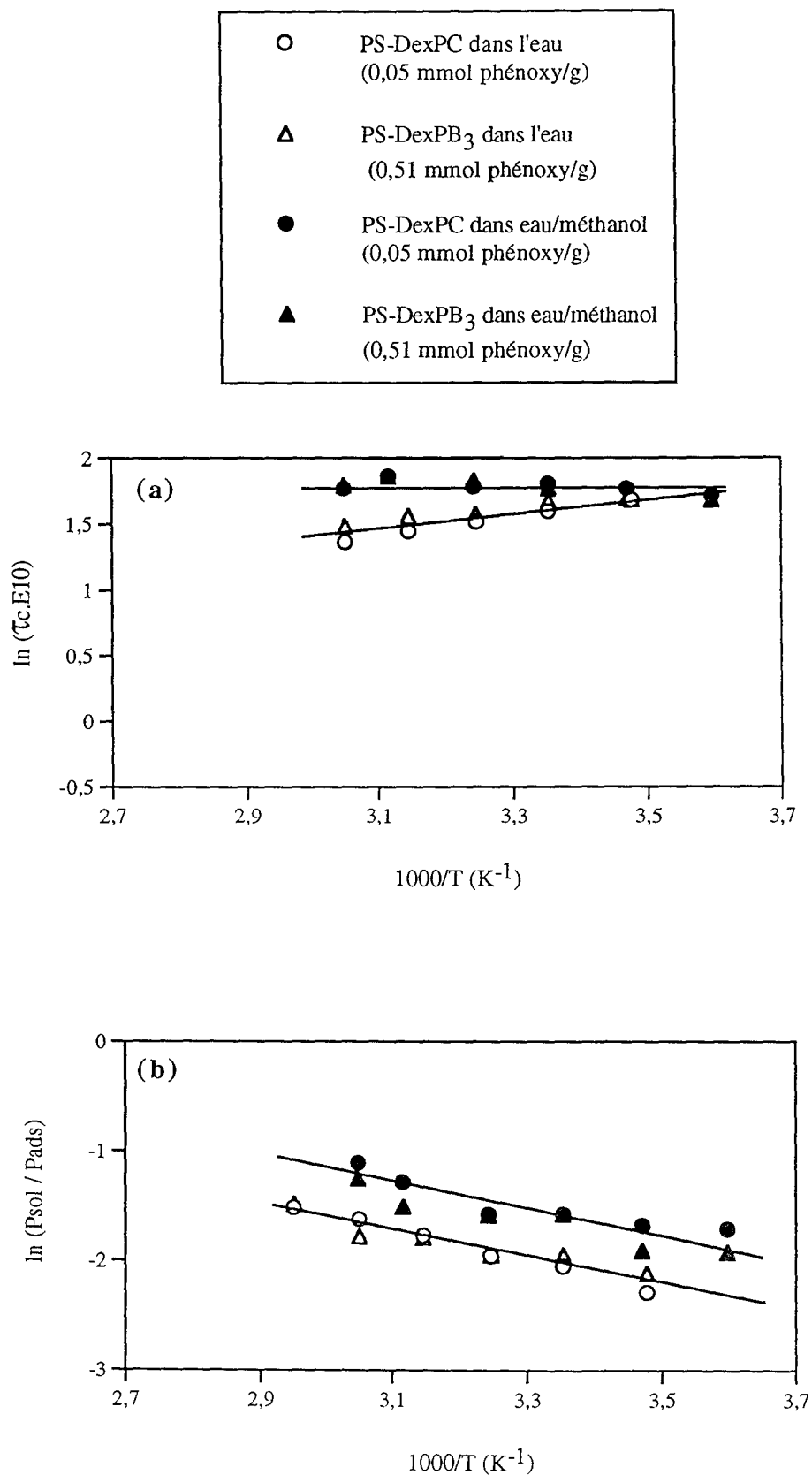


Figure IV.13 : Comparaison des évolutions des temps de corrélation (a) et des $\ln(P_{sol}/P_{ads})$ (b) des marqueurs avec l'inverse de la température absolue pour deux supports PS-DexP (à Γ_{pl} , stabilisés) en suspension dans l'eau et dans un mélange eau/méthanol (80/20% V/V).

3-3-4 Présence de solvant organique

Au cours de nos travaux, les supports chromatographiques de PS-DVB modifiés par adsorption de divers dextrans ont été caractérisés dans plusieurs éluants dont un milieu mixte eau/méthanol à 80/20 % V/V. La présence de méthanol dans la suspension a pour but de défavoriser l'établissement des interactions hydrophobes quelle que soit leur origine (surface/phénoxy ou phénoxy/phénoxy).

Les figures IV.13 a et b relient les temps de corrélation et la proportion relative des populations de marqueurs en fonction de l'inverse de la température pour deux supports de PS-DexP réticulés en présence ou non de méthanol. En présence de méthanol, la fraction rapide augmente pour les deux échantillons quel que soit le taux de phénoxy du polymère adsorbé. Ceci laisse à penser qu'effectivement un certain nombre d'interactions entre le polymère adsorbé et le polystyrène est rompu. Dans tous les cas, les temps de corrélation devraient être abaissés. Cependant, l'inverse est observé. Ceci est probablement lié au fait que le mélange eau-méthanol est un moins bon solvant que l'eau pour les dextrans qui adoptent une structure plus compacte, ce qui a pour effet que les chaînes sont moins flexibles et moins mobiles. Quoiqu'il en soit, l'intervention du méthanol vis-à-vis des deux supports ne permet pas non plus de différencier de façon absolue les comportements de chaque polymère.

3-3-5 Présence d'albumine

Des échantillons de PS-DVB modifiés par adsorption de dextrans-phénoxy marqués ont été mis au contact d'une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) en tampon phosphate (0,05 M, pH 7). Cette protéine, particulièrement hydrophobe, a été utilisée par ailleurs pour évaluer l'efficacité du recouvrement des particules en terme d'hydrophilie. Les échantillons analysés sont constitués de particules de PS-DVB recouvertes de dextrans-phénoxy réticulés, de taux de groupements phénoxy extrêmes (0,05 et 0,56 mmol/g). Enfin, la gamme de température est restreinte à l'intervalle de 10 à 40°C pour éviter la dénaturation de la protéine.

Les figures IV.14 a et b tracent les courbes respectives de $\ln \tau_c$ et $\ln \frac{P_{sol}}{P_{ads}}$ en fonction de $\frac{1}{T}$ pour des supports recouverts de DexP réticulés, en suspension dans l'eau et dans une solution d'albumine à 2 g/L.

En présence d'albumine, les marqueurs présentent des temps de corrélation plus faibles que dans l'eau et ce pour les deux échantillons étudiés. De plus, la proportion de segments déployés en boucles et queues est considérablement augmentée pour le support PS-DexPC, le plus faiblement substitué, où P_{sol} s'accroît d'environ 13 % dans l'eau à environ 23 % dans la

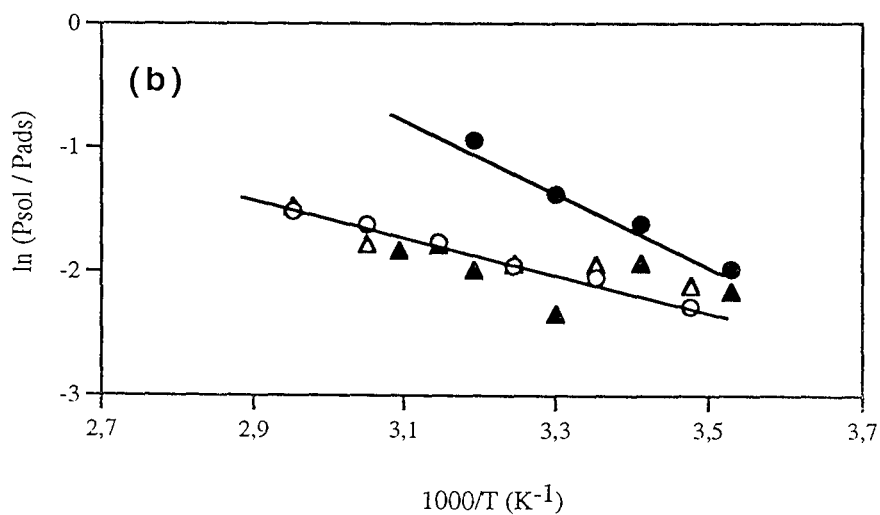
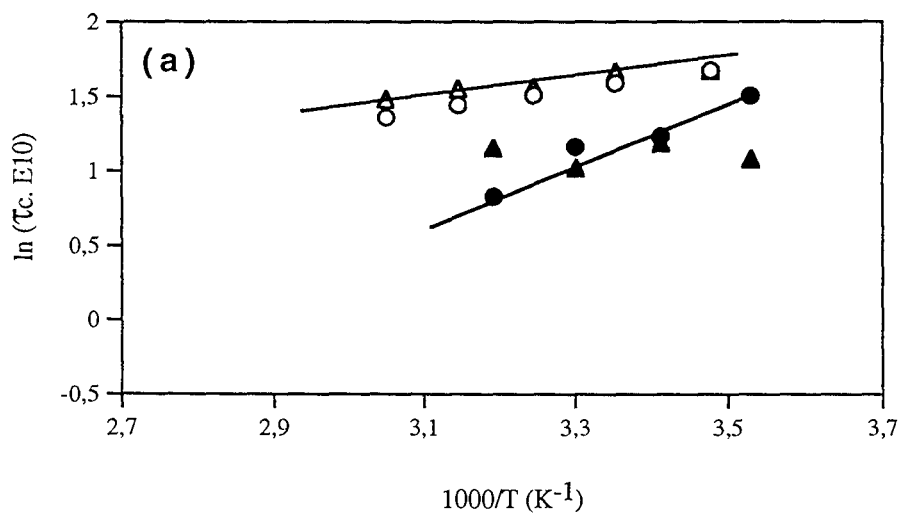
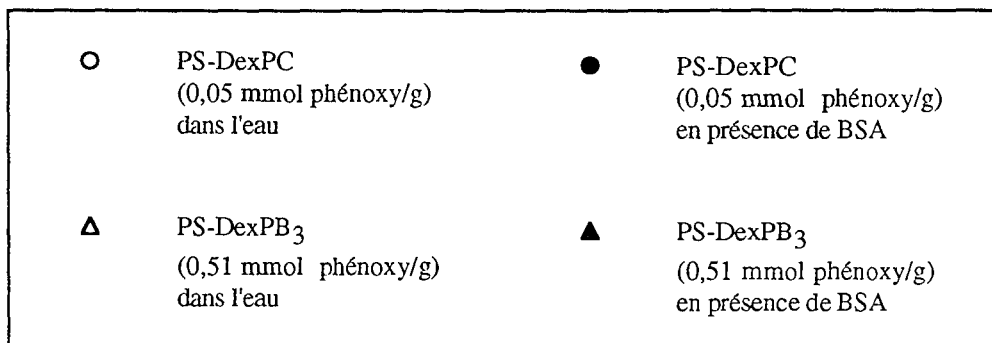


Figure IV.14 : Comparaison des évolutions des temps de corrélation (a) et de $\ln(P_{sol} / P_{ads})$ (b) des marqueurs avec l'inverse de la température absolue pour deux supports PS-DexP (à Γ_{pl} , stabilisés) en suspension dans l'eau et dans une solution de BSA à 2 g/L en tampon phosphate pH 7.

solution protéique à 25°C. En revanche, la fraction mobile pour le support PS-DexPB n'est pas affectée par la présence de la protéine.

L'ensemble de ces constatations montre que la BSA interagit différemment avec les polymères adsorbés selon leur teneur en groupes hydrophobes. En effet dans le cas du DexPC, la protéine hydrophobe semble déplacer facilement les chaînes de dextrane adsorbées, pour interagir elle-même avec la surface du polystyrène. La proportion et la taille des boucles déployées en solution augmentent, leur mobilité s'en trouve accrue. En ce qui concerne le DexPB, la mobilité accrue des marqueurs pourrait s'expliquer par soit un effet de déplacement des chaînes comme précédemment, soit par la disparition des interactions phénoxy-phénoxy au profit d'interactions polymère-protéine. L'effet de déplacement des chaînes semble peu probable car la population mobile varie peu en présence de protéine. La protéine ne rentre pas ou peu en interaction directe avec la surface.

On peut également supposer que la mobilité du dextrane est modifiée à l'approche de la protéine, par un effet de déformation des chaînes. Ce phénomène est largement décrit dans la littérature (27, 28).

La couche formée par le DexPB est donc moins perméable à la protéine que celle formée par le DexPC. Cette conclusion est en accord avec le fait que les supports préparés par adsorption de dextrans à fort taux de groupes phénoxy sont très hydrophiles, comme nous avons pu le mettre en évidence par la non-adsorption spécifique de BSA sur ces supports. Ces expériences sont bien sûr à relier avec le comportement chromatographique des protéines sur ces supports.

4 - CONCLUSION

L'adsorption de polymères amphiphiles tels que les dextrans-phénoxy est un procédé approprié pour hydrophiliser des surfaces hydrophobes telles que celles des particules de PS-DVB. Néanmoins, le taux de groupes hydrophobes des polymères influence considérablement la nature du recouvrement et donc les propriétés de la couche adsorbée. Nous avons mis en évidence que l'adsorption de l'albumine sur les particules modifiées diminue de façon significative lorsque le taux de recouvrement des billes augmente et à taux comparables, lorsque le contenu du dextrane en groupes phénoxy augmente jusqu'à une certaine valeur (0,56 mmol de phénoxy/g de polymère). En particulier, le support PS-DexPB recouvert à Γ plateau semble être bien hydrophile.

Dans tous les cas, les couches de polymères sont étroitement ancrées à la surface. En effet, les fractions de populations rapides déterminées par RPE à des températures avoisinant la température ambiante sont comprises entre 8 et 25% pour tous les supports étudiés, quels que soient le milieu concerné, le taux de recouvrement des particules et la teneur en groupes phénoxy des polymères. Les différences observées entre les couches de polymères adsorbées ont été schématiquement représentées. Le taux de groupements phénoxy s'avère être un paramètre déterminant sur la mobilité des chaînes. Les chaînes de polymères possédant un taux élevé en groupes phénoxy sont les plus compactes en raison de l'aptitude des groupes phénoxy à s'associer. Après stabilisation de la couche déposée par réticulation chimique à l'épichlorhydrine, les divers supports préparés présentent apparemment les mêmes caractéristiques. Seule la présence d'albumine dans les suspensions permet de distinguer le comportement des divers matériaux : la couche de polymère est d'autant moins modifiée au contact de protéines qu'elle contient un taux élevé de groupes phénoxy. Ceci explique que seuls les supports préparés par adsorption à saturation des dextrans les plus hydrophobisés soient les plus hydrophiles. Dans le cas présent, ces résultats indiquent de toute évidence que ni l'épaisseur de la couche adsorbée ni la mobilité des chaînes ne jouent seuls un rôle déterminant dans le processus d'adsorption de l'albumine. En effet, les couches de dextrans peu substituées en groupes phénoxy sont vraisemblablement les plus épaisses (boucles plus longues) mais certainement les plus diffuses (boucles diluées). Dans ce cas, les profils de concentrations en polymère à la surface du polystyrène seraient dépendants de la teneur en phénoxy du polymère et les couches les plus denses et donc les moins perméables seraient obtenues avec le dextrane le plus riche en groupes aromatiques. Ceci est en accord avec les résultats présentés par Osterberg (29). Cet auteur démontre que l'adsorption de fibrinogène à la surface de polystyrène, modifié par greffage chimique de dextrane et de polyéthylène glycol, diminue quand la densité de la couche adsorbée augmente, l'extension des chaînes en solution étant dans ce cas, un paramètre beaucoup moins déterminant.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) F. E. Regnier
The role of protein structure in chromatographic behavior
Science, **238**, (1987), 319-323
- (2) C. C. Bigelow
On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure
J. Theoret. Biol., **16**, (1967), 187-211
- (3) B. H. J. Hofstee et N. F. Otilio
Non-ionic adsorption chromatography of proteins
J. Chromatogr., **159**, (1978), 57-69
- (4) J. D. Andrade et V. Hlady
Protein adsorption and materials biocompatibility : a tutorial review and suggested hypotheses
Adv. Polym. Sci., **79**, (1986), 1-62
- (5) W. Norde
Adsorption proteins from solution at liquid-solid interface
Adv. Colloid Interface Sci., **25**, (1986), 267-340
- (6) F. B. Anspach, A. Johnston, H. J. Wirth, K. K. Unger et M. T. W. Hearn
High-Performance liquid chromatography of amino-acids, peptides and proteins.
XCV^a Thermodynamic and kinetic investigations on rigid and soft affinity gels with varying particle and pore sizes : comparison of thermodynamic parameters and the adsorption behavior of proteins evaluated from bath and frontal analysis experiments.
J. Chromatogr., **499**, (1990), 103-124
- (7) S. Y. M Lau, A. K. Taneja et R. S. Hodges
Effects of high performance liquid chromatography solvents and hydrophobic matrices on the secondary and quaternary structure of a model protein
Reserved-phase and size-exclusion high performance liquid chromatography
J. Chromatogr., **317**, (1984), 129-140
- (8) Q. M. Mao, R. Stockmann, I. G. Prince et M. T. W. Hearn
High performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins
CXXVI. Modelling of protein adsorption with non-porous and porous particules in a finite bath
J. Chromatogr., **646**, (1993), 67-80
- (9) M. Léonard, C. Fournier et E. Dellacherie
Polyvinylalcohol coated macroporous polystyrene particules as stationary phases for the chromatography of proteins.
J. Chromatogr. B, **664**, (1995), 39-46
- (10) A. Tuncel, A. Denigli, D. Purvis, C. R. Lowe et E. Piskin
Cibacron blue F3G attached monosize poly(vinylalcohol)-coated polystyrene microspheres for specific albumin adsorption
J. Chromatogr., **634**, (1993), 161-168
- (11) T. Jr Peters
Serum albumin
Adv. Protein Chem., **37**, (1985), 161-245

- (12) T. A. Scott et E. H. Melvin
Determination of dextran with anthrone
Anal. Chem., **25**, (1953), 1656-1661
- (13) C. Fournier, M. Léonard et E. Dellacherie
Coating polystyrene particles by adsorption of hydrophobically modified dextran
Langmuir, **11**, (1995), 2344-2347
- (14) H. Hommel
Polymers at solid interfaces : a spin labelling approach
Adv. Colloid. Interface Sci., **54**, (1995), 209-277
- (15) K. K. Fox, I. D. Robb et R. Smith
Electron Paramagnetic Resonance Study of the conformation of macromolecules adsorbed at the solid/liquid interface
J. C. S. Faraday Trans., **1**, (1974), 1186-1190
- (16) D. Kivelson
Theory of EPR (Electronic spin Resonance) linewidths of free radicals
J. Chem. Phys., **33**, (1960), 1090-1106
- (17) J. H. Freed
Spin labelling theory and applications
Academic Press, New York, Ed. L. J. Berliner, (1976)
- (18) M. A. Cohen-Stuart, T. Cosgrove et B. Vincent
Experimental aspects of polymer adsorption at solid/solution interfaces
Adv. Colloid Interface Sci., **24**, (1986), 143-239
- (19) H. Hommel, A. P. Legrand, H. Balard et E. Papirer
Influence of chain length on conformations of PEO chains grafted on silica
Polymer, **24**, (1983), 959-963
- (20) A. Touhami, H. Hommel, A. P. Legrand, A. Serres, D. Muller et J. Jozefonvicz
Spin-labelling study of dextran-coated silica : Effect of cross-linking
Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects, **75**, (1993), 57-64
- (21) A. Serres
Supports de silice passivée à ligands biospécifiques : Synthèse, caractérisation et propriétés de séparation en chromatographie des protéines
Thèse de doctorat, Université Paris-Nord, (1994)
- (22) M-P. Vivarat-Perrin
Réalisation de nouveaux supports à base de copolymères réactifs adsorbés sur silice poreuse. Etude de leurs propriétés en chromatographie d'échange d'ions de protéines. Etude quantitative des paramètres d'interaction en chromatographie d'affinité.
Thèse de doctorat, Université Paris VI, (1992)
- (23) H. Hommel, A. P. Legrand, P. Tougne, H. Balard et E. Papirer
Influence of the grafting ratio on the conformations of PEO chains grafted on silica.
Macromolecules, **17**, (1984), 1578-1581
- (24) C. Amiel, B. Sébille, H. Hommel, et A.P. Legrand
Adsorption of random copolymers on silica : EPR spectroscopy study
J. Colloid Interf. Sci., **165**, (1994), 236-243

- (25) G. S. Bethell, J. S. Ayers, M. T. W. Hearn et W. S. Hancock
Investigation of the activation of cross-linked agarose with carbonylating reagents and the preparation of matrices for affinity chromatography purifications.
J. Chromatogr., **219**, (1981), 353-359
- (26) K. Nilson et K. Mosbach
Immobilization of enzymes and affinity ligands to various hydroxyl groups carrying supports using reactive sulfonyl chlorides.
Biochem. Biophys. Res. Commun., **102**, (1981), 449-457
- (27) E. Österberg, K. Bergström, K. Holmberg, J. A. Riggs, J. M. Van Alstine, T. P. Schuman, N. L. Burns et J. M. Harris
Comparison of polysaccharide and poly(ethylene glycol) coatings for the reduction of protein adsorption on polystyrene surfaces.
Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects, **77**, (1993), 159-169
- (28) K. Bergström, E. Österberg, K. Holmberg, A. S. Hoffman, T. P. Schuman, A. K. Kozłowski et J. M. Harris
Effects of branching and molecular weight of surface-bound poly(ethylene oxide) on protein rejection.
J. Biomater. Sci. Polymer Edn, **6**, (1994), 123-132
- (29) E. Österberg, K. Bergström, K. Holmberg, T. P. Schuman, J. A. Riggs, N. L. Burns, J. M. Van Alstine et J. M. Harris
Protein-rejecting ability of surface-bound dextran in end-on and side-on configurations : comparison to PEG.
J. Biomed. Mater. Res., **29**, (1995), 741-747

CHAPITRE V

CHAPITRE V

CARACTÉRISATION STRUCTURALE DES PARTICULES DE POLYSTYRÈNE NATIVES ET MODIFIÉES

Les supports de PS-DVB modifiés par adsorption de dextrans-phénoxy ont été caractérisés d'un point de vue structural. Ces diverses caractérisations rendent compte d'une part de la géométrie et de la granulométrie des particules mais surtout, des modifications intervenues lors du recouvrement par le dextrane au niveau de leur porosité. La structure poreuse des particules a été étudiée d'une part, à l'état sec par adsorption d'azote et par porosimétrie au mercure et d'autre part, à l'état solvato, par chromatographie d'exclusion stérique dans divers milieux aqueux, organique et mixte.

1 - TAILLE ET FORME DES PARTICULES

La morphologie et la taille de particules sont des paramètres importants pour leurs performances chromatographiques (cf. Chapitre I) comme le souligne R. E. Majors (1).

1-1 MICROSCOPIE

Les techniques microscopiques sont couramment employées pour analyser la taille et la forme de particules.

1-1-1 Microscopie optique

La microscopie optique, de par sa facilité de mise en oeuvre, a été largement utilisée pour observer les particules de PS-DVB tant à l'état sec qu'en suspension. Ainsi, l'observation fréquente des particules par microscopie optique au fur et à mesure de l'avancement de la préparation des supports a permis de contrôler leur intégrité.

1-1-2 Microscopie électronique à balayage

1-1-2-1. Conditions expérimentales

Les expériences ont été réalisées au moyen d'un appareil JEOL JSM T330 appartenant au Laboratoire des Sciences du Génie Chimique UPR CNRS 6811-ENSIC, avec l'aide de J.-F. Rémy. Les particules sèches à base de PS-DVB sont déposées sur un porte échantillon recouvert d'un ruban adhésif double face. Lorsque le dépôt des billes semble uniforme, on procède à la métallisation de leur surface avec un mélange constitué à 60 % de palladium et à 40 % d'or pendant 5 minutes sous vide à 1,2 KV et 5 mA de courant imposé.

1-1-2-2. Analyse des billes natives et modifiées

Une vue d'ensemble de particules de PS-DVB (lavées et conditionnées) représentée sur la figure V.1 met en évidence des particules de géométrie parfaitement sphérique de tailles variées de 20 μm de diamètre pour les plus petites à 60 μm pour les plus grandes. La méthode de lavage et de conditionnement des particules permet l'élimination d'une grande majorité de débris présents dans la suspension (cf. chapitre III). Notons qu'une agitation magnétique vigoureuse provoque de nombreux dégâts tels que l'expose la figure V.2. Ceci nous a conduit à utiliser des systèmes d'agitation rotatif (pour des faibles quantités de support à préparer) ou orbitaire (pour des quantités plus importantes).

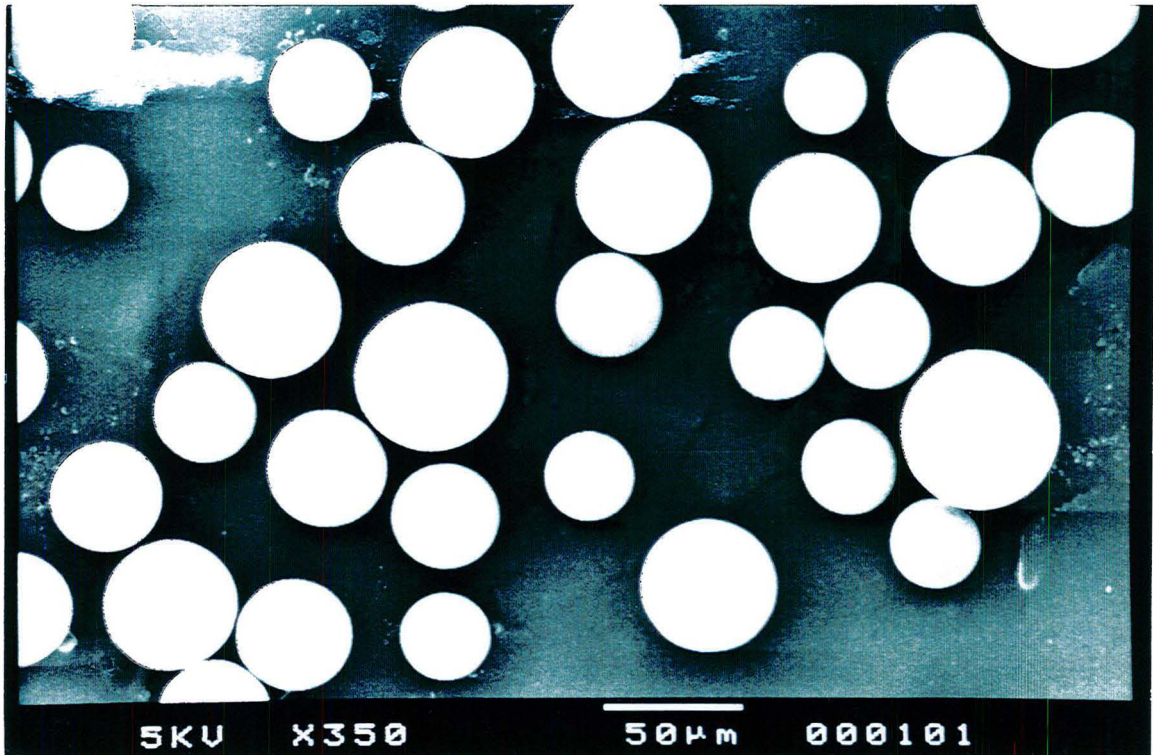


Figure V.1 : *Vue d'ensemble des particules de PS-DVB obtenue par Microscopie Électronique à Balayage (appareil JEOL JSM T330). Les particules ont été lavées et conditionnées selon le protocole décrit dans le chapitre III.2.*

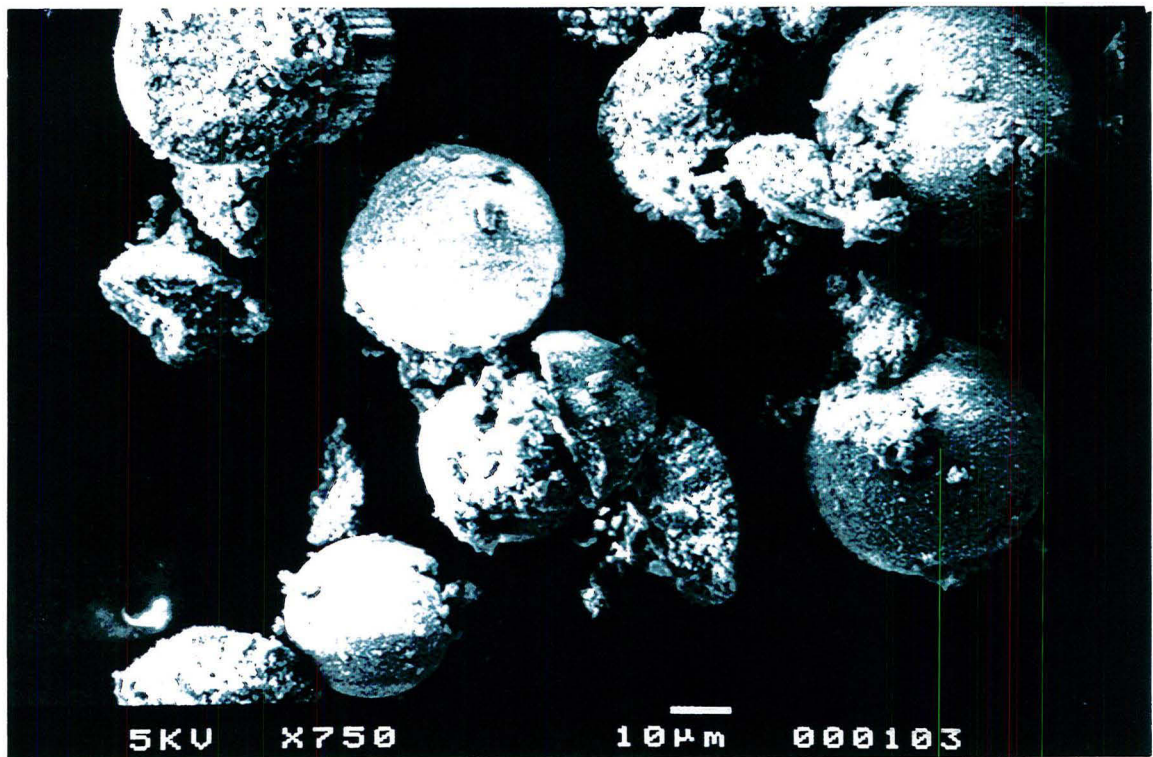


Figure V.2 : *Effet de l'agitation magnétique sur l'état des particules de PS-DVB*

1-2 MESURE DE TAILLE PAR DIFFRACTION DE LA LUMIÈRE

1-2-1 Principe

Lorsqu'un faisceau de lumière monochromatique est intercepté par un obstacle, ce faisceau est diffracté et la répartition de la puissance dans la figure de diffraction observée dépend des dimensions de l'obstacle. Les granulomètres exploitent une image de diffraction de Fraunhofer dans le cas d'objets sphériques, image reçue dans un plan focal (constitué de cellules photoélectriques).

Une gamme granulométrique peut être divisée en intervalles de taille qui génèrent chacun un motif de diffraction en fonction de sa taille moyenne avec une intensité fonction du nombre de particules qu'il contient. L'analyse du motif de diffraction permet donc de déterminer la distribution granulométrique d'un lit de particules. La distribution est donnée en diamètres équivalents d'une sphère quelle que soit la géométrie des particules.

1-2-2 Appareillage et préparation pour analyse

Le granulomètre utilisé est le MALVERN Master Sizer (Laboratoire des Sciences du Génie Chimique-ENSIC) et dispose de trois objectifs selon les classes granulométriques à analyser. La lentille choisie (100 mm) permet d'analyser des particules de rayons compris entre 0,5 et 180 μm . Bien que le principe de mesure donne directement accès à la distribution de tailles des particules en nombre, le résultat est présenté sous forme d'une distribution normée en fraction volumique.

Aucune préparation particulière des échantillons n'est requise pour l'analyse granulométrique. Les divers échantillons sont mis en suspension dans l'eau. La cellule de mesure est lavée abondamment à l'eau distillée, solvant de référence, avant de réaliser l'auto-alignement du faisceau laser. La concentration des particules dans la cellule est ajustée en fonction de l'intensité mesurée. L'analyse s'effectue en quelques secondes et nécessite très peu de particules.

1-2-3 Analyse granulométrique des supports

Les résultats sont fournis sous forme d'histogrammes reliant la proportion volumique en fonction des classes de populations. Le diamètre moyen correspond au diamètre pour lequel la fraction volumique cumulée est égale à 50%.

Les figures V.4 a et b représentent les distributions granulométriques des particules de polystyrène-divinylbenzène natives avant et après le protocole de lavage et conditionnement décrit dans le chapitre II. La distribution est globalement inchangée après le lavage des particules à l'exception de l'élimination des fines particules inférieures à 5 μm . Le diamètre moyen des tailles est centré autour de $40 \pm 1 \mu\text{m}$.

Lorsque les particules sont recouvertes à Γ_{pl} par les divers dextrans modifiés, les distributions de taille ne varient pas non plus comme l'illustrent les figures V.4 c et d. L'épaisseur de la couche de polymère formée, estimée à quelques nanomètres, est trop faible devant des diamètres particuliers et ne peut être prise en compte. Quelle que soit la modification apportée aux particules, les distributions granulométriques montrent la présence de particules de diamètre compris essentiellement entre 20 et 60 μm , le diamètre moyen étant de $40 \pm 1 \mu\text{m}$.

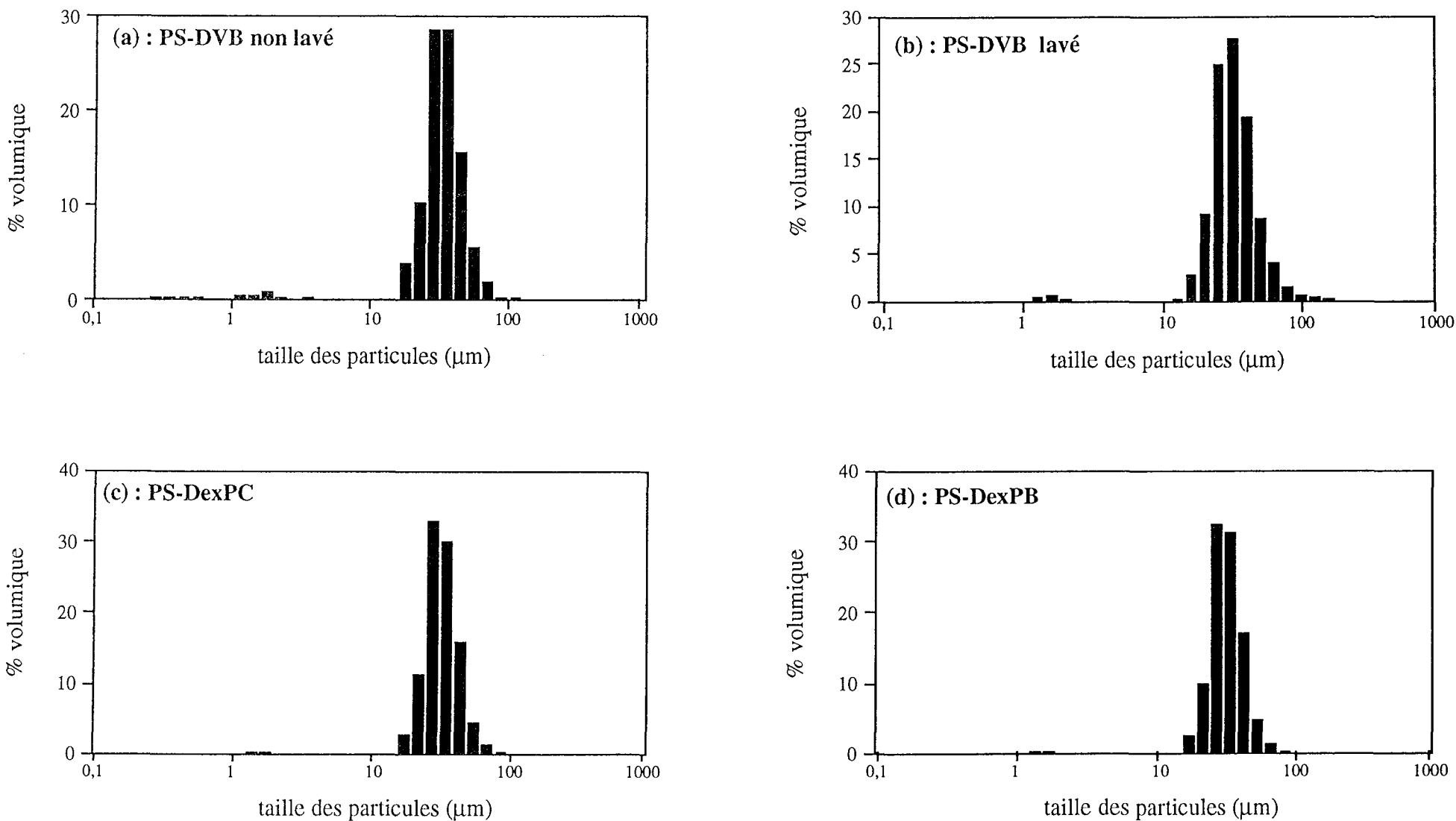


Figure V.4: *Distribution granulométrique des particules de PS-DVB natives et modifiées (Malvern Master Sizer)*
 (a) *Particules de PS-DVB non conditionnées*
 (b) *Particules de PS-DVB conditionnées*
 (c) *Particules de PS-DVB modifiées par adsorption à saturation de DexPC (0,05 mmol de phénoxy/g de polymère)*
 (d) *Particules de PS-DVB modifiées par adsorption à saturation de DexPB (0,56 mmol de phénoxy/g de polymère)*

2- POROSITÉ ET SURFACE SPÉCIFIQUE À L'ÉTAT SEC

Pour caractériser la texture d'un solide poreux ou divisé, les différents paramètres à connaître sont la surface spécifique, le volume poreux total et la répartition du volume et de la surface en fonction des dimensions des pores. En effet, dans un corps poreux, la surface externe (surface géométrique) est généralement négligeable devant la surface interne constituée par les parois des pores. La surface spécifique (surface externe et surface des pores) et le volume poreux ne varient pas de la même façon avec la taille des pores. Si les pores sont de petite taille, leur volume sera faible et leur surface très grande. A l'inverse, un solide dont les pores sont larges présente un volume poreux important au regard de sa surface. Un rayon de pore moyen peut être défini de différentes façons mais ne reflète en aucun cas la distribution poreuse. Les deux définitions principales du rayon poreux moyen sont :

- R_{p50} correspondant au rayon poreux à mi-volume de la courbe de distribution poreuse cumulée ($\sum V_{p_i} = f(R_{p_i})$),
- R_{pm} correspondant au rayon du pore dont la population est la plus fréquente dans la courbe de distribution relative ($dV_{p_i} / dR_{p_i} = f(R_{p_i})$),

avec V_{p_i} : volume des pores de rayons R_{p_i} .

Le plus souvent, nous utiliserons R_{p50} pour définir un rayon poreux moyen.

Pour comparer des matériaux, il est cependant indispensable de connaître la répartition en volume des pores selon leurs dimensions (courbe de distribution poreuse). Cette répartition est accessible par les méthodes d'adsorption de gaz, pour les pores de rayon inférieur à 250 Å et/ou par porosimétrie au mercure pour les pores de rayon supérieur à 50 Å.

Pour un solide dont la distribution en taille des pores est large, ces deux techniques sont souvent utilisées de façon complémentaire.

2-1 L'ADSORPTION PHYSIQUE D'AZOTE

Le phénomène d'adsorption physique se manifeste lorsqu'un gaz nommé adsorbat est mis en contact avec un solide appelé adsorbant. Une partie des molécules disparaît de la phase gazeuse pour se fixer à la surface du solide par des forces de faible énergie (Van der Waals). Les expériences s'effectuent à très basse température (-196°C) sous pression croissante puis décroissante pour établir la courbe d'adsorption/désorption schématisée sur la figure V.5.a. La zone n°1 correspond à l'adsorption d'azote en couche monomoléculaire, comme dans le modèle de Langmuir. Mais chaque molécule de cette couche constitue un site d'adsorption pour la couche suivante et l'épaisseur de la couche adsorbée augmente (zone 2). La zone n°3 correspond à la zone de condensation capillaire de l'azote dans les mésopores. La condensation

capillaire est responsable de l'hystérèse de désorption (zone 4), liée au fait que la désorption d'azote s'effectue à des pressions plus faibles que la condensation, dans un pore de taille donnée. La forme de l'hystérèse dépend de la géométrie des pores.

L'adsorption d'azote conduit d'une part à la détermination de la surface spécifique d'après l'équation BET (2) et d'autre part à la répartition poreuse pour les pores dont le rayon est inférieur à 250 Å. Pour les pores de taille supérieure, le rayon de courbure du ménisque est insuffisant pour que la condensation capillaire ait lieu. Les macropores ne sont donc comptabilisés qu'au titre de leur surface.

2-1-1 Calcul de la surface spécifique

Plusieurs théories ont été développées pour calculer la surface spécifique à partir des isothermes d'adsorption. L'exploitation la plus connue est celle décrite par Brunauer, Emmett et Teller ou méthode BET. Celle-ci suppose :

- un recouvrement total de la première couche moléculaire avant remplissage de la deuxième,
- l'adsorption est due aux forces de Van der Waals,
- le nombre de couches adsorbées peut être infini.

La relation BET appelée transformée fait intervenir la notion de gaz adsorbé et s'applique pour de valeurs de pressions relatives P/P_0 comprises entre 0,05 et 0,35. La transformée BET revient à tracer $\frac{P}{V(P_0 - P)}$ en fonction de P/P_0 comme le montre l'équation [1] :

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{V_m \cdot C} + \frac{C-1}{V_m \cdot C} \times \frac{P}{P_0} \quad [1]$$

avec P : pression d'équilibre d'adsorption

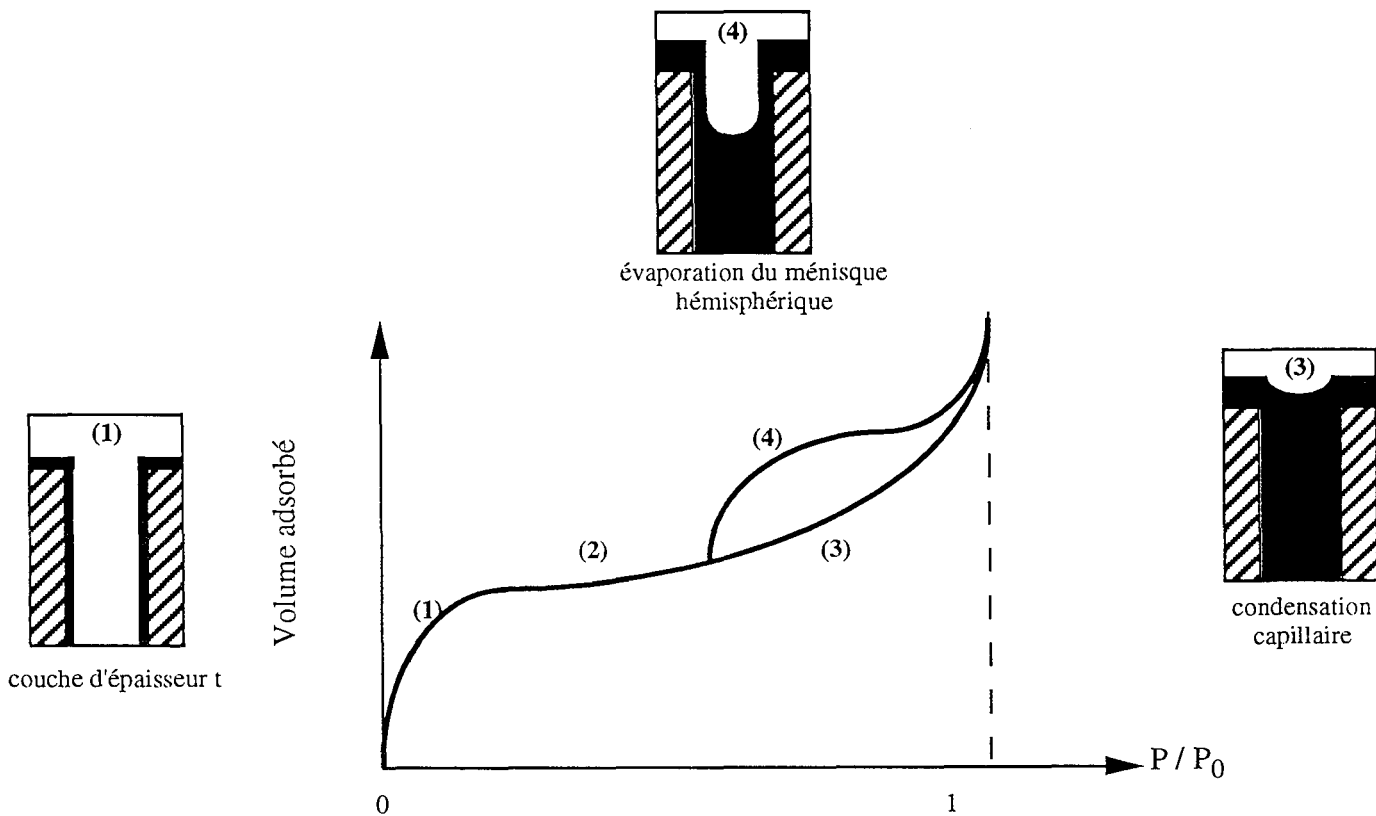
P_0 : pression de vapeur saturante de l'adsorbat

V : volume de gaz adsorbé à la pression d'équilibre P

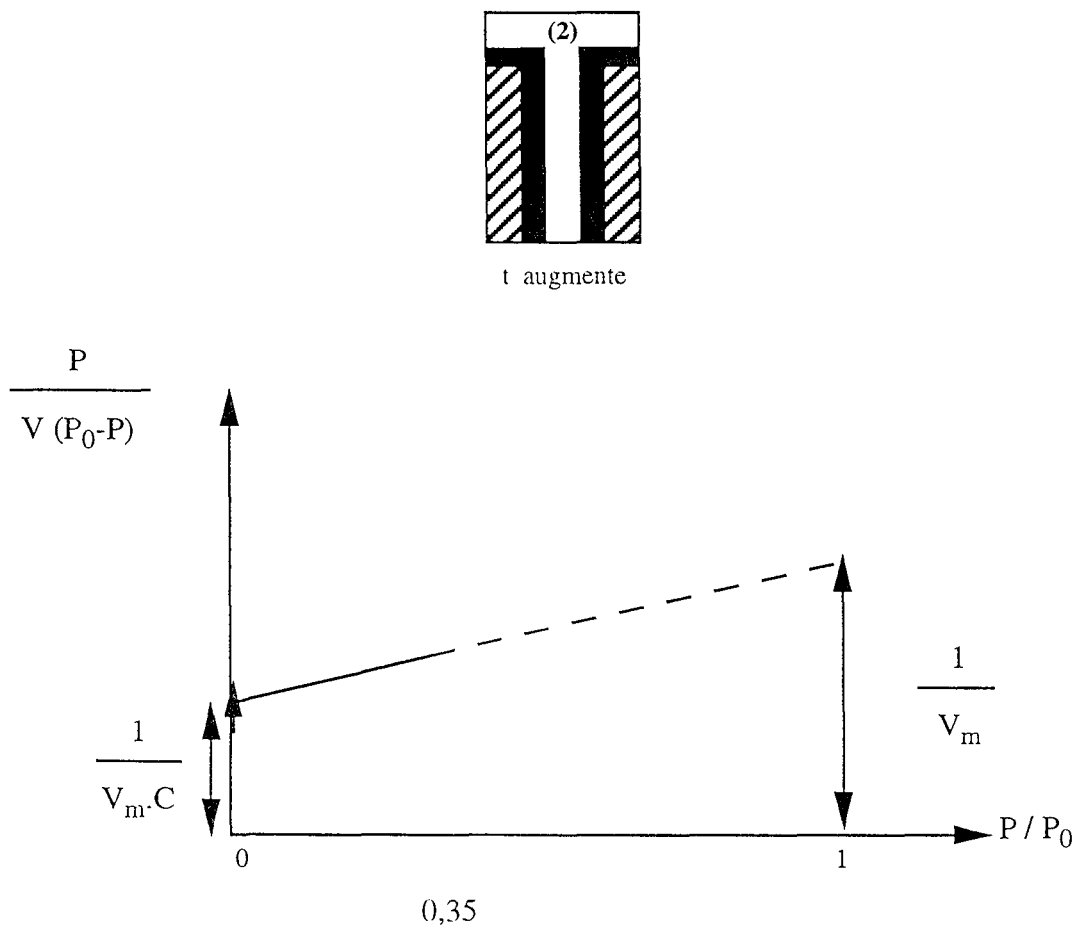
V_m : volume de gaz nécessaire à la formation d'une monocouche

C : constante qui tient compte de la chaleur d'adsorption E_1 du couple adsorbat-adsorbant et de la chaleur de liquéfaction de l'adsorbat E_L ($E_L = 5517 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ pour l'azote liquide)

$C = \exp\left(\frac{E_1 - E_L}{RT}\right)$, T est la température absolue à laquelle est effectuée l'adsorption et R la constante des gaz parfait ($8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)



(a) : Isothermes d'adsorption-désorption de gaz



(b) : Transformée de BET

Figure V.5 : Isothermes d'adsorption d'azote (a) et la transformée de BET associée (b)

Ainsi les figures V.5.a et b montrent un exemple d'isotherme d'adsorption et la transformée BET qui en résulte. Dans la pratique, l'équation BET n'est valable que jusqu'à P/P_0 équivalent à 0,35 car au delà de cette valeur, le phénomène de condensation capillaire se superpose à l'adsorption multimoléculaire, ce qui se traduit par une cassure dans la droite BET. Si la théorie se vérifie, les points expérimentaux doivent être alignés sur la droite BET de pente $\frac{C-1}{V_m \cdot C}$. L'ordonnée à l'origine de la droite est égale à $\frac{1}{V_m \cdot C}$ et permet d'obtenir la valeur de V_m .

La détermination de la surface totale S_p sera effectuée en multipliant l'aire d'une molécule d'adsorbant A_m par le nombre de molécules formant la monocouche N_m . Pour l'azote, A_m est égal à $16,27 \text{ \AA}^2$. Si V_m est exprimé en $\text{cm}^3 \text{ TPN}$, N_m s'obtient par :

$$N_m = \frac{V_m}{22414} \times N \quad \text{soit} \quad S_p = \frac{V_m}{22414} \times 6,023 \cdot 10^{23} \times 16,27$$

$$\text{d'où} \quad S_p = 4,37 \times V_m \quad (\text{m}^2/\text{g}) \quad [2]$$

La surface spécifique obtenue par cette méthode sera appelée S_{BET} tout au long de l'exposé qui suivra.

2-1-2 Détermination des rayons de pores et de la distribution poreuse

La pression à laquelle un pore se remplit ou se vide est donnée par l'équation de Kelvin :

$$\ln \left(\frac{P}{P_0} \right) = - 2 \frac{\gamma \cdot V_L}{RT \cdot R_m} \quad [3]$$

avec γ : tension de vapeur de l'azote ($8,3 \cdot 10^{-3} \text{ N.m}^{-1}$)

V_L : volume moléculaire de l'adsorbant liquide ($34,6 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ pour l'azote)

R_m : Rayon du ménisque

Partant de l'hypothèse selon laquelle les pores sont assimilés à des cylindres, il est possible de calculer le rayon de pores moyen R_p et la répartition poreuse.

Pour un pore cylindrique, R_m est égal à $2R_k$, où R_k représente le rayon de Kelvin. Lors de l'adsorption, on a donc :

$$\ln \left(\frac{P}{P_0} \right) = - \frac{\gamma \cdot V_L}{RT \cdot R_k}$$

La détermination du spectre des micropores et mésopores s'effectue par la méthode BJH. du nom de ses auteurs Barrett, Joyner et Halenda (3) à partir de la courbe de désorption, la branche d'adsorption correspondant à un état métastable.

La pression à laquelle un pore de taille R_p se vide est donnée également par la loi de Kelvin avec dans ce cas $R_m = R_k$. Pour une pression relative P/P_0 donnée, R_p est égal à $R_k + t$, t étant l'épaisseur de la couche d'adsorbat calculée expérimentalement sur un corps non poreux.

Par un découpage en tranches de la courbe de distribution poreuse ($\sum V_{p_i} = f(R_{p_i})$), la surface spécifique peut être recalculée si l'on considère un modèle de pore cylindrique. On obtient la relation ci-dessous :

$$\frac{\Delta V_{p_i}}{S_i} = \frac{R_{p_i}}{2}$$

A chaque variation du volume d'azote ΔV_p introduit correspond un pore de taille R_{p_i} et de surface S_i . La somme des S_i donne la surface spécifique calculée de l'échantillon (S_{N_2}). Si le modèle de pores cylindriques est applicable, les surfaces S_{BET} et S_{N_2} doivent être très proches.

2-2 LA POROSIMÉTRIE AU MERCURE

L'adsorption d'azote permet de caractériser essentiellement la micro ($R_p < 10 \text{ \AA}$) et une partie de la mésoporosité ($R_p < 250 \text{ \AA}$). Aussi pour caractériser les pores de rayons supérieurs, il est nécessaire de recourir à une autre technique telle que la porosimétrie au mercure, dont le principe est le suivant (4,5) :

Le mercure est un liquide non mouillant vis-à-vis de la plupart des matériaux, les forces de tension superficielles s'opposent à sa pénétration dans les pores. Pour un pore de rayon R_p , la résultante des composantes normales au plan du cercle est égale à $-2\pi R_p \gamma \cos\theta$ où γ est la tension superficielle du mercure et θ l'angle de contact mercure-paroi du pores. Si on exerce une pression P sur le mercure, celui-ci pénètre dans les pores jusqu'à ce que l'équilibre entre les forces dues à la pression et à la tension superficielle soit atteint, on a alors :

$$P \cdot \pi \cdot R_p^2 = -2\pi \cdot R_p \cdot \gamma \cdot \cos\theta \quad \text{soit} \quad R_p = -\frac{2 \cdot \gamma \cdot \cos\theta}{P} \quad [4]$$

Dans le cas d'un espace poreux assimilable à un faisceau de tubes cylindriques, cette équation connue sous le nom de la relation de Washburn, montre que le rayon des pores remplis est inversement proportionnel à la pression exercée sur le mercure.

L'analyse de la répartition poreuse s'effectue à partir de la courbe d'intrusion de mercure. La porosimétrie permet d'accéder à une grande gamme de pores, les plus fins sont atteints en augmentant la pression exercée sur le mercure. Le volume de mercure ainsi injecté entre deux pressions P_1 et P_2 conduit au volume attribuable aux pores de rayons compris entre R_{p_1} et R_{p_2} . Il suffit donc de mesurer par dilatométrie la quantité de mercure introduite dans la structure poreuse, en fonction de la pression imposée, pour obtenir la courbe de volume des pores en fonction de leur rayon et d'en déduire la répartition surfacique selon le modèle géométrique de pores choisi.

2-3 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX

2-3-1 Appareillage pour l'adsorption d'azote

L'appareil utilisé pour la détermination des surfaces totales et répartitions poreuses est un SORPTOMATIC 1900 de marque Carlo-Erba Instruments (Fisons), piloté par un logiciel Milestone 200. La surface minimum détectable est de l'ordre de 5 m^2 , la précision de 5 % et la reproductibilité de 1 à 3 % (données du constructeur). La limite supérieure de détermination du rayon poreux est 400 \AA par adsorption physique car la pression de condensation capillaire diffère très peu de la pression saturante, de telle sorte qu'une simple condensation de l'adsorbat peut être provoquée par une faible augmentation de pression. Les pores de rayons inférieurs à 10 \AA sont pratiquement remplis avec la formation de la première couche adsorbée, il n'y a pas de condensation capillaire.

100 à 150 mg de PS-DVB sont placés dans une burette en verre qui fait office de cellule de mesure. L'ensemble est dégazé plusieurs heures à 30°C et une nuit à 80°C jusqu'à atteindre une pression résiduelle de l'ordre de 4.10^{-6} bars. Après refroidissement, la burette est maintenue à la température d'adsorption (-195°C) dans un bain d'azote liquide. L'appareil effectue automatiquement des injections successives de volumes gazeux constants jusqu'à atteindre la pression de vapeur saturante P_0 (≈ 1 bar) puis effectue un cycle de désorption jusqu'à $0,13$ bars. A chaque injection, lorsque la pression d'équilibre est atteinte, la quantité d'azote adsorbée est calculée par différence entre la quantité introduite et celle non adsorbée. Avant l'analyse d'échantillons, la quantité d'azote susceptible de s'adsorber sur la paroi interne de la cellule de mesure doit être déterminée et sera ensuite déduite.

Néanmoins, des problèmes inhérents à cette instrumentation existent et sont liés à la fiabilité des capteurs de pression, aux fuites possibles aux raccords et rodages. La température doit être parfaitement stable durant l'expérience (6 heures). Pour cela, la burette est placée dans un Dewar d'1 l dont le niveau d'azote liquide est continuellement ajusté. Chaque échantillon a été analysé au moins deux fois et les résultats se sont avérés reproductibles.

2-3-2 Porosimètre à mercure

L'appareil utilisé est un porosimètre automatique Porosimeter 2 000 - Carlo Erba Instruments (Fisons). Les pressions exercées sur le mercure vont de la pression atmosphérique à 2000 bars, ce qui permet l'intrusion de mercure dans des pores de rayons compris entre 75 000 à 50 Å. L'appareil possède plusieurs fonctions principales qui permettent le dégazage de l'échantillon, la mesure de la pression exercée et la mesure du volume pénétré dans les pores par dilatométrie. Le fonctionnement de l'appareillage est décrit brièvement ci-dessous :

Un dispositif spécial "macropores unit 120" (Carlo Erba) permet d'une part le dégazage de l'échantillon (50 mg de billes sèches) et d'autre part, le remplissage du dilatomètre par le mercure. Après 4 heures de dégazage, la pression résiduelle est de l'ordre de 0,03 bars, pression à laquelle le mercure est introduit dans le dilatomètre. Le dilatomètre remis à pression atmosphérique est rempli d'huile puis placé à l'intérieur d'une enceinte hermétiquement close. Le mercure est alors introduit dans l'échantillon sous des pressions croissantes. Un capteur enregistre la pression effectivement appliquée au mercure.

Les erreurs expérimentales liées à cette méthode proviennent essentiellement de la présence de bulles d'air dans l'échantillon car l'air est 1 500 fois plus compressible que le mercure. C'est pourquoi il est absolument nécessaire de procéder à un dégazage poussé de l'échantillon. Le remplissage du dilatomètre avec le mercure est très délicat et requiert le plus grand soin. La remise à l'air du système s'effectue lentement pour permettre un remplissage correct du volume interstitiel.

L'angle de contact θ dépend de la nature du matériau mais également de sa propreté et de son état de dégazage avant la mesure. Pour le polystyrène nu, l'angle de contact mercure-paroi des pores vaut 130° (6). Cette valeur est conservée par défaut pour les particules recouvertes de dextrane, l'angle de contact n'étant pas mesurable directement sur les particules. Mais il est à noter qu'une erreur de 10° ($130 \pm 10^\circ$) sur l'angle de mouillage entraîne une erreur sur le rayon d'environ 20 à 25 %.

La tension superficielle γ dépend peu de la température mais dépend plutôt de la propreté du mercure : graisse, oxyde de mercure dont on assure la qualité en utilisant du mercure bidistillé. Selon les auteurs, γ varie entre 420 et 500 mN.m⁻¹, la valeur que nous avons utilisée est de 485 mN.m⁻¹. Cette valeur a déjà été utilisée pour des échantillons de PS-DVB (6).

Chaque analyse a été également répétée plusieurs fois.

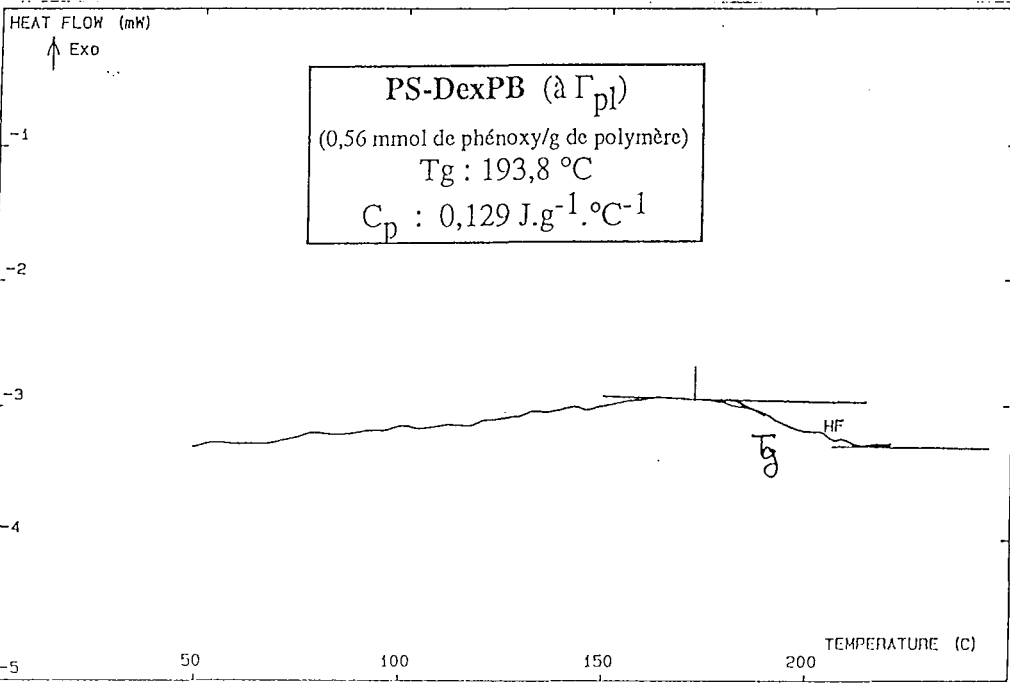
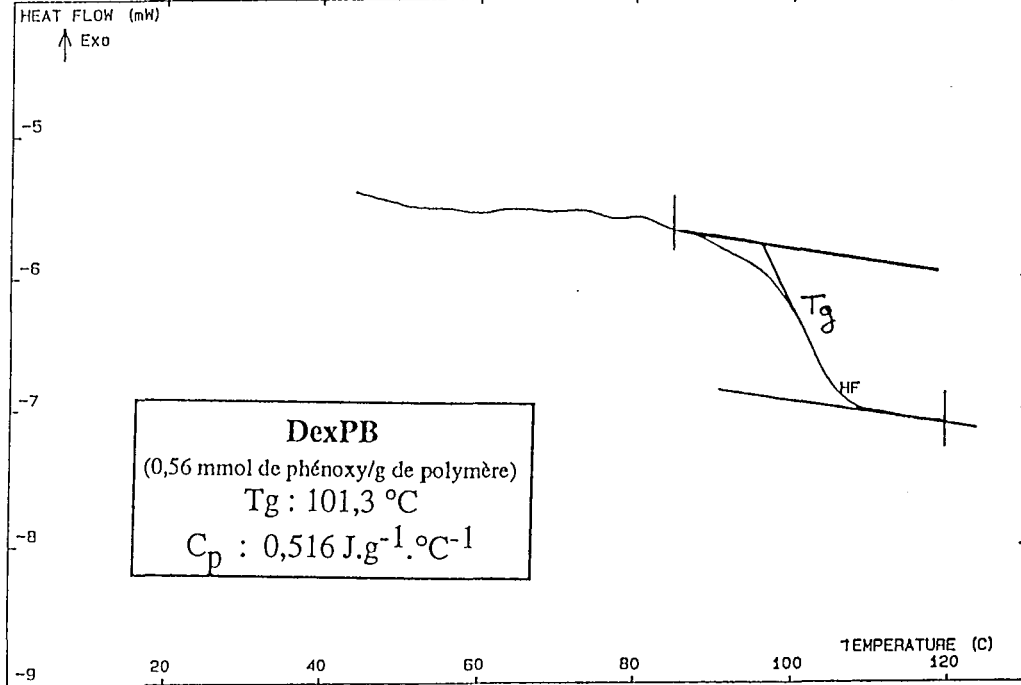
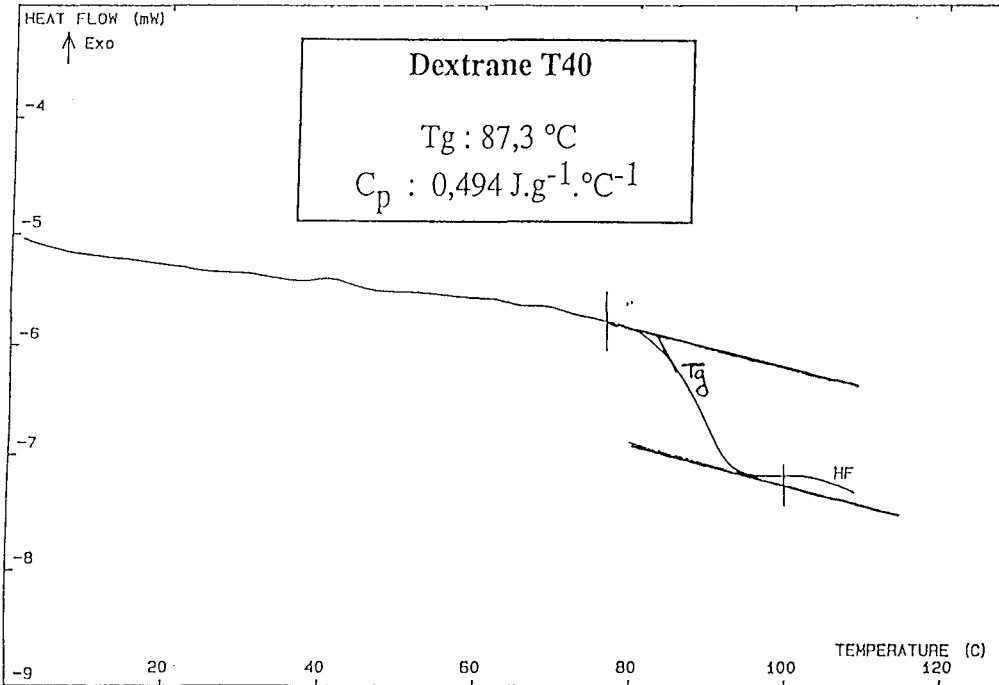


Figure V.6 : Thermogrammes des dextrans initial (T40) et modifié (DexPB) et sous forme adsorbée sur le polystyrène-divinylbenzène (PS-DexPB).

2-4 STRUCTURE DES PARTICULES MODIFIÉES

L'adsorption de dextrans amphiphiles sur des particules de PS-DVB confèrent à ces dernières des nouvelles propriétés structurales que nous allons décrire dans ce chapitre. Les caractéristiques structurales d'un matériau poreux à l'état sec sont sa surface spécifique, son volume poreux et les distributions poreuses en volume et en surface en fonction des rayons de pores. Les caractéristiques structurales des particules seront discutées en fonction de la nature de leur recouvrement.

2-4-1 Validation des méthodes d'étude structurale

2-4-1-1 Séchage des particules :

Quelle que soit la méthode utilisée (adsorption d'azote ou porosimétrie au mercure), les particules de PS-DVB modifiées ou non, doivent être séchées sous vide à 80°C pendant plusieurs heures. Nous avons donc vérifié dans un premier temps, que les caractéristiques des particules ne sont pas affectées par ce traitement préalable.

- Aucun changement de morphologie des particules n'a été observé par microscopie optique, quelles que soient la température, la durée et la pression du séchage.

- Nous avons déterminé par analyse thermique différentielle, les températures de transition vitreuse (T_g) de chacun des éléments composant les particules, sous formes indépendante et associée. L'appareil utilisé pour ces mesures est le modèle DSC92 (Setaram, France). Le profil est obtenu sous une pression d'hélium de 6 bars. Un premier tracé est systématiquement effectué pour effacer la mémoire de l'échantillon. La montée en température est de 10°C/minute, puis les échantillons sont refroidis par un flux d'azote liquide. Les thermogrammes correspondants sont donnés sur la figure V.6.

La T_g du dextrane passe de 87°C à 101°C après introduction des groupes phénoxy sur la chaîne de polymère. Cette augmentation de T_g est vraisemblablement liée à une diminution de la flexibilité des chaînes ainsi que nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre précédent.

La T_g du polystyrène, trouvée dans la littérature est de l'ordre de 100°C. Pour les particules de polystyrène réticulé par le divinylbenzène, la T_g est supérieure à 200°C.

Enfin, en ce qui concerne les billes de PS-DVB recouvertes de dextrane, aucune transition n'est observée dans un domaine de température allant de la température ambiante à 150°C. Le dextrane adsorbé voit sa T_g augmenter très fortement ($\approx 190^\circ\text{C}$), en raison de contraintes stériques liées d'une part à la proximité de la surface polystyrénique et d'autre part, à la réticulation de la couche adsorbée par l'épichlorhydrine.

Les résultats sont obtenus sous une pression de 6 bars. Ces conditions ne reflètent pas les

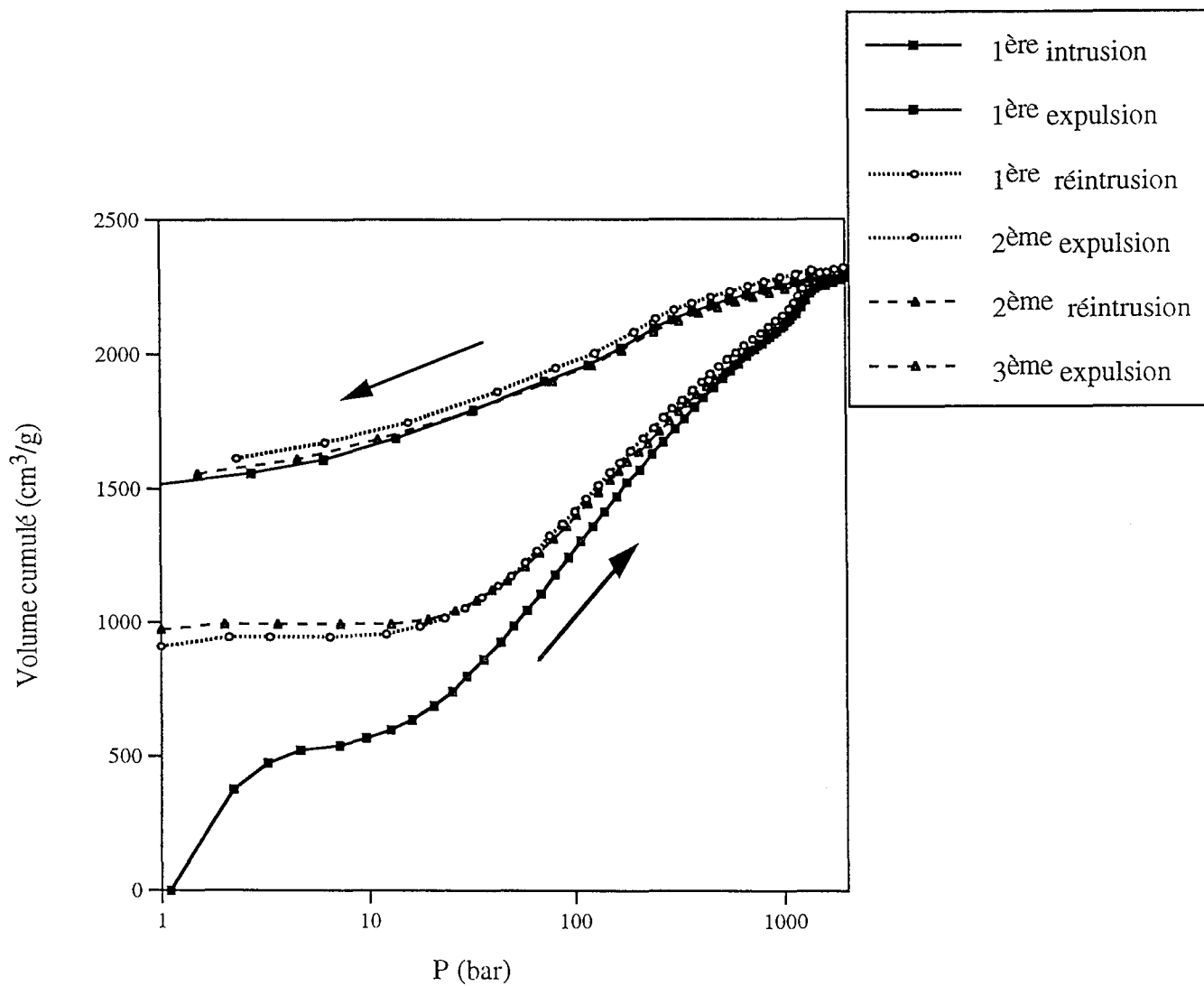


Figure V.7 : Cycles successifs d'intrusion-désintrusion de mercure sur les particules de PS-DVB

conditions dans lesquelles s'effectuent le séchage et l'analyse des particules. Néanmoins, il convient de souligner que l'influence de la pression sur la valeur de Tg est faible ($\Delta T_g = 0,03-0,06^\circ\text{C}/\text{bar}$).

2-4-1-2 Limites d'utilisation de la porosimétrie au mercure :

** Influence de la pression :*

L'intrusion de mercure dans une structure poreuse s'effectue de la pression atmosphérique jusqu'à des pressions élevées pouvant atteindre 2000 bars, ce qui peut induire des accidents structuraux (7). De nombreux auteurs ont caractérisé la porosité à l'état sec de particules destinées à la chromatographie, particules à base de polystyrène (6, 8) ou de silice (9, 10, 11). Dans certains cas, on peut relever une disparité entre les résultats obtenus par adsorption d'azote et par intrusion de mercure. D'une façon générale, ces différences sont attribuées au fait que chacune des méthodes repose sur des hypothèses de travail très différentes et que leur domaine de validité n'est pas le même. Cependant, il convient également de s'assurer de la résistance à la pression du matériau analysé par intrusion de mercure.

Kloubek (7) a développé en 1994 une théorie qui permet de déceler des accidents structuraux d'un matériau survenus pendant les mesures de porosimétrie au mercure à des pressions élevées. Ces accidents ou dommages sont provoqués essentiellement pendant la première intrusion de mercure et résultent de :

- la rupture d'une paroi fine entre deux pores dont l'un est rempli de mercure,
- l'élargissement des orifices des pores, en particulier dans le modèle de pores "ink-bottle",
- l'élargissement des interconnexions ou constriction au sein des pores.

Pourtant l'analyse de la distribution poreuse en porosimétrie au mercure repose exclusivement sur l'obtention de la courbe de première intrusion. Lorsqu'à la fin de cette étape, on diminue la pression exercée sur le mercure, une partie de celui-ci est expulsée des pores. L'hystérèse de désintrusion est liée principalement à deux facteurs :

- la cinétique d'expulsion du mercure est plus lente que celle d'intrusion,
- une certaine proportion de mercure reste irréversiblement piégée dans les pores et ceci de façon d'autant plus marquée que les pores sont petits.

Les changements structuraux conduisent à une interprétation erronée de la structure poreuse mais d'après Kloubek, ils peuvent être mis en évidence en comparant les différentes courbes d'intrusion-désintrusion successives comme celles obtenues pour les particules de PS-DVB natives (figure V.7).

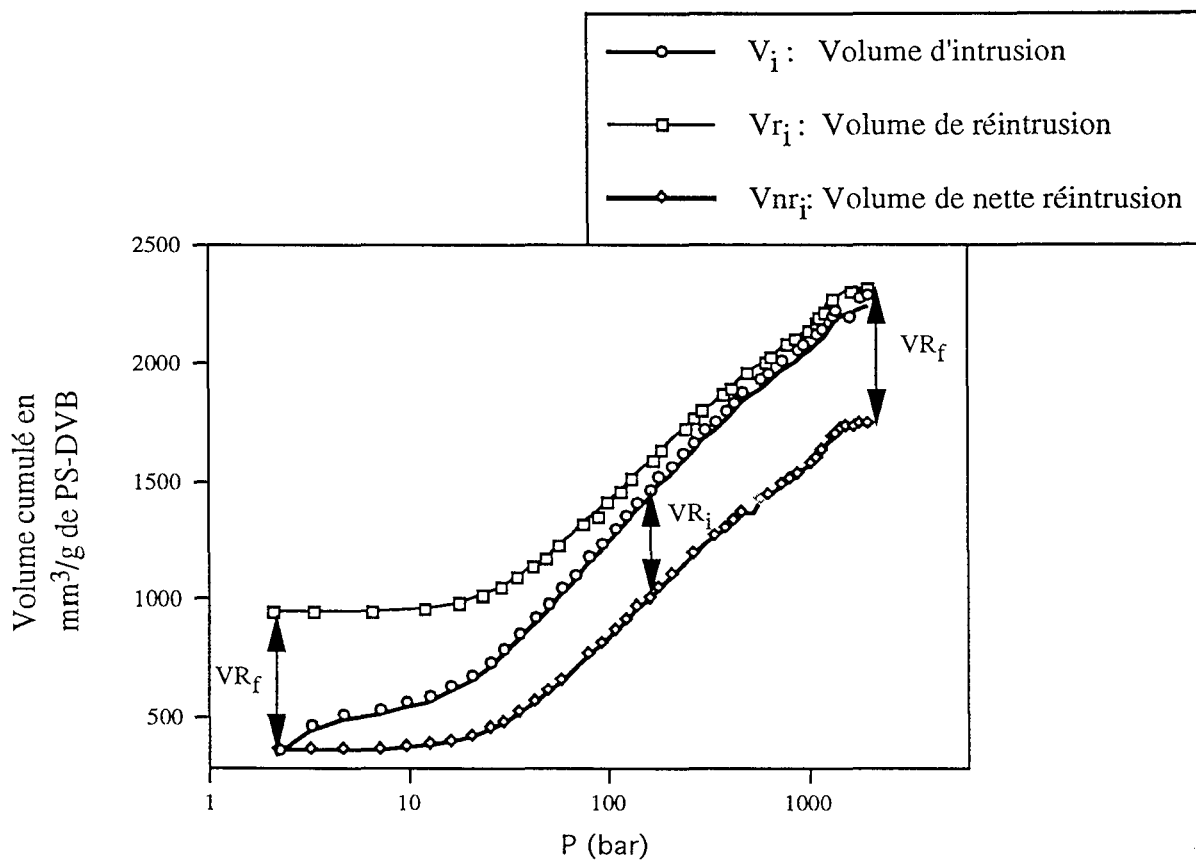


Figure V.8 : Courbes d'intrusion, de réintrusion et de nette réintrusion ($V_{nr_i} = V_{r_i} - VR_f$) obtenues par porosimétrie au mercure sur les particules de PS-DVB.

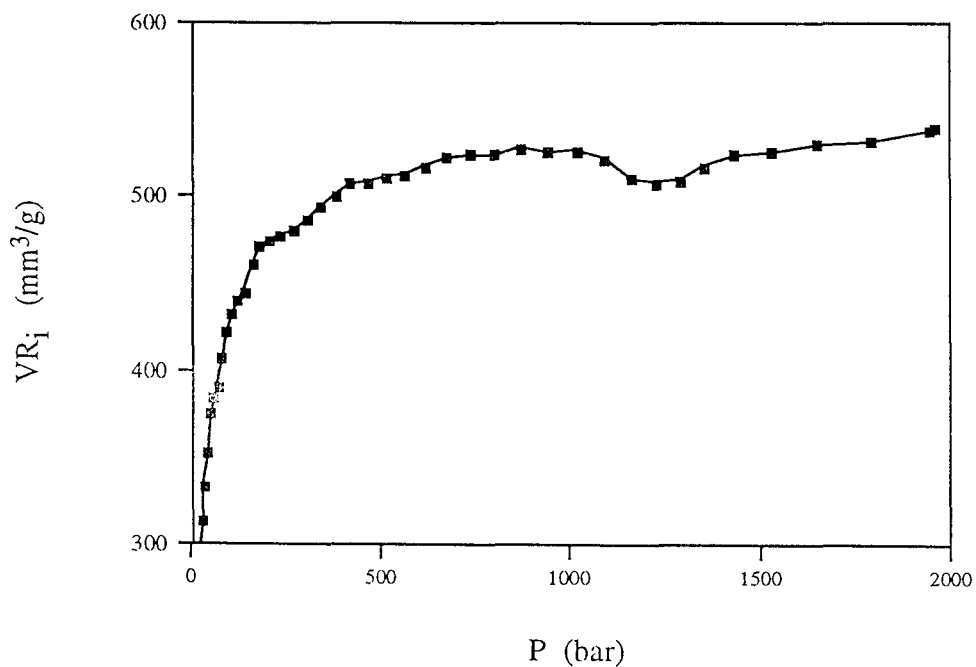


Figure V.9 : Tracé du volume de rétention VR_i en fonction de la pression de mercure appliquée P_i pour les particules de PS-DVB

Par commodité, on appelle :

V_i : Volume (cumulé) de mercure introduit dans les pores à la pression P_i , pendant la 1^{ère} intrusion

V_{ri} : Volume (cumulé) de mercure introduit dans les pores à la pression P_i , pendant la réinvasion

La théorie développée par Kloubek nécessite l'introduction de nouvelles grandeurs dont les définitions sont les suivantes (figure V.8) :

V_{Rf} : Volume de mercure piégé irréversiblement dans les pores, après expulsion

V_{nr_i} : Volume (cumulé) de la nette réinvasion obtenue par la différence $V_{ri} - V_{Rf}$

V_{R_i} : Volume (cumulé) de mercure piégé dans les pores de taille $R_p \geq R_{p_i}$ à une pression P_i donnée avec $V_{R_i} = V_i - V_{ri} + V_{Rf} = V_i - V_{nr_i}$

Le volume de la nette intrusion V_{nr_i} en fonction de la pression permet de rapporter la courbe expérimentale de réinvasion ($V_{ri} = f(P)$) à la même origine que celle correspondant à la première intrusion ($V_i = f(P)$), comme cela est représenté sur la figure V.8. Le volume V_{R_i} correspond à la différence entre V_{nr_i} et V_i quelle que soit la pression exercée.

D'après cet auteur, si la structure n'est pas dégradée au cours de l'expérience, V_{R_i} doit croître de façon logarithmique jusqu'à la valeur maximale V_{Rf} .

Le tracé de V_{R_i} en fonction de P pour les particules de PS-DVB est donné sur la figure V.9.

Aux faibles pressions ($P_i < 3-5$ bars), la variation importante de V_{R_i} est liée au réarrangement de l'empilement des particules et à leur propre compressibilité. A une pression de l'ordre de 1250 bars apparaît une cassure dans la courbe, correspondant à un dommage de la structure survenu pendant la 1^{ère} intrusion. Cette pression correspond pour une surface polystyrénique à un rayon de pores de 70 Å environ (d'après l'équation de Washburn [4]). De prime abord, il paraît surprenant que les particules de PS-DVB puissent résister jusqu'à cette pression élevée. Toutefois, l'invasion de mercure dans les structures poreuses s'effectue de façon homogène et les pressions de mercure sont exercées à l'intérieur même du matériau autant qu'à l'extérieur.

Par ailleurs, nous pouvons remarquer sur la figure V.7 que toutes les courbes de réinvasion sont superposables. Ceci indique qu'aucun changement de structure n'est apparu entre la 2^{ème} et 3^{ème} intrusion.

Enfin, tous les échantillons de PS-DVB modifiés ou non ont été analysés plusieurs fois. Les résultats obtenus se sont avérés parfaitement reproductibles.

**Influence de l'angle de contact θ et de la tension superficielle γ :*

Selon les matériaux, θ peut varier de 115 à 160°. La valeur de θ que nous avons choisi d'utiliser (130°) a été déterminée sur des échantillons de polystyrène. La présence de dextrane à la surface du polystyrène-divinylbenzène peut conduire à une modification de θ . Ainsi, une erreur de 10° sur l'angle de contact (140 au lieu de 130°) conduit à une sous-estimation de la

Echantillon	S_{BET}	S_{N_2}	S_{Hg}	S_{N_2+Hg}	S_{BET}	S_{N_2}	S_{Hg}	S_{N_2+Hg}
	m ² /g de support				m ² /g de PS-DVB			
PS-DVB	190	172	206	189	190	172	206	189
PS-DexPB $\Gamma_f = 1,60 \text{ mg/m}^2$	45	48	111 *98	84 *82	60	64	145	111

Tableau V.1 : Surfaces spécifiques mesurées par adsorption d'azote et porosimétrie au mercure pour deux supports à base de PS-DVB natif et modifié par adsorption à saturation de dextrane-phénoxy DexPB (0,56 mmol de phénoxy/g)

avec S_{BET} : Surface spécifique déterminée par la méthode BET

S_{N_2} : Surface spécifique calculée par adsorption d'azote pour $R_p > 10 \text{ \AA}$

S_{Hg} : Surface spécifique calculée par porosimétrie au mercure pour $R_p > 30 \text{ \AA}$ ($\theta = 130^\circ$, * pour $\theta = 140^\circ$)

$S_{N_2 + Hg}$: Surface spécifique calculée par combinaison de S_{N_2} ($10 < R_p < 200 \text{ \AA}$) et S_{Hg} ($R_p > 200 \text{ \AA}$)

taille des pores d'environ 20%. Une seconde erreur provient de l'estimation de γ . Mais cette erreur est faible en regard de celle liée à l'estimation de θ .

** Influence de la géométrie des pores :*

Dans tous les calculs qui sont effectués, nous avons considéré le modèle de pores cylindriques. Mais ce modèle ne reflète pas toujours la réalité.

De plus, les R_p peuvent être sous-estimés : un pore de taille R_p dont l'accès est restreint par un col de taille R_p' inférieure à R_p , se remplira à la pression $P' > P$ et donc le volume de mercure introduit sera alors attribué à un pore de taille R_p' et non de taille R_p .

2-4-1-3 Détermination des surfaces spécifiques, des volumes poreux et des distributions poreuses

** Surfaces spécifiques :*

- La surface spécifique est classiquement évaluée par la méthode BET qui fait appel à l'adsorption d'azote, elle est notée S_{BET} . Cette méthode donne un résultat exact car ne requiert aucune hypothèse quant à la géométrie des pores. Bien entendu, la surface mesurée dépend de l'accessibilité des pores à la molécule d'azote. Ainsi, les pores fermés ou ceux de taille inférieure à celle de l'azote (ultra-micropores) ne seront pas comptabilisés.

- D'autre part, la surface spécifique peut être calculée comme nous l'avons montré précédemment, à partir des distributions poreuses obtenues par adsorption d'azote (S_{N_2}) ou porosimétrie au mercure (S_{Hg}) en considérant un modèle de pores donné. Le modèle que nous avons utilisé est celui des pores cylindriques.

- Enfin, une surface S_{N_2+Hg} peut être calculée par combinaison de S_{N_2} pour les pores de rayons inférieurs à 200 Å et S_{Hg} pour les pores de rayons supérieurs.

Le tableau V.1 réunit les valeurs de diverses surfaces spécifiques pour deux échantillons (PS-DVB natif et modifié par adsorption à saturation d'un dextrane-phénoxy substitué à 0,56 mmol de phénoxy/g de polymère). Ces surfaces sont mesurées en m^2/g d'échantillon et peuvent être rapportées en m^2/g de PS-DVB (connaissant la quantité de dextrane adsorbée). Les résultats appellent un certain nombre de commentaires :

- Dans tous les cas, S_{N_2} est proche de S_{BET} , ce qui indique que le modèle de pores cylindriques est relativement adapté à l'étude de nos échantillons. Les pores de grande taille ne sont pas pris en compte dans le calcul de S_{N_2} . Néanmoins, la contribution de ces grands pores à la surface spécifique d'un échantillon est faible, d'où l'obtention de valeurs similaires à celles de S_{BET} .

Echantillon	V_p (Hg)	V_p (N ₂ +Hg)	V_p (Hg)	V_p (N ₂ +Hg)
	cm ³ /g de support		cm ³ /g de PS-DVB	
PS-DVB	1,90	1,65	1,90	1,65
PS-DexPB $\Gamma_f = 1,60 \text{ mg/m}^2$	1,17 *1,22	1,02	1,58	1,39

Tableau V.2 : Volumes poreux mesurés par adsorption d'azote et porosimétrie au mercure pour deux supports à base de PS-DVB natif et modifié par adsorption à saturation de dextrane-phénoxy DexPB (0,56 mmol de phénoxy/g), avec :

V_p (Hg) : Volume poreux mesuré par porosimétrie au mercure (rayons de pores $> 30 \text{ \AA}$, $\theta = 130^\circ$, * pour $\theta = 140^\circ$)

V_p (N₂ + Hg) : Volume poreux mesuré par combinaison de V_p (N₂) pour $10 < R_p < 200 \text{ \AA}$ et V_p (Hg) pour $R_p > 200 \text{ \AA}$

- La porosimétrie au mercure ne prend pas en considération les pores de rayons inférieurs à 30 Å. Les valeurs de S_{Hg} devraient être sous-estimées alors qu'elles sont nettement supérieures à celles de S_{BET} ou S_{N_2} . Ceci est particulièrement vrai dans le cas des supports modifiés.

Différentes erreurs peuvent être à l'origine de cette surestimation :

- une sous-estimation de la taille des pores, liée à une sous-estimation de l'angle de contact et/ou à la présence de pores dont l'accès est restreint (R_p mesuré < R_p réel),

- une destruction de la structure poreuse qui semble intervenir à une pression de mercure élevée (1250 bars) correspondant à un rayon poreux de 70 Å (cf. paragraphe 2.4.1.2).

- la surface S_{N_2+Hg} calculée à partir des courbes combinées d'adsorption d'azote et de porosimétrie au mercure est relativement proche de S_{BET} et S_{N_2} pour le PS-DVB natif. En ce qui concerne les supports modifiés, S_{N_2+Hg} est toujours supérieure à S_{BET} et S_{N_2} .

** Volume poreux :*

Le volume poreux d'un échantillon de PS-DVB natif ou modifié est déterminé par porosimétrie au mercure et par adsorption d'azote. La technique d'adsorption d'azote est restrictive car elle ne caractérise que la micro et mésoporosité. Le calcul du volume poreux total d'un échantillon est largement sous-estimé. En effet, la contribution des macropores dans le calcul du volume poreux total est considérable.

- V_{Hg} obtenu par porosimétrie au mercure donne la valeur réelle du volume poreux, si tant est que la résistance mécanique du matériau est suffisante pour supporter des pressions élevées.

- V_{N_2+Hg} est obtenu à partir des courbes combinées d'adsorption d'azote et d'intrusion de mercure. La contribution des pores de petite taille au volume poreux total de l'échantillon étant faible, la valeur de V_{N_2+Hg} devrait être très proche de celle de V_{Hg} . On peut cependant remarquer que dans tous les cas, V_{N_2+Hg} est inférieur à V_{Hg} (tableau V.2). Ainsi que nous l'avons précédemment souligné, cette différence peut être expliquée par une sous-estimation des rayons poreux (sous-estimation de θ ou présence de pores dont l'orifice est plus étroit que leur rayon), ce qui conduit donc à une surestimation du seuil de coupure entre l'adsorption d'azote et la porosimétrie au mercure.

** Distribution poreuse :*

Cette analyse repose sur les répartitions du volume poreux et de la surface spécifique d'un échantillon en fonction de la taille des pores. Compte-tenu des limites imposées par chacune des deux méthodes porosimétriques utilisées, la répartition des pores sera discutée à partir des distributions poreuses combinées (seuil de coupure fixé à 200 Å). Elle sera présentée soit par une courbe reliant le volume poreux cumulé ($\sum Vp_i$) en fonction des rayons de pores Rp_i soit sous forme d'histogrammes représentant les volumes poreux partiels de diverses classes de pores.

2-4-2 Résultats et discussion

De nombreux échantillons de particules de PS-DVB ont été préparés pour cette étude. Nous aborderons ainsi l'influence du taux de recouvrement des particules, l'effet de la réticulation et l'influence du taux de groupements phénoxy du polymère adsorbé sur leurs caractéristiques structurales.

2-4-2-1 Influence du taux de recouvrement des particules

Le tableau V.3 reprend les surfaces spécifiques significatives, les volumes poreux et les rayons moyens de particules de PS-DVB recouvertes de dextrane-phénoxy (0,56 mmol/g) à divers taux de recouvrement. La couche de dextrane n'est pas réticulée.

Support	Γ (mg/m ²)	SBET	S _{N₂+Hg}	V _{N₂+Hg}	V _{Hg}	SBET	S _{N₂+Hg}	V _{N₂+Hg}	V _{Hg}	Rp50 (Å)
		par g de support				par g de PS-DVB				
PS-DVB	0	190	189	1,65	1,90	190	189	1,65	1,90	610
PS-DexPB	0,65	131	147	1,17	1,43	149	166	1,32	1,62	465
	1,10	70	103	0,94	1,13	84	126	1,15	1,37	310
	1,78	58	101	1,03	1,16	79	138	1,39	1,57	290

Tableau V.3 : Influence du taux de recouvrement des particules de PS-DVB sur leurs caractéristiques structurales à l'état sec. Les particules sont recouvertes de DexPB à 0,56 mmol de phénoxy/g de polymère. Les surfaces sont exprimées en m²/g et les volumes en cm³/g.

Les répartitions respectives des volumes poreux et des surfaces cumulées en fonction de la taille des pores sont représentées par les figures V.10 (a) et (b). Le volume poreux correspondant à chaque classe de pores est donné sur la figure V.11. Les résultats que nous discuterons sont ceux exprimés par g de PS-DVB.

Pour les deux premiers échantillons ($\Gamma = 0,65$ et $1,10$ mg/m² de PS-DVB), la réduction du volume poreux est supérieure au volume occupé par le polymère (respectivement 0,10 et 0,15 cm³/g de PS-DVB), calculé d'après la densité du dextrane mesurée au pycnomètre à hélium ($d = 1,15$). Nous avons montré par RPE (chapitre IV.3) que le dextrane adopte aux faibles valeurs de Γ une conformation très aplatie à la surface du polystyrène. De ce fait, il est possible que le dextrane en s'étalant à la surface, vienne masquer l'entrée de certains pores, d'où une réduction importante de V_p .

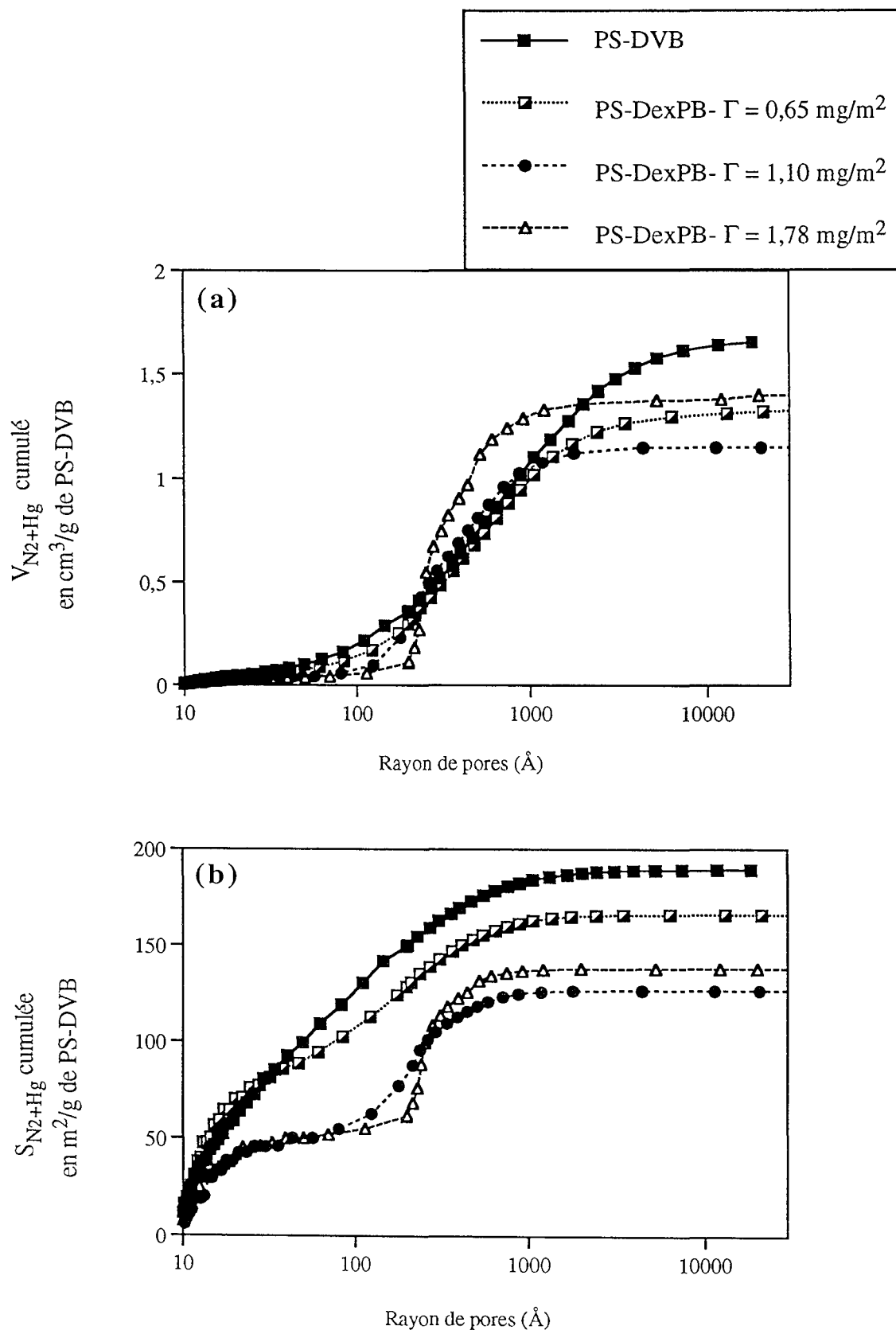
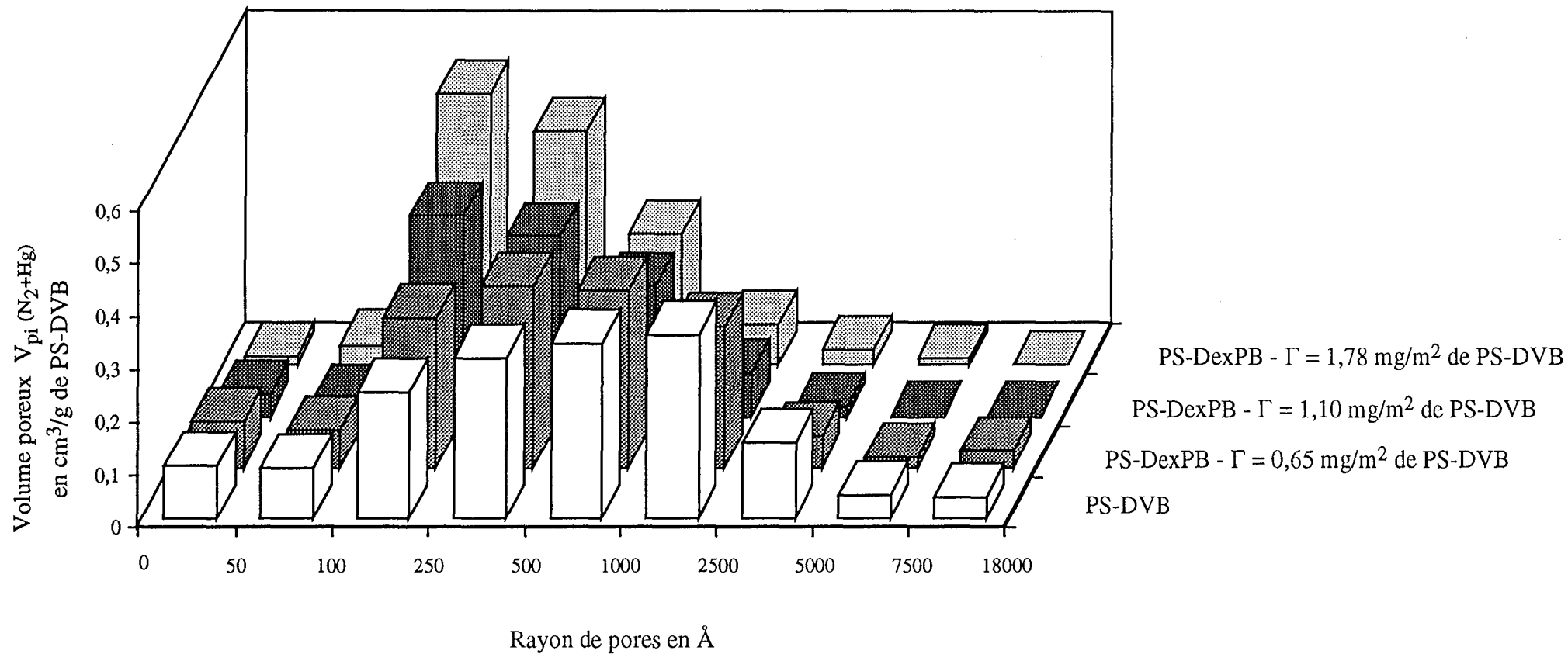


Figure V.10 : Influence du taux de recouvrement des particules de PS-DVB sur leurs distributions poreuses cumulées en volume (a) et en surface (b). Les particules sont recouvertes de dextrane DexPB à 0,56 mmol de phénoxy/g de polymère



148

Figure V.11 : Répartition selon la classe des pores des volumes poreux partiels en fonction du taux de recouvrement des particules.

Les particules sont recouvertes de dextrane-phénoxy DexPB à 0,56 mmol de phénoxy/g de polymère.

Lorsque le taux de recouvrement maximal est atteint ($\Gamma = 1,80 \text{ mg/m}^2$ de PS-DVB), le volume poreux réaugmente légèrement. La diminution de V_p est cette fois, comparable au volume occupé par le dextrane. D'après l'étude réalisée en RPE, le dextrane est relativement plus déployé en solution à Γ_{pl} qu'à des taux de recouvrement inférieurs. On peut alors supposer qu'il pénètre plus facilement à l'intérieur des pores et s'y répartit de façon plus homogène, sans se limiter à en masquer l'entrée. Quand le taux de recouvrement Γ des particules augmente, on note tout d'abord une baisse importante du volume poreux, liée essentiellement à la réduction des macropores de rayons supérieurs à 1000 \AA . Le nombre de pores de rayon inférieur à 200 \AA tend également à diminuer progressivement, d'où la diminution de surface spécifique observée.

Les diminutions du volume et de la surface spécifique des pores de faible dimension, liées à l'augmentation de Γ , sont des phénomènes que l'on peut donc expliquer par l'adsorption de polymère à la surface du polystyrène et par le remplissage et/ou le masquage des pores de dimensions comparables à celles des molécules de dextrane.

La diminution importante du volume des macropores est un phénomène plus difficile à interpréter. Nous proposons l'hypothèse suivante : lorsque les particules de PS-DVB sont mises en contact avec la solution de dextrane, une partie du polymère s'adsorbe physiquement à la surface. Cette fraction adsorbée est déterminée à partir de la variation de composition du surnageant. Par ailleurs, le surnageant est en équilibre avec la solution stagnant à l'intérieur des pores. Après lavage des particules, une partie du polymère présent à l'intérieur des pores peut rester piégée en raison des interactions établies entre les groupes phénoxy. Il y aurait donc formation à l'intérieur des pores d'un réseau peu dense constitué de chaînes de dextrane enchevêtrées et associées. La porosité se trouve alors centrée autour de 300 \AA avec une forte augmentation du volume de ces pores. La quantité de polymère qui peut être piégée dans les pores est cependant très faible devant la quantité de polymère adsorbée, ce qui explique pourquoi les valeurs de Γ_{IR} (déterminées après lavage et séchage) et Γ_{UV} (obtenues par la méthode du surnageant) ne sont pas significativement différentes.

2-4-2-2 Influence de la stabilisation de la couche adsorbée:

Des particules de PS-DVB ont été recouvertes de dextrane-phénoxy à taux élevé en groupes hydrophobes ($0,56 \text{ mmol}$ de phénoxy/g de polymère), adsorbé à saturation. La couche de dextrane adsorbée a été stabilisée par réticulation chimique à l'épichlorhydrine à $0,6 \text{ M}$ suivie d'un traitement au sulfate de dodécyle de sodium uniquement pour l'échantillon appelé PS-DexPB-stabilisé. Le tableau V.4 reprend les caractéristiques de porosité des divers échantillons

Support	Polymère adsorbé			S _{BET}	V _P (Hg)	V _P (N ₂ +Hg)	S _{BET}	S (N ₂ +Hg)	V _P (Hg)	V _P (N ₂ +Hg)	R _{P50} (N ₂ +Hg) (Å)
	Taux de phénoxy (mmol/g)	\overline{M}_p (g/mol)	Γ_f (mg/m ²)	exprimé par g de support			exprimé par g de PS-DVB				
PS-DVB	—	—	—	190	1,90	1,65	190	189	1,90	1,65	620
PS-DexPC ₁	0,05	24 400	2,00	78	1,42	1,15	109	130	1,98	1,61	420
PS-DexPC ₂	0,06	36 600	2,01	82	1,42	1,16	115	132	2,01	1,63	430
PS-DexPA ₂	0,12	12 000	1,97	80	1,43	1,15	112	145	2,15	1,60	470
PS-DexPA ₃	0,10	22 000	2,05	80	1,41	1,12	113	134	1,95	1,58	460
PS-DexPB ₂	0,56	29 150	1,60	46	1,17	1,02	60	111	1,55	1,39	285
PS-DexPB ₃	0,51	36 800	1,63	47	1,19	1,03	63	111	1,58	1,36	280

Tableau V.5 : Influence du taux de phénoxy des dextrans adsorbés puis réticulés à la surface des particules de PS-DVB sur leurs caractéristiques structurales.

Support	SBET m ² /g de PS-DVB	SN ₂ +Hg m ² /g de PS-DVB	VN ₂ +Hg cm ³ /g de PS-DVB	VHg cm ³ /g de PS-DVB
PS-DexPB Γ = 1,80 mg/m ²	79	138	1,39	1,57
PS-DexPB-stabilisé Γ _f = 1,60 mg/m ²	61	106	1,34	1,54

Tableau V.4 : Influence de la réticulation du dextrane sur les caractéristiques structurales des particules

Globalement, les caractéristiques des échantillons sont peu modifiées par le traitement de la couche adsorbée. On notera une légère baisse de la surface BET lorsque le dextrane est réticulé, vraisemblablement liée à l'élimination partielle de dextrane lors de la réticulation chimique de la couche adsorbée.

2-4-2-3 Influence du taux de groupements phénoxy

Divers dextrans-phénoxy variant par leurs caractéristiques physico-chimiques ($\overline{M_p}$, taux de phénoxy) ont été adsorbés à saturation et réticulés à la surface des particules de PS-DVB. Le tableau V.5 compare les caractéristiques structurales de ces divers matériaux.

D'après les valeurs caractéristiques inscrites dans le tableau V.5, les billes de PS-DVB modifiées sont classées en deux catégories bien distinctes :

- La première catégorie regroupe les supports PS-DexPC et PS-DexPA préparés par adsorption de dextrans à faibles taux de groupements phénoxy (< 0,14 mmol/g). Ces supports présentent les mêmes caractéristiques de porosité à savoir une surface spécifique BET de 110 ± 10 m²/g de PS-DVB, un volume poreux de l'ordre de $2,00 \pm 0,10$ cm³/g de PS-DVB et un rayon de pores moyen situé autour de 450 ± 30 Å. Les caractéristiques de porosité de ces divers supports étant équivalentes, seules les distributions poreuses de l'un d'entre eux seront présentées.
- L'adsorption à saturation d'un dextrane à fort taux de groupes phénoxy, indifféremment DexPB₂ (0,56 mmol de phénoxy/g) ou DexPB₃ (0,51 mmol de phénoxy/g), conduit à l'obtention de la seconde catégorie de supports modifiés. La surface spécifique BET des supports PS-DexPB est de 60 m²/g de PS-DVB et leur volume poreux associé est égal à 1,6 cm³/g de PS-DVB.

Les caractéristiques des supports dépendent donc exclusivement du taux de substitution en groupes phénoxy du polymère adsorbé et non de sa masse moléculaire moyenne. Les figures V.12 (a) et (b) comparent respectivement les distributions poreuses en volume et en surface de particules natives et hydrophilisées. Des courbes de distributions poreuses théoriques sont également tracées sur la figure V.12 et seront commentées plus loin. La distribution du volume en fonction de chaque classe de pore est représentée sur la figure V.13.

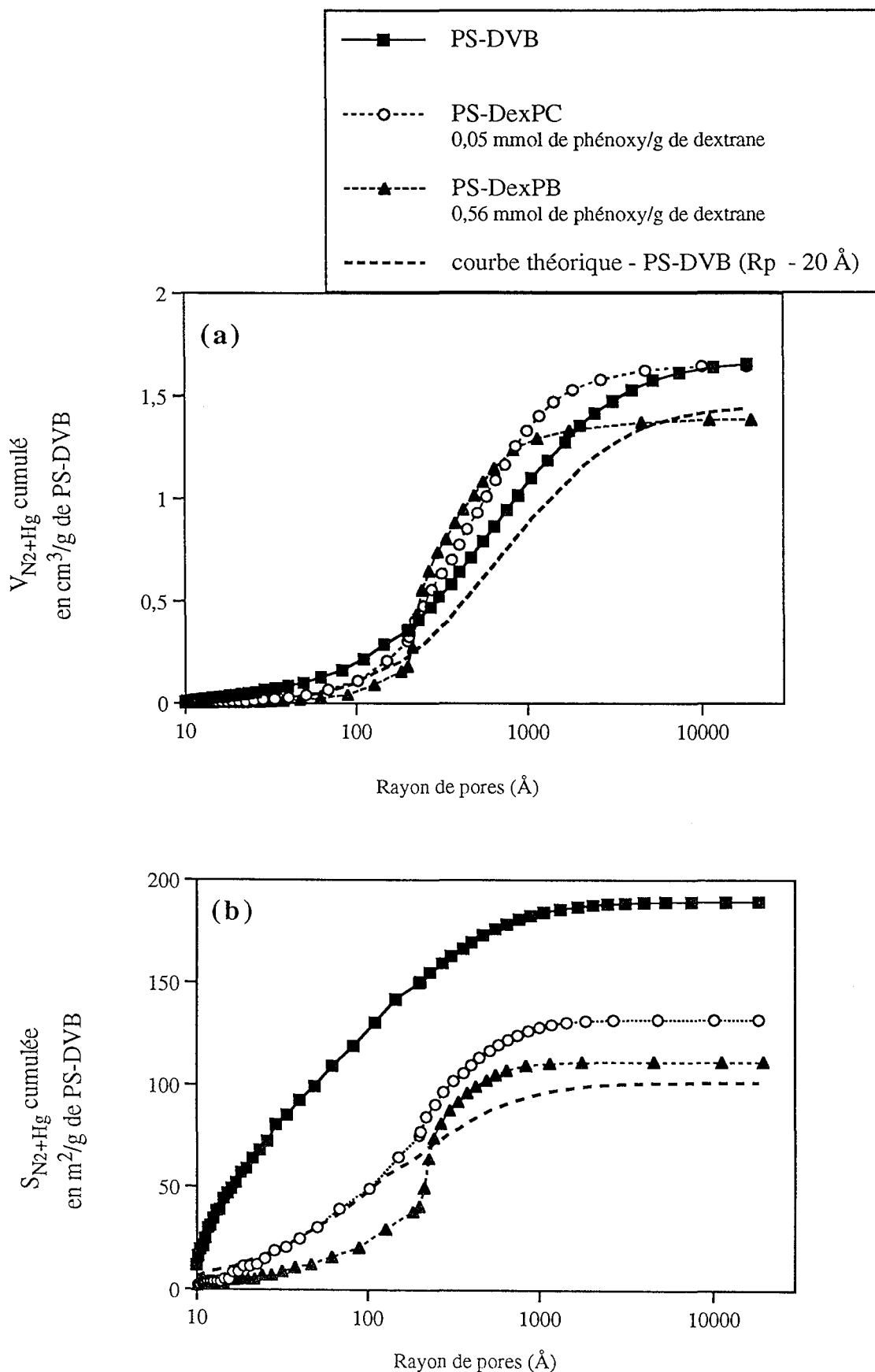


Figure V.12 : Variation des distributions poreuses cumulées en volume (a) et en surface (b) en fonction du taux de substitution en groupes phénoxy des polymères adsorbés. Les dextrans sont adsorbés à saturation sur les particules de PS-DVB.

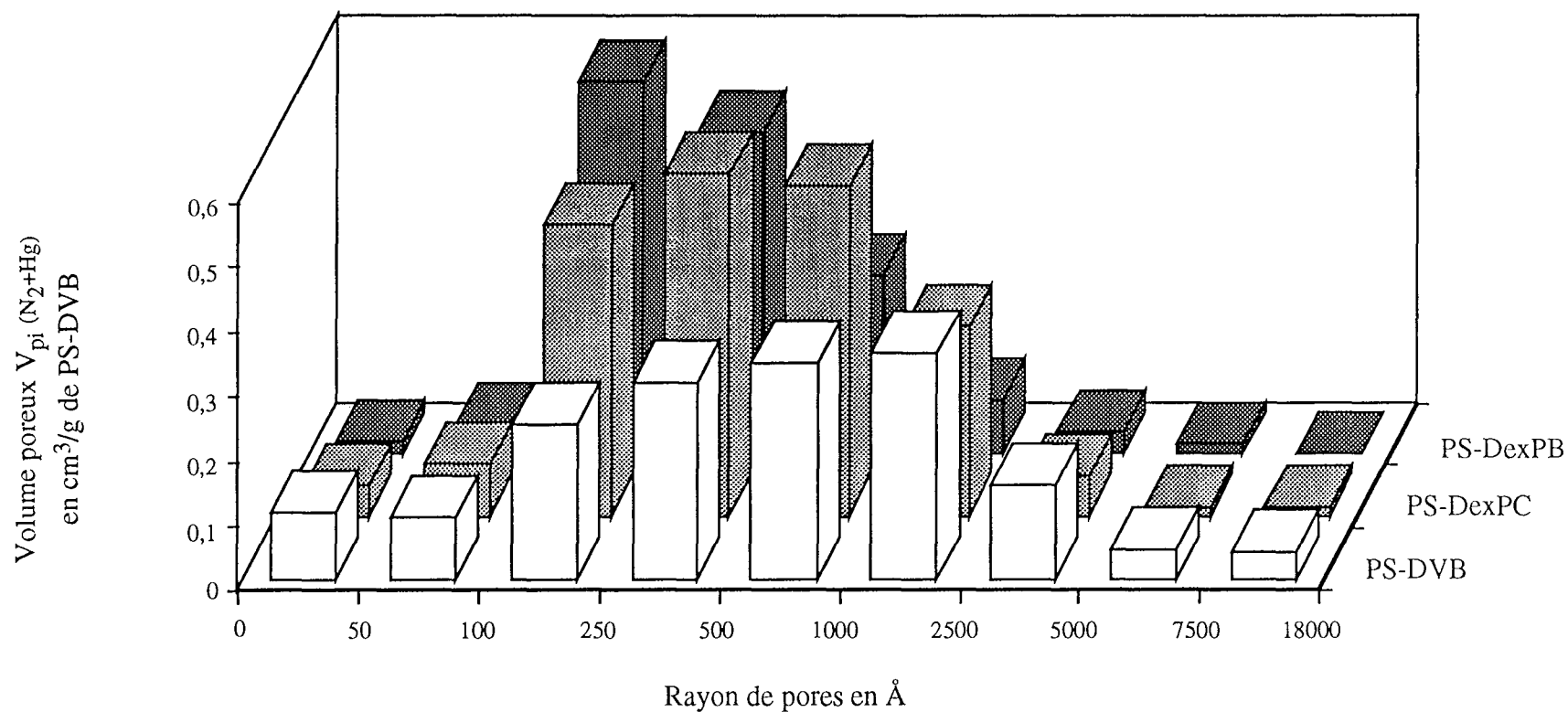
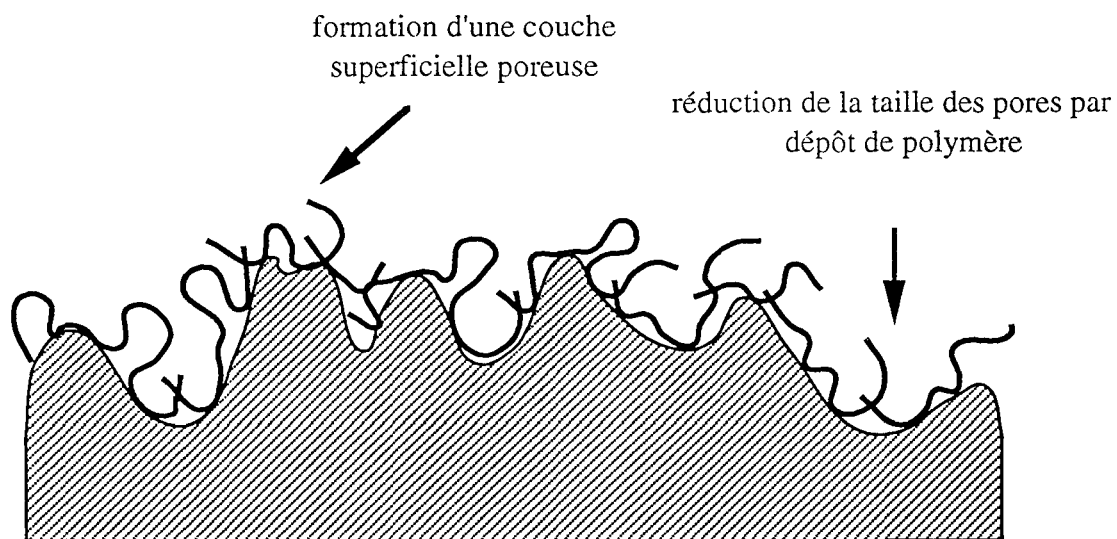
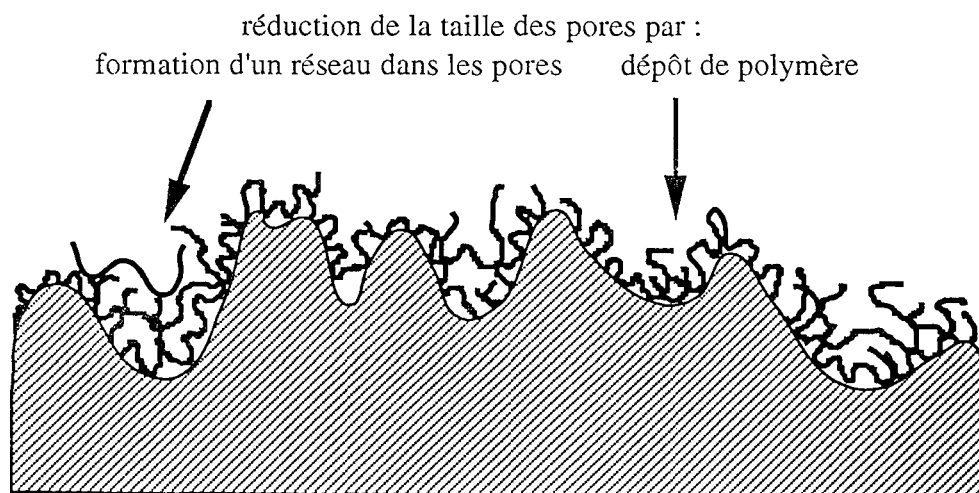


Figure V.13 : Variation de la distribution poreuse en volume en fonction du taux de substitution en groupes phénoxy du polymère adsorbé. Les particules sont recouvertes de dextrans-phénoxy adsorbés à saturation sur le polystyrène avec DexPC à 0,05 mmol de phénoxy/g de dextrane et DexPB à 0,56 mmol de phénoxy/g de polymère.



PS-DexPA ou PS-DexPC



PS-DexPB

Figure V.14: Représentation schématique de la couche de polymère formée à la surface du polystyrène en fonction du taux en groupements phénoxy du dextrane.

D'une manière générale, les phénomènes observés sont les suivants :

- Les courbes relatives au PS-DVB natif montrent une très grande polydispersité de taille des pores entre 10 et 20 000 Å. Après recouvrement des billes, un rétrécissement de la distribution poreuse est observé. Celle-ci devient d'autant plus étroite que le polymère adsorbé est riche en groupes phénoxy.
- Les particules recouvertes ont une surface spécifique diminuée par rapport à celle du polystyrène nu. Cette diminution s'explique comme précédemment par la réduction des micropores et mésopores de rayon inférieur à 100 Å. Parallèlement, le volume poreux associé à ces pores de faible dimension n'est que peu modifié.
- Entre 200 et 1000 Å, les variations du volume poreux et de la surface spécifique des divers supports modifiés sont relativement peu différentes les unes des autres (figure V.12).
- Une disparition des pores de rayons supérieurs à 1000 Å est observée sur les supports recouverts de dextrane, et ce, d'autant plus que le polymère est riche en groupes phénoxy.

Les différences les plus significatives obtenues entre les supports PS-DexPB (fort taux de phénoxy) et PS-DexPC (faible taux de phénoxy) (ou PS-DexPA) peuvent être résumées de la façon suivante :

- Le volume poreux (V_p) correspondant aux particules recouvertes de DexPB (exprimé en cm^3/g de PS-DVB) est inférieur au volume du polystyrène natif. Après recouvrement, la variation ΔV_p calculée est égale à $0,3 \text{ cm}^3/\text{g}$ de PS-DVB, ce qui correspond approximativement au volume de dextrane déposé sur les billes. Ceci implique que le dextrane soit essentiellement localisé à l'intérieur des pores, ce qui corrobore les hypothèses émises dans le paragraphe 2.4.2.1.
- Le volume poreux (cm^3/g de PS-DVB) correspondant aux particules de PS-DexPC est équivalent voire légèrement supérieur à celui du polystyrène natif. Par ailleurs, la proportion des macropores ($R_p > 500\text{-}1000 \text{ Å}$) qui disparaissent est moins importante que pour les supports PS-DexPB à taux de recouvrement identiques.

De toute évidence, la façon dont le polymère se distribue à la surface des particules diffère selon la teneur du polymère en groupes phénoxy. Ces différences sont représentées schématiquement sur la figure V.14. Les dextrans les plus faiblement substitués en groupes aromatiques (DexPC ou DexPA) forment une couche superficielle moins dense que les dextrans DexPB. Les chaînes de dextrane sont plus étendues en solution et génèrent à la surface du matériau une porosité nouvelle. Les interactions phénoxy-phénoxy qui s'établissent entre les chaînes de polymère sont peu nombreuses quand le taux de groupes phénoxy est faible. De ce fait, si un réseau tridimensionnel se crée à l'intérieur des pores, il est vraisemblablement plus lâche. Globalement, la taille moyenne des pores est inférieure dans le cas du PS-DexPB que dans le cas du support PS-DexPC (ou PS-DexPA).

Les distributions poreuses des particules (figures V.12 a et b) sont comparées à une courbe

théorique obtenue en retranchant 20 Å aux rayons de pores du polystyrène, 20 Å correspondant à l'épaisseur calculée de la couche de dextrane déposée. Celle-ci est déterminée à partir du volume occupé par le dextrane rapporté à la surface accessible aux molécules de dextrans. Les distributions théoriques diffèrent des distributions expérimentales. La comparaison de ces courbes montre bien que le dextrane n'est pas déposé sous forme d'une couche homogène à la surface du polystyrène et ce, quel que soit son contenu en groupes phénoxy. Ceci vient corroborer les hypothèses déjà émises.

A ce stade de la discussion, connaissant les caractéristiques structurales à l'état sec de chacun des supports, nous avons calculé la surface spécifique accessible à l'albumine (BSA) selon la composition des supports.

Cette protéine est assimilée à un bâtonnet rigide dont la longueur vaut 140 Å et le diamètre 38 Å. Le tableau V.6 compare les surfaces accessibles à la BSA sur chaque catégorie de support, en fonction également des orientations possibles de la protéine sur les particules. Les valeurs généralement admises dans la littérature, concernant l'adsorption de l'albumine sur une surface, sont respectivement 2,5 mg/m² si la protéine s'adsorbe par son grand coté (side-on) et 6-8 mg/m² si elle s'adsorbe par sa base (end-on).

Support	Adsorption SIDE-ON		Adsorption END-ON	
	S _{acc.} (m ² /g de PS-DVB)	Q (mg/g de PS-DVB)	S _{acc.} (m ² /g de PS-DVB)	Q (mg/g de PS-DVB)
PS-DVB	80	200	130	910
PS-DexPC (0,06 mmol de phénoxy/g)	90	225	120	840
PS-DexPA (0,10 mmol de phénoxy/g)				
PS-DexPB (0,56 mmol de phénoxy/g)	90	225	105	735

Tableau V.6: Surfaces accessibles (S_{acc.}) à l'albumine sur divers supports à taux de recouvrement maximal (valeurs calculées à partir des courbes $S_{N_2} + S_{Hg} = f(Rp)$). La valeur Q représente la quantité maximale de BSA pouvant s'adsorber sur les supports selon le modèle choisi.

Tous les supports modifiés possèdent des surfaces accessibles à la BSA équivalentes à celles des particules natives. Ainsi, la réduction de l'adsorption non-spécifique de la BSA (évoquée dans le chapitre IV.2) sur ces supports est due exclusivement à la modification du caractère hydrophobe des billes de PS-DVB. En particulier, la suppression totale des interactions non-spécifiques de l'albumine avec les supports PS-DexPB est liée au caractère hydrophile et imperméable de la couche de polymère déposée. Nous pouvons remarquer que la quantité maximale d'albumine adsorbée sur les particules de PS-DVB a été trouvée expérimentalement égale à 214 mg/m² de PS-DVB à pH 7. On peut donc penser, en toute logique, que cette protéine s'adsorbe essentiellement par son grand coté (side-on).

3 - POROSITÉ DES PARTICULES À L'ÉTAT SOLVATÉ

La structure poreuse est un des facteurs-clé intervenant dans un processus chromatographique. Ainsi, les particules de PS-DVB natives et modifiées ont été analysées à l'état sec par adsorption d'azote et porosimétrie au mercure. Cette étude nous a permis de comprendre comment le dextrane se répartit à la surface du polystyrène mais ne reflète pas le comportement des matériaux dans leurs conditions réelles d'utilisation.

La porosité d'un lit de particules s'étudie à l'état solvate par chromatographie d'exclusion stérique de solutés-étalons, les particules à analyser constituant la phase stationnaire (9, 10, 11, 12, 13). Les méthodes chromatographiques, présentées ci-après, ont l'avantage d'être facilement accessibles et ne requièrent qu'un appareillage de CLHP. De plus, elles sont particulièrement adaptées à l'étude de particules destinées elles-mêmes à la chromatographie.

3-1 DÉTERMINATION DE LA POROSITÉ PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STÉRIQUE : RAPPELS THÉORIQUES

A partir d'une courbe de calibration de solutés-étalons (de faibles polymolécularité et dont la forme peut être assimilée à une sphère rigide) en chromatographie d'exclusion stérique, il est possible d'estimer le rayon poreux moyen de la phase stationnaire. Ces courbes sont obtenues en portant la masse moléculaire moyenne des solutés-étalons ou leur rayon hydrodynamique en fonction du coefficient de distribution K défini par l'équation : $K = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$ avec V_e : volume d'élution d'un standard de masse moléculaire moyenne M_{pi} et de rayon

hydrodynamique r_i

V_0 : volume d'exclusion de la colonne

V_t : volume de perméation totale de la colonne

V_p : volume poreux de la phase stationnaire évaluée par la différence $V_t - V_0$.

Les rayons poreux peuvent être évalués par diverses méthodes que nous allons décrire ci-dessous :

- **1^{ère} méthode** : en première approche, on considère que la porosité du support peut être représentée par une seule taille de pore de rayon R_p . Le coefficient de distribution d'un soluté de rayon r_i est alors décrit par l'équation (13) :

$$K = \left(1 - \frac{r_i}{R_p}\right)^\lambda \quad [5]$$

λ étant un facteur de forme associé à une géométrie donnée de pores. λ vaut 2 dans le modèle de pores cylindriques et 3 pour les pores sphériques.

Si le tracé de $K^{1/2} = f(r_i)$ donne une droite, les pores sont alors assimilables à des cylindres. L'inverse de la pente de la droite donne accès à la valeur de R_p , qui représente en quelque sorte le rayon moyen permettant de modéliser au mieux le comportement chromatographique du support.

- La 2^{ème} méthode est celle décrite par Halasz et Martin (14). Dans cette méthode, plusieurs classes de pores de rayon R_{p_i} sont considérées. La courbe de calibration $K = f(\log r_i)$ est convertie en une courbe $K = f(\log R_{p_i})$ avec $R_{p_i} = \alpha r_i$. α est appelé facteur de Halasz et la valeur moyenne généralement utilisée est 2,5. Ainsi $R_{p_{50}}$ (rayon poreux à mi-volume) est égal à 2,5 fois le rayon hydrodynamique r_i du soluté dont le coefficient de distribution est égal à 0,5.

- Enfin, la 3^{ème} méthode établit une relation mathématique entre la distribution poreuse et la courbe de calibration d'un matériau poreux. Cette méthode a été développée par Knox et Scott (15). La modélisation de Knox et coll. repose sur les hypothèses suivantes :

- les solutés-étalons sont assimilées à des sphères de rayons r_i
- l'éluant est un bon solvant des polymères-standard pour éviter tout mécanisme de séparation autre que l'exclusion stérique.
- pour une population de pores cylindriques monodispersés (R_p), le coefficient de distribution K s'exprime par $K(r_i) = \left(1 - \frac{r_i}{R_p}\right)^2$ [5]
- pour un ensemble de pores, $K(r_i) = \sum_{R_{p_i} = r_i}^{\infty} \left(1 - \frac{r_i}{R_{p_i}}\right)^2 F(R_{p_i})$ [6]

où $F(R_{p_i})$ est la fraction volumique des pores de rayons R_{p_i}

A l'aide d'un programme informatique, les rayons poreux R_{p_i} sont calculés afin d'obtenir une courbe modélisée $K(r_i) = f(\log r_i)$ qui coïncide le plus fidèlement possible à la courbe expérimentale obtenue. Puis la courbe de distribution cumulée en volume des pores $G(R_i) = f(\log R_i)$ est établie d'après la relation $G(R_i) = \sum_{R_i = 0}^{R_i} F(R_i)$. Le rayon poreux moyen à mi-volume $R_{p_{50}}$ est obtenu pour $G(R_i) = 0,5$. Ce programme (appelé Dispores) a été établi par R. Clément (LCPM), à partir d'un diagramme décrit dans la littérature (16).

3-2 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX

3-2-1 Appareillage

Le système de Chromatographie Liquide Haute Performance utilisé pour notre étude est constitué par :

- une pompe Merck 655-A1LC (Merck),
- une vanne d'injection à 6 voies de modèle Rheodyne 7125 (Cotati, États-Unis) équipée d'une boucle d'injection de 20 μ L,
- un détecteur UV-Vis Merck à longueur d'onde variable de modèle L-4200 (Darmstadt, Allemagne) ou un détecteur réfractométrique Waters de référence R401,
- un intégrateur Spectraphysics RP-4400,
- une colonne en acier inox (250 x 4,6 mm de diamètre interne).
- le débit des éluions est fixé à 0,4 mL/min (150 cm/h) quelque soit l'éluant et a été soigneusement contrôlé durant les éluions, soit par empotage, soit par injection d'un étalon interne.

3-2-2 Remplissage des colonnes

Les particules de PS-DVB natives et modifiées présentent des mouillabilités différentes à l'eau. Pour cette raison, des essais de remplissage des colonnes de PS-DVB non modifié ont été réalisés soit dans l'eau après imprégnation du polystyrène au méthanol soit dans un mélange eau/méthanol (80/20 %V/V). Les caractéristiques chromatographiques obtenues sont identiques. Finalement, le remplissage des colonnes a été effectué sur le système CLHP à débit constant (0,6 mL/min) pendant 2 heures à partir des particules solvatées, mises en suspension dans l'eau et introduites dans une buse de remplissage. Une fois remplies (\approx 800 mg de poids sec en équivalent de PS-DVB), les colonnes sont conditionnées à 0,4 mL en milieu aqueux pendant plusieurs heures.

3-2-3 Les courbes d'étalonnage

Les supports natifs et modifiés ont été caractérisés dans divers milieux aqueux, organiques ou mixtes.

3-2-3-1 Milieu organique

L'utilisation de tétrahydrofurane (THF) comme phase mobile et l'injection de polystyrène-étalons sont préconisées pour caractériser la porosité des particules d'origine polystyrénique (12). Les standards utilisés dans notre cas sont commercialisés par Soparès (Gentilly, France). Leurs principales caractéristiques sont données dans le tableau V.7. Les solutés injectés (20 µL) sont concentrés à 2 g/L et détectés à 254 nm. Le volume de perméation totale est évalué par le volume d'éluion du toluène.

Standards	\overline{M}_p (g/mol)	Indice de polymolécularité I_p
PS-2000	2 000 000	≤ 1,30
PS-900	900 000	≤ 1,06
PS-700	705 000	1,03
PS-500	498 000	≤ 1,20
PS-400	390 000	≤ 1,10
PS-200	200 000	≤ 1,05
PS-80	80 700	1,02
PS-50	54 000	1,03
PS-10	10 250	1,06
PS-4	4 000	≤ 1,06
PS-1	1 100	1,10
PS-0,5	520	1,11

Tableau V.7 : Caractéristiques des standards de polystyrène utilisés

Les dimensions des polystyrènes en solution dans le THF sont reliés à leur masse molaire moyenne en poids par la relation suivante [7] d'après (17) :

$$r_i = 0,123 \overline{M}_p^{0,588} \quad [7]$$

Cette relation suppose que les pelotes macromoléculaires sont quasiment assimilées à des sphères rigides de rayons hydrodynamiques r_i ($r_i = 0,886 < Rg^2 >_n^{1/2}$).

3-2-3-2 Milieux aqueux ou mixte

En milieux aqueux (phosphate) ou mixte (eau/méthanol 80/20 % V/V), les solutés étalons préconisés sont les standards de pullulanes (13, 18), très solubles dans l'eau, d'une large gamme de masses moléculaires et de très faibles indices de polymolécularité. Les pullulanes étalons que nous avons utilisés sont concentrés à 2 g/L et détectés par réfractométrie. Le volume de perméation totale de la colonne est évalué par l'injection de méthanol.

Ces étalons proviennent d'un kit commercialisé par Soparès (Gentilly, France). Leurs caractéristiques sont décrites dans le tableau V.8.

Standards	\overline{M}_p (g/mol)	Indice de polymolécularité I_p
T 2 000	$\approx 2\,000\,000$	ND
P 1 600	1 660 000	1,19
P 800	853 000	1,15
P 400	380 000	1,12
P 200	186 000	1,13
P 100	100 000	1,10
P 50	48 000	1,09
P 20	23 700	1,07
P 10	12 000	1,06
P 5	5 800	1,07

Tableau V.8 : Caractéristiques des standards de pullulanes utilisés (à l'exception du T 2 000, dextrane de $\overline{M}_p \approx 2\,000\,000$ kg/mol commercialisé par Pharmacia)

Pour ces standards en milieu aqueux, la dimension utilisée est le rayon hydrodynamique, calculé par la relation suivante [8] d'après (13) :

$$r_i = 0,163 \overline{M}_p^{0,551} \quad (\text{avec } r_i = 0,883 < Rg^2 >_n^{1/2}) \quad [8]$$

3-2-4 Conditions opératoires

En pratique, toutes les colonnes ont été testées par :

- chromatographie d'exclusion stérique (pullulanes) en tampon phosphate à 0,05 M, pH 7
- chromatographie d'exclusion stérique (pullulanes) dans un mélange eau-méthanol (Prolabo, grade HPLC) dans les proportions 80/20 % V/V
- chromatographie d'exclusion stérique (polystyrènes) en THF.

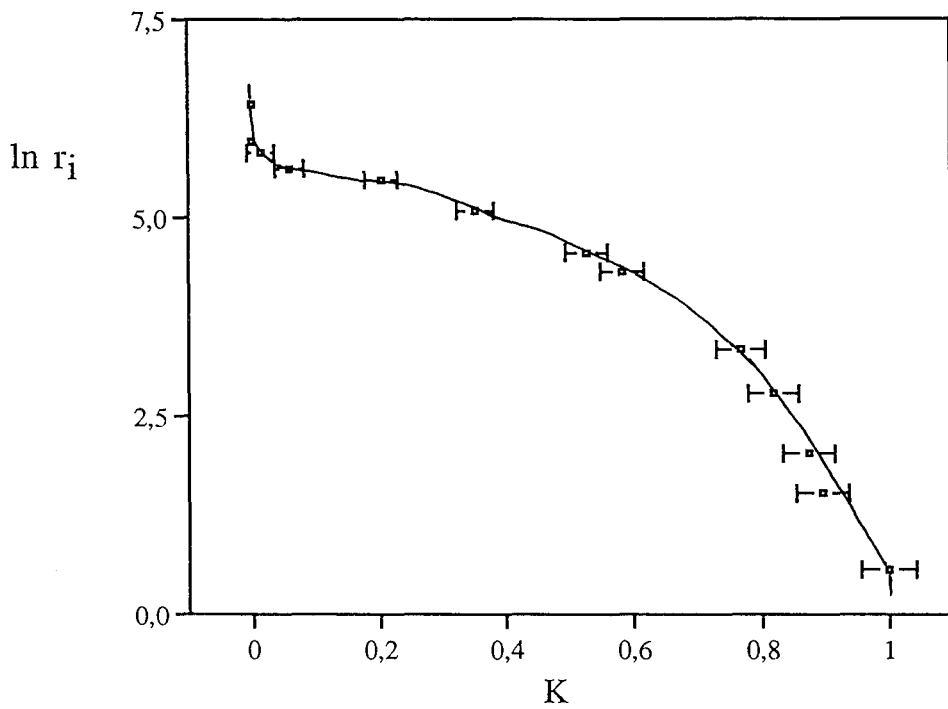


Figure V.15 : Détermination des coefficients de distribution K et des incertitudes pour les particules de PS-DVB natif dans le tétrahydrofurane à partir de standards de polystyrènes.

Après diverses calibrations, les colonnes sont lavées, reconditionnées en milieu aqueux puis testées de nouveau dans chaque éluant. Ces doubles analyses permettent de révéler les éventuels dommages subis par les supports au cours des divers traitements, d'évaluer la reproductibilité des coefficients de distribution K et la stabilité chimique des supports modifiés.

Par ailleurs, plusieurs colonnes ont été préparées à partir d'un même support, afin de vérifier la reproductibilité des résultats en fonction du protocole de remplissage.

3-3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes fixés plusieurs objectifs à savoir :

- l'évaluation de l'erreur commise sur la détermination des coefficients de distribution K ;
- la détermination du modèle de pores des particules ;
- la détermination des rayons poreux moyens R_{p50} par les diverses méthodes précédemment décrites ;
- la comparaison des courbes de calibration des divers supports à base de PS-DVB natif et modifiés par adsorption de divers dextrans-phénoxy ;
- et enfin, la détermination de la distribution poreuse des divers matériaux par la méthode de Knox et coll. (15,16).

3-3-1 Étude en solvant organique (tétrahydrofurane)

3-3-1-1 Calcul d'erreur sur la détermination de K

Le détail du calcul d'erreur ΔK est décrit ci-après, sachant que K est défini par $K = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$

L'expression de $\Delta K/K$ s'écrit de la façon suivante :

$$\frac{\Delta K}{K} = \frac{\Delta(V_e - V_0)}{V_e - V_0} + \frac{\Delta(V_t - V_0)}{V_t - V_0} = \frac{\Delta V_e + \Delta V_0}{V_e - V_0} + \frac{\Delta V_t + \Delta V_0}{V_t - V_0}$$

En posant $\Delta V_e = \Delta V_0 = \Delta V_t = \Delta V = 0,025$ mL, on obtient l'expression simplifiée :

$$\Delta K = K \left(\frac{2 \Delta V}{V_e - V_0} + \frac{2 \Delta V}{V_t - V_0} \right)$$

soit
$$\Delta K = K \left(\frac{0,05}{V_e - V_0} + \frac{0,05}{V_t - V_0} \right)$$

La figure V.15 représente la courbe de calibration pour des standards de polystyrène dans le tétrahydrofurane et les incertitudes sur chaque point expérimental. Le volume poreux des supports étant faible ($\approx 1,7$ mL), l'erreur commise sur K peut être très importante. Compte-tenu de ce domaine d'incertitude, R_{p50} (calculé par la méthode de Halasz) est de 250 ± 50 Å.

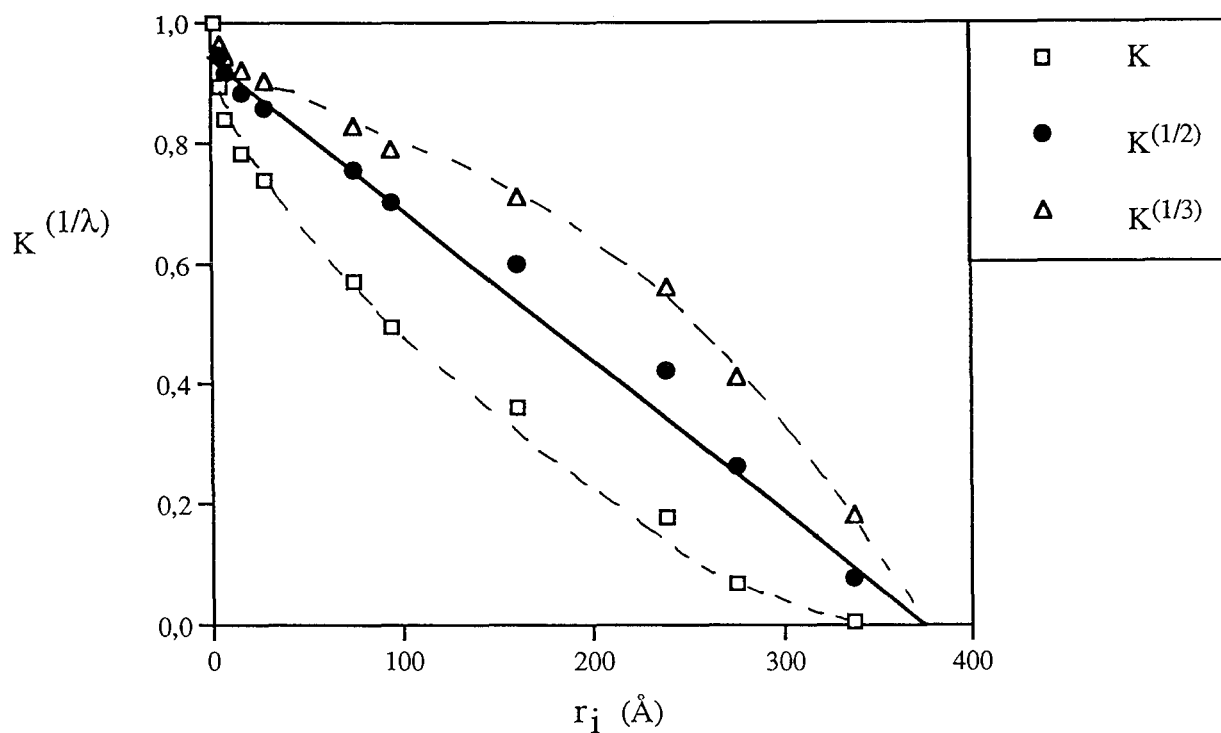


Figure V.16 : Courbes de $K^{1/\lambda}$ en fonction du rayon hydrodynamique des standards de polystyrène dans le tétrahydrofurane.

$\lambda = 2$ pour des pores de géométrie cylindrique

$\lambda = 3$ pour des pores de géométrie sphérique

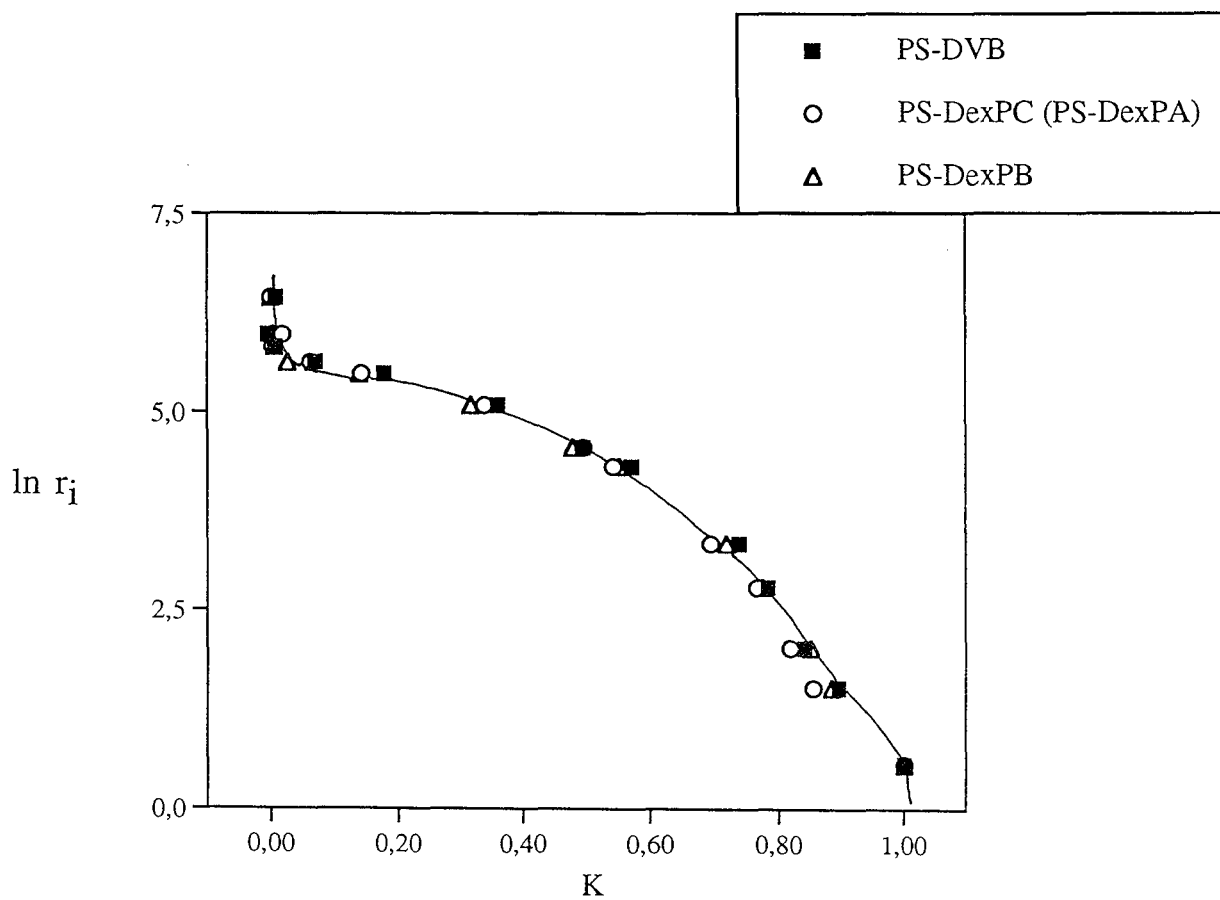


Figure V.17 : Courbes de calibration de standards de polystyrènes obtenues sur divers supports en tétrahydrofurane.

Ces conclusions justifient donc la multiplicité des analyses réalisées afin de vérifier la reproductibilité des résultats, dans chacun des milieux étudiés. Notons que les valeurs de K se sont avérées parfaitement reproductibles et donc significatives.

3-3-1-2 Détermination du modèle de pores

La géométrie des pores d'un lit de particules peut être mise en évidence par simple interprétation graphique d'après la 1^{ère} méthode décrite. Pour ce faire, on trace $K^{1/\lambda}$ en fonction du rayon hydrodynamique r_i des standards, λ étant une valeur entière comprise entre 1 et 3 selon le modèle des pores. La figure V.16 relie respectivement K , $K^{1/2}$, $K^{1/3}$ à r_i pour les particules de PS-DVB natives. Seule la courbe de $K^{1/2} = f(r_i)$, peut être linéarisée, ce qui prouve que le modèle de pores cylindriques correspond le mieux à nos échantillons. Ceci par ailleurs, confirme les résultats obtenus par porosimétrie à l'état sec.

3-3-1-3 Détermination du rayon poreux moyen

La détermination du rayon poreux moyen R_{p50} peut s'effectuer soit graphiquement par la méthode de Halasz soit par le programme de modélisation Dispores. Expérimentalement, nous avons trouvé pour le polystyrène natif des valeurs de R_{p50} égales à $230 \pm 30 \text{ \AA}$ par la méthode de Halasz et $290 \pm 10 \text{ \AA}$ par Dispores. Les écarts constatés entre les rayons poreux moyens sont relativement importants. Ceci est vraisemblablement lié à une mauvaise estimation du facteur de Halasz qui, d'après Knox et Ritchie, n'est pas constant dans toute la gamme de pores et peut varier entre 2 et 3. Par conséquent, nous comparerons seulement les distributions poreuses des différents supports obtenues par la modélisation de Knox et coll. (programme Dispores).

3-3-1-4 Comparaison des courbes de calibration de divers supports en tétrahydrofurane

La figure V.17 compare les courbes de calibration de divers supports en tétrahydrofurane obtenues avec des standards de polystyrène. Aucune différence n'est observée entre les échantillons de polystyrène recouverts de dextrane et le polystyrène natif. La superposition des courbes d'étalonnage des divers supports est un résultat inattendu mais peut s'expliquer par le gonflement des particules organiques dans le THF mais aussi par le fait que les dextrans sont insolubles dans cet éluant et vraisemblablement précipités à la surface du polystyrène. Le rayon poreux moyen R_{p50} est estimé à $290 \pm 10 \text{ \AA}$, quel que soit le support considéré.

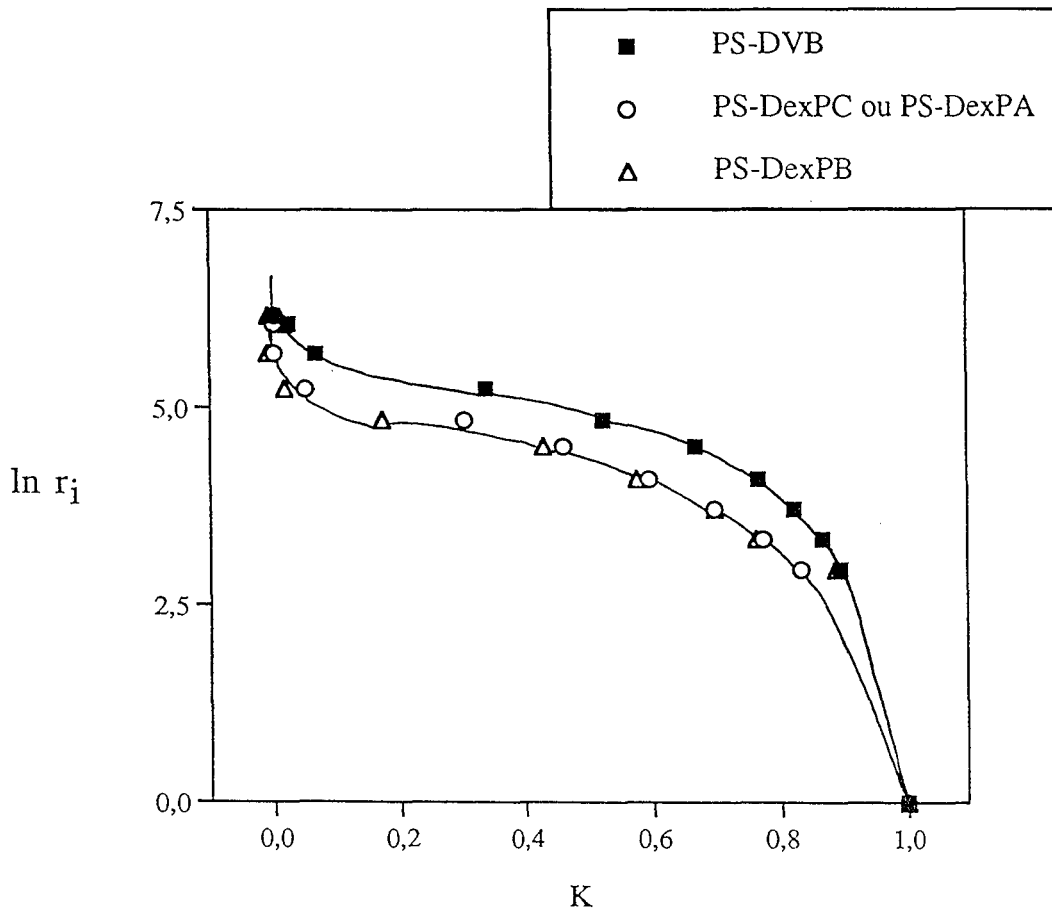


Figure V.18 : Courbes de calibration de standards de pullulanes obtenues sur divers supports en eau/méthanol (80/20 % V/V).

3-3-2 Étude en solvant mixte

Afin de comparer les échantillons de polystyrène modifiés par adsorption de dextranses avec le polystyrène initial, nous avons établi les courbes de calibration des divers supports en milieu eau-méthanol (80/20 % V/V) avec des standards de pullulanes (figure V.18).

En l'absence de méthanol dans l'éluant, les pullulanes s'adsorbent de façon plus ou moins réversible sur le polystyrène natif.

Les courbes d'étalonnage obtenues pour les supports PS-DexP sont peu différentes les unes des autres et révèlent une nette diminution des rayons poreux comparativement au polystyrène non modifié. Le déploiement des chaînes de dextranses en solution aqueuse est très certainement à l'origine de la réduction des rayons poreux.

D'après les rayons hydrodynamiques des standards de pullulanes évalués, les rayons poreux à mi-volume sont respectivement de 350 Å pour les particules de PS-DVB et de 230 Å pour les particules hydrophilisées. Signalons toutefois que les rayons poreux moyens estimés dans le mélange eau-méthanol ne sont donnés qu'à titre indicatif car calculés à partir de la relation [8] valable dans l'eau. Ces rayons poreux sont vraisemblablement surestimés. Néanmoins, cette erreur est faible en regard des autres erreurs expérimentales possibles.

Le tableau V.9 reprend les caractéristiques des diverses colonnes évaluées dans le mélange eau-méthanol (80/20 % V/V).

Support	Vo	Vt	Vp	Vo	Vt	Vp	H (mm)	Rp50 (Å)
	cm ³ /g de support			cm ³ /g de PS-DVB				
PS-DVB	2,41	4,38	1,97	2,41	4,38	1,97	0,25	350
PS-DexPC (0,06 mmol de phénoxy/g de polymère)	2,13	3,68	1,55	2,98	5,15	2,17	0,98	250
PS-DexPB (0,56 mmol de phénoxy/g de polymère)	1,77	3,15	1,37	2,34	4,16	1,81	0,56	250

Tableau V.9 : Caractéristiques des colonnes testées en eau-méthanol (80/20 % V/V) avec :

Vo : volume mort de la colonne

Vt : volume de perméation totale de la colonne

Vp : volume poreux de la colonne (*Vt* - *Vo*)

H : hauteur équivalente à un plateau théorique évaluée sur le pic de méthanol

Les volumes d'exclusion, de perméation totale et poreux, exprimés en cm³/g de support, diminuent significativement lorsque les particules sont recouvertes de dextranses. Rapportés à des cm³/g de PS-DVB, le volume poreux correspondant au support PS-DexPB est équivalent à celui du polystyrène natif alors que celui correspondant au support PS-DexPC dont le contenu du dextrane en groupes hydrophobes est plus faible, est augmenté. Cette augmentation de *Vp* est liée à la formation de pores dans la couche de dextrane, ainsi que nous l'avons mis en évidence par des mesures de porosité à l'état sec. La hauteur équivalente à un plateau théorique

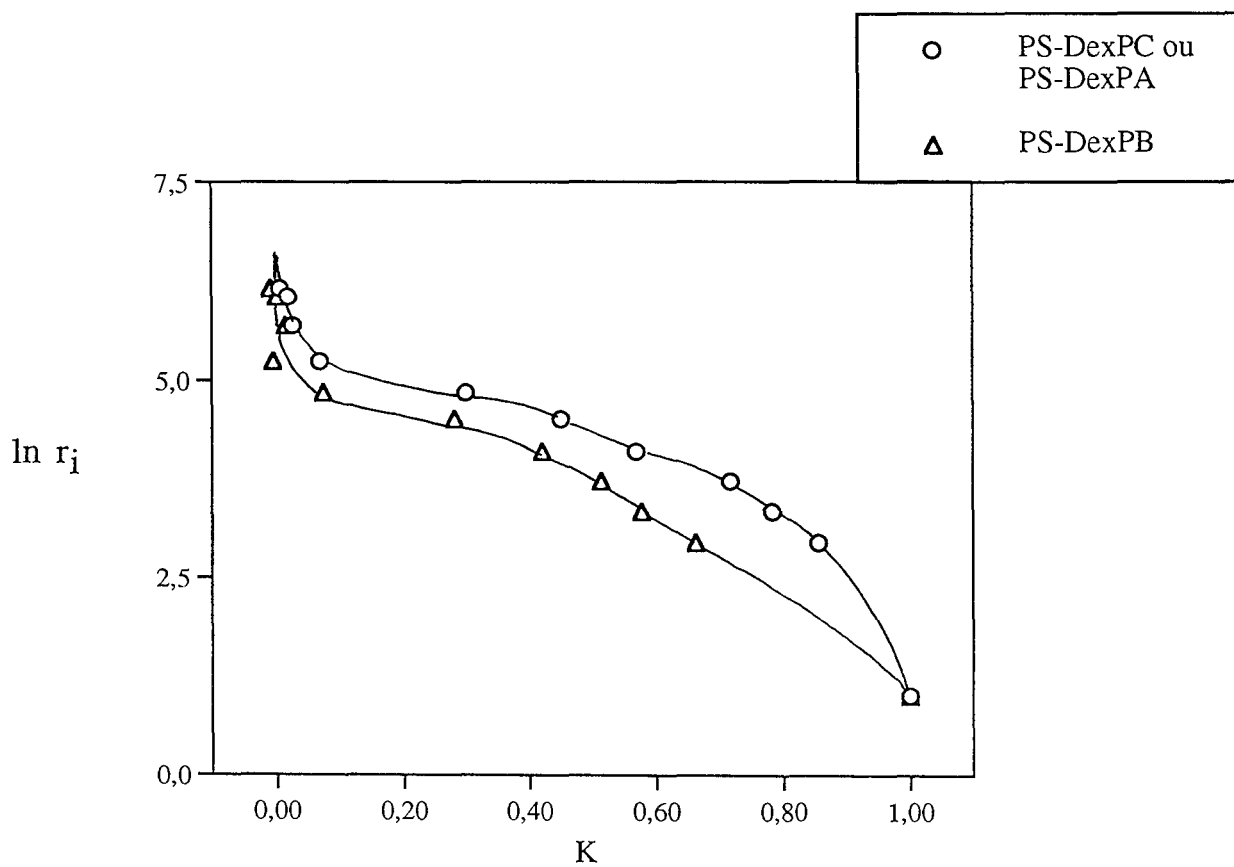


Figure V.19 : Courbes de calibrations de standards de pullulanes obtenues sur des supports modifiés en tampon phosphate à 0,05M pH 7.

notée H est largement augmentée lorsque les billes sont recouvertes de dextrane. Néanmoins, la perte d'efficacité est plus importante pour le support PS-DexPC dans lequel la couche de polymère est épaisse et diffuse. Ainsi, la résistance au transfert de masse en phase stationnaire augmente davantage pour ce support.

Quoiqu'il en soit, les courbes de calibration obtenues en milieu mixte n'ont pas permis de différencier les supports modifiés selon la composition du dextrane adsorbé. Il en était ainsi de l'étude réalisée par RPE dans ce même milieu.

3-3-3 Étude en milieu phosphate

Des courbes de calibration ont ensuite été déterminées en tampon phosphate à 0,05 M pH 7 avec des standards de pullulanes (figure V.19). Ces conditions d'élution correspondent à celles d'utilisation des supports modifiés pour la chromatographie des protéines. Le tableau V.10 reprend les volumes caractéristiques des diverses colonnes évalués en milieu phosphate.

Support	V_0	V_t	V_p	V_0	V_t	V_p	R_{p50} (Å)
	cm ³ /g de support			cm ³ /g de PS-DVB			
PS-DexPC (0,06 mmol de phénoxy/g de polymère)	2,13	3,63	1,50	2,98	5,08	2,10	230
PS-DexPB (0,5 6 mmol de phénoxy/g de polymère)	1,81	3,19	1,38	2,39	4,21	1,82	150

Tableau V.10 : Volumes caractéristiques des colonnes testées en milieu phosphate avec :

V_0 : volume mort de la colonne

V_t : volume de perméation totale de la colonne

V_p : volume poreux de la colonne ($V_t - V_0$)

Les volumes poreux sont identiques à ceux obtenus en mélange eau-méthanol ainsi que l'indique le tableau V.10. Les courbes d'étalonnage des supports PS-DexPC et PS-DexPA, les plus faiblement substitués en groupes phénoxy, sont confondues et de surcroît peu différentes de celles obtenues en eau-méthanol. Les rayons poreux moyens R_{p50} sont de l'ordre de 230 Å.

La courbe de calibration relative au support PS-DexPB dans lequel le dextrane adsorbé possède un taux élevé de groupes hydrophobes, se distingue nettement des autres courbes. Le rayon poreux moyen est abaissé à 150 Å. Nous avons précédemment émis l'hypothèse selon laquelle le dextrane forme à l'intérieur des pores une structure réticulée, et ce de façon d'autant plus marquée qu'il est riche en groupes phénoxy. Cette structure est ensuite stabilisée par réticulation chimique. Néanmoins, il est probable que certains groupes phénoxy situés sur des chaînes restées mobiles puissent s'associer ou non selon la nature du milieu environnant. La mise en place des interactions phénoxy-phénoxy dans l'eau conduirait à une structure pseudo-réticulée secondaire, provoquant ainsi une réduction de la taille des pores. Ces interactions seraient rompues ou largement minimisées en présence de 20% de méthanol dans l'éluant.

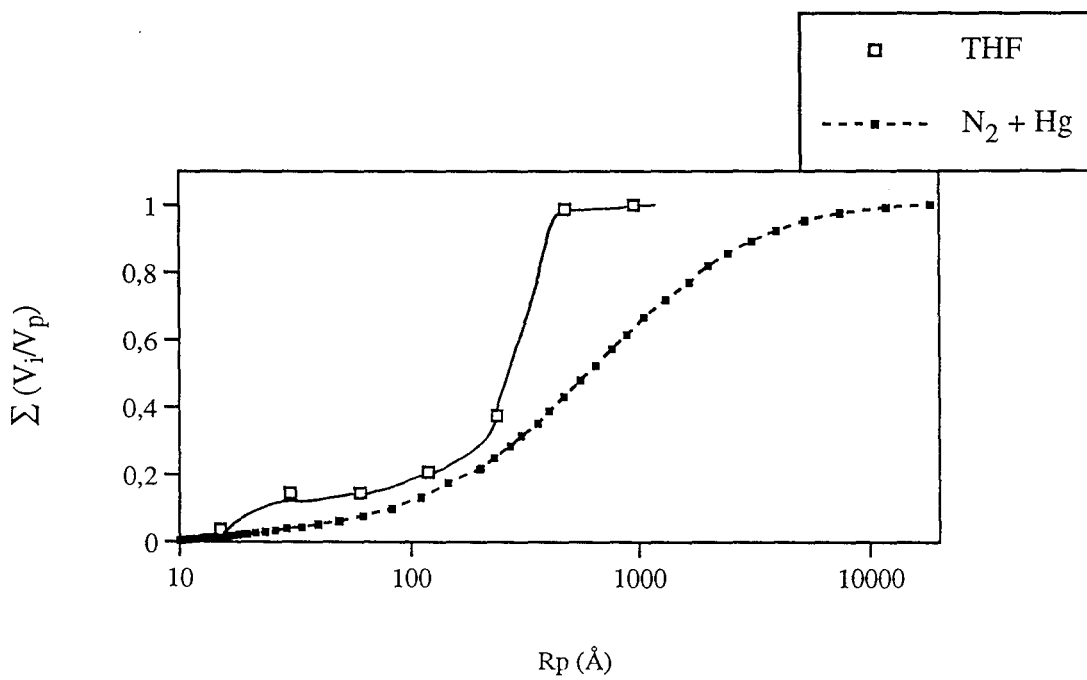


Figure V.20 : Comparaison des distributions poreuses cumulées obtenues sur les particules de PS-DVB natives par porosimétrie à l'état sec (adsorption d'azote et porosimétrie à mercure) et par chromatographie d'exclusion stérique de standards de polystyrène en tétrahydrofurane.

4 - ÉTUDE COMPARATIVE ET CONCLUSION

Le recouvrement des particules par des dextrans hydrophobisés ne change en rien leur distribution granulométrique. Néanmoins, les billes présentent des propriétés physico-chimiques différentes, qui dépendent essentiellement du taux de recouvrement et du contenu en groupes phénoxy des dextrans adsorbés. En particulier, les différences les plus notoires concernent essentiellement **le caractère hydrophile** et **les caractéristiques structurales** des particules tant à l'état sec qu'à l'état solvato.

Le caractère hydrophile des supports, évalué par mesure de l'adsorption de l'albumine, a été amplement discuté dans le chapitre précédent. Nous rappellerons simplement que seules, les billes recouvertes à Γ plateau par le dextrane le plus substitué en groupes phénoxy présentent un caractère hydrophile suffisant pour éviter toute adsorption non-spécifique de l'albumine.

Les caractéristiques structurales des particules ont été déterminées par porosimétrie à l'état sec et par chromatographie d'exclusion stérique à l'état solvato. Ces diverses méthodes de caractérisation ne conduisent pas aux mêmes valeurs de rayon et volume poreux. Ce résultat n'est aucunement surprenant puisque l'état des matériaux ainsi que les hypothèses de travail sont très différentes. Ainsi, par exemple, la figure V.20 représente les courbes de distribution poreuses correspondant au polystyrène natif, obtenues par porosimétrie à l'état sec et par chromatographie d'exclusion stérique dans le tétrahydrofurane. A l'état sec, les pores ayant une fraction volumique non négligeable ont des rayons compris entre 30 et 5000 Å. A l'état solvato, la répartition des pores est plus étroite et deux catégories de pores se distinguent nettement : des petits pores de rayon moyen égal à 20 Å et des pores plus grands dont le rayon est centré autour de 300 Å. La modification de la distribution poreuse et, en particulier, l'apparition de pores de faibles dimensions est probablement liée à l'état de gonflement du polystyrène dans le solvant organique. L'absence de pores de grande taille ($R_p > 500$ Å) peut s'expliquer par la difficulté à distinguer, de façon précise, le volume interstitiel du volume poreux imputable aux ultra-macropores, compte-tenu du fait que, dans le cadre de cette étude, nous ne disposons pas de sondes moléculaires suffisamment larges.

A l'état sec comme à l'état solvato, le modèle représentant au mieux la géométrie des pores est le modèle cylindrique. Par ailleurs, il convient de noter que tous les résultats obtenus, bien que différents, conduisent aux mêmes conclusions.

A l'issue des diverses caractérisations structurales, nous avons classé les particules modifiées en deux catégories distinctes.

La première de ces catégories regroupe les supports PS-DexPC et PS-DexPA, obtenus à partir des dextrans les plus faiblement substitués en groupes phénoxy. D'après l'étude RPE, ces dextrans sont adsorbés à la surface du polystyrène par un grand nombre de segments en trains

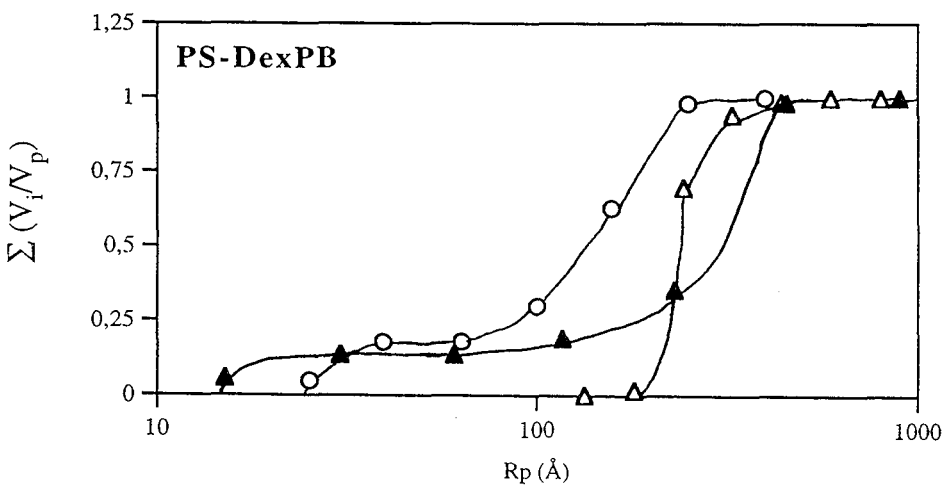
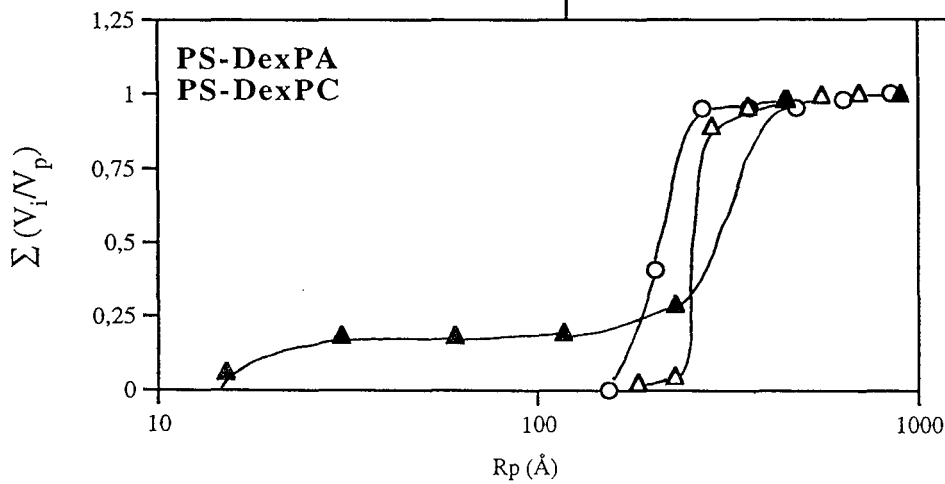
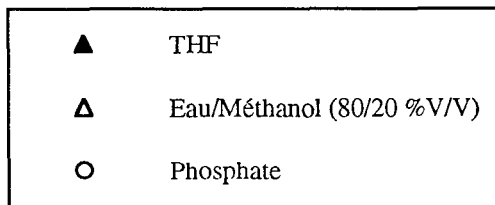
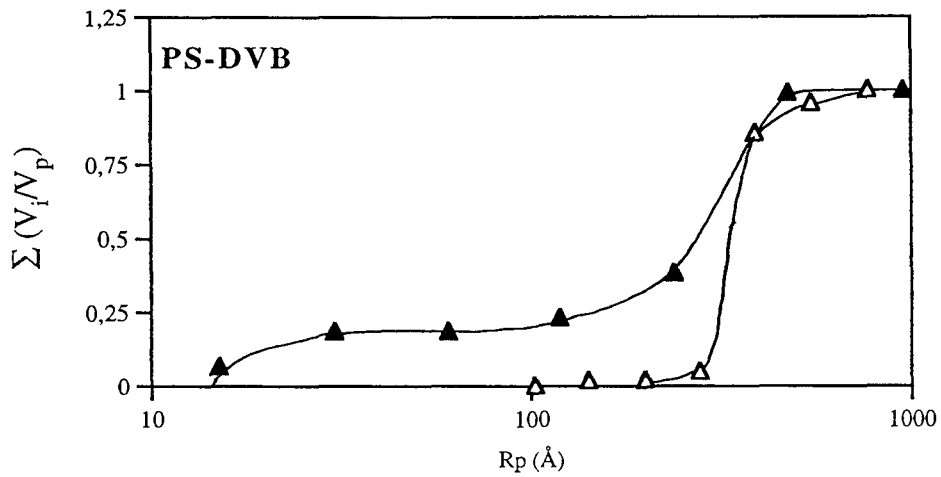


Figure V.21 : Distributions poreuses des divers supports à l'état solvaté dans trois milieux différents, modélisées par le programme Dispores.

mais ils présentent également un certain nombre de boucles déployées en solution. Cette conformation conduit à la formation d'une couche vraisemblablement épaisse mais peu dense. Cette couche diffuse serait suffisamment épaisse pour générer à la surface des particules, une porosité nouvelle, d'où l'importance du volume poreux mesuré comparativement à celui du polystyrène non modifié.

Dans le tétrahydrofurane, les divers supports, modifiés ou non, présentent des courbes de calibration qui ne sont pas significativement différentes. Ainsi que nous l'avons déjà mentionné, ceci est sans doute partiellement lié à des problèmes de gonflement des particules de PS-DVB et à l'insolubilité du dextrane.

Dans le mélange eau-méthanol, l'extension des chaînes de dextrans (DexPA et DexPC) en solution conduit à une réduction de la taille des pores, comparativement à celle du polystyrène natif. Des résultats similaires sont obtenus en tampon phosphate.

La deuxième catégorie concerne les supports modifiés par adsorption des dextrans les plus substitués en groupes phénoxy. D'après l'étude RPE, ces dextrans sont adsorbés à la surface du polystyrène sous forme d'une couche relativement compacte avec des segments en boucles. Ces segments, bien que nombreux, sont globalement peu déployés en solution. La couche de polymère déposé serait donc, dans ce cas, plus dense mais de moindre épaisseur. Cependant, ces polymères sont capables d'établir de nombreuses interactions hydrophobes phénoxy-phénoxy (intra et/ou intermoléculaires). Ils peuvent de ce fait conduire à la formation d'un réseau à l'intérieur des pores, réseau dont la structure est partiellement stabilisée lors de la réticulation chimique à l'épichlorhydrine. Certaines interactions entre groupes phénoxy restent labiles et peuvent être rompues en présence de méthanol. En effet, les rayons poreux moyens mesurés dans l'eau sont plus petits que ceux déterminés en solvant mixte. Cette variation est imputée à la présence d'une structure pseudo-réticulée labile, due à la mise en place d'interactions phénoxy-phénoxy.

Les distributions poreuses des divers supports sont comparées sur la figure V.21.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) R. E. Majors
Measuring particle-size distribution of HPLC packings.
LC-GC, **11**, (1993), 848-857
- (2) S. Brunauer, P. H. Emmett et E. Teller
Adsorption of gases in multimolecular layers.
J. Amer. Chem. Soc., **60**, (1938), 309-319
- (3) E. P. Barrett, L. G. Joyner, P. P. Halenda
The determination of pore volume and area distributions in porous substances.
Computations from nitrogen isotherms.
J. Am. Chem. Soc., **73**, (1951), 373-380
- (4) R. P. Mayer, R. A. Stowe
Mercury porosimetry - Breakthrough pressure for penetration between packed spheres.
J. Colloid Sci., **20**, (1965), 893-911
- (5) F. A. L. Dullien
Porous Media - Fluid transport and pore structure.
Acad. Press, (1979), 97-103
- (6) C. M. Cheng, F. J. Micale, J. W. Vanderhoff et M. S. El Aasser
Synthesis and characterization of monodisperse porous polymer particles.
J. Polym. Sci., part A, Polymer Chemistry, **30**, (1992), 235-244
- (7) J. Kloubek
Investigation of porous structures using mercury reintrusion et retention.
J. Colloid Interface Sci., **163**, (1994), 10-18
- (8) Q. C. Wang, F. Svec et J. M. Frechet
Monodisperse polymer beads as packing material for high performance liquid chromatography.
Polym. Bull., **28**, (1992), 569-576
- (9) A. Kurganov, V. Davankov, I. Isajeva, K. Unger, F. Eisenbeiss
Characterization of covalently bonded and adsorbed polymer coatings on silica, alumina and zirconia by means of physico-chemical and chromatographic methods.
J. Chromatogr. A, **660**, (1994), 97-111
- (10) A. Kurganov, Yu Puchkova, V. Davankov, F. Eisenbeiss
Polyvinylpyrrolidone-coated silica packings for chromatography of proteins and peptides
J. Chromatogr. A, **663**, (1994), 163-174
- (11) J. J. Kirland
Porous silica microspheres for high-performance size exclusion chromatography
J. Chromatogr., **125**, (1976), 231-250
- (12) K. Jerabek, A. Revillon, E. Puccilli
Pore structure characterization of organic-inorganic materials by inverse size exclusion chromatography.
Chromatographia, **36**, (1993), 259-262

- (13) G. Shah et P.L. Dubin
Adsorptive interaction of ficoll standards with porous glass size-exclusion chromatography columns.
J. Chromatogr. A, **693**, (1995), 197-203
- (14) I. Halasz et K. Martin
Pore size and solid bodies
Angew. Chem., **90**, 12, (1978), 954-961
- (15) J. H. Knox et H. P. Scott
Theoretical models for size exclusion chromatography and calculation of pore size distribution from size exclusion chromatography data.
J. Chromatogr., **316**, (1984), 311-332
- (16) J. H. Knox et H. J. Ritchie
Determination of pore size distribution curves by size-exclusion chromatography
J. Chromatogr., **387**, (1987), 65-84
- (17) M. E. Van Knefeld et N. Van den Hoed
Mechanism of gel permeation chromatography
J. Chromatogr., **83**, (1973), 111-124
- (18) T. Kato, T. Tokuya et A. Takahashi
Comparison of poly(ethylene oxide), pullulans and dextrans as polymer standards in aqueous gel chromatography
J. Chromatogr., **256**, (1983), 61-69

CHAPITRE VI

CHAPITRE VI

APPLICATIONS À LA SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DES PROTÉINES

Les particules de polystyrène-divinylbenzène, recouvertes par adsorption du dextrane le plus substitué en groupes phénoxy, présentent des propriétés physico-chimiques compatibles avec la mise en oeuvre de séparations bio-chromatographiques. Ces particules, qui possèdent à la fois la rigidité des billes de PS-DVB natives et le caractère hydrophile du dextrane, ont été testées en chromatographie d'exclusion stérique des protéines dans diverses conditions d'élution (pH, force ionique).

En outre, le dextrane est un polymère facilement modifiable. Les particules ont été fonctionnalisées par greffage de p-aminobenzamidine puis utilisées pour purifier des solutions de trypsine par chromatographie d'affinité. Cette utilisation particulière illustre les applications potentielles de ce nouveau matériau pour divers types de chromatographie, autres que la chromatographie d'exclusion stérique.

1- CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STÉRIQUE DES PROTÉINES

En raison de leur caractère hydrophobe prononcé, les phases stationnaires à base de PS-DVB sont encore très peu utilisées pour la chromatographie des protéines, exception faite de la chromatographie en phase inverse.

Le procédé d'hydrophilisation des particules de PS-DVB auquel nous avons eu recours consiste à adsorber, à la surface de particules polystyréniques, des dextrans préalablement hydrophobisés par introduction de groupes phénoxy. Cependant, l'hydrophilisation du matériau n'est effective que dans certaines conditions :

- le dextrane est déposé sur les particules à un taux de recouvrement maximal.
- la couche adsorbée doit être stabilisée par réticulation chimique à l'épichlorhydrine (0,6 M dans NaOH 1M). Cette étape est suivie d'un lavage des particules par le sulfate dodécyle de sodium à 2 %.
- le dextrane possède un taux de substitution suffisamment élevé en groupes phénoxy.

Par conséquent, seuls les supports PS-DexPB, préparés à Γ_{pl} à partir de dextrans dont les taux de substitution en phénoxy sont de l'ordre de 0,50 mmol /g polymère, seront testés pour la chromatographie des protéines; rappelons que l'albumine de sérum bovin est adsorbée de façon non spécifique sur les autres supports.

1-1 CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Le système CLHP utilisé a fait l'objet d'une description complète dans le chapitre précédent. La présence d'un système de by-pass intercalé entre la boucle d'injection de 20 μ L et le détecteur UV-Vis, en parallèle avec la colonne (250 mm x 4,6 mm diamètre interne) permet de déterminer avec précision la quantité éluée pour chaque soluté injecté.

Les protéines injectées (0,5 à 2 g/l) sont détectées à 280 nm; elles proviennent d'un kit commercialisé par Pharmacia (Uppsala, Suède) à l'exception de la trypsine (Sigma). Les caractéristiques principales des protéines utilisées au cours de notre étude sont résumées dans le tableau VI.1.

Les courbes de calibration en protéines ont été établies dans diverses conditions d'élution à un débit constant de 0,4 mL/min. Divers éluants, préalablement filtrés sur membranes (0,45 μ m) Millipore en ester de cellulose, ont été utilisés: - tampon phosphate 0,05 M, pH 7

- tampon acétate 0,05 M, pH 5

- tampon tris/HCl 0,05 M, pH 8.

L'augmentation de la force ionique des éluants est réalisée par addition de chlorure de sodium à diverses concentrations.

Protéines	Sources*	M(g/mol)*	pI	Rayon de Stokes $r_{st}(A)^*$
Thyroglobuline (Thy)	Thyroïde de bœuf	669 000	4,5	85,0
Ferritine (Fer)	Rate de cheval	440 000	4,4	61,0
Catalase (Cat)	Foie de boeuf	232 000	5,4	52
Aldolase (Ald)	Muscle de lapin	158 000	9,5	48,1
Albumine (BSA)	Sérum bovin	67 000	5,07-4,98-5,18	35,5
Ovalbumine (Oval.)	Oeuf de poule	43 000	4,5-4,7	30,0
Chymotrypsinogène A (Chym)	Pancréas de boeuf	25 000	9,0-9,5	20,9
Ribonucléase (Rib)	Pancréas de boeuf	13 700	8,8-9,4	16,4
Trypsine (Tryp.)	Pancréas de boeuf	23 700	10,8	—

Tableau VI.1 : Caractéristiques principales des protéines injectées en chromatographie d'exclusion stérique (* données des fournisseurs).

Les pI des protéines mentionnés sont extraits des références (1, 2, 3).

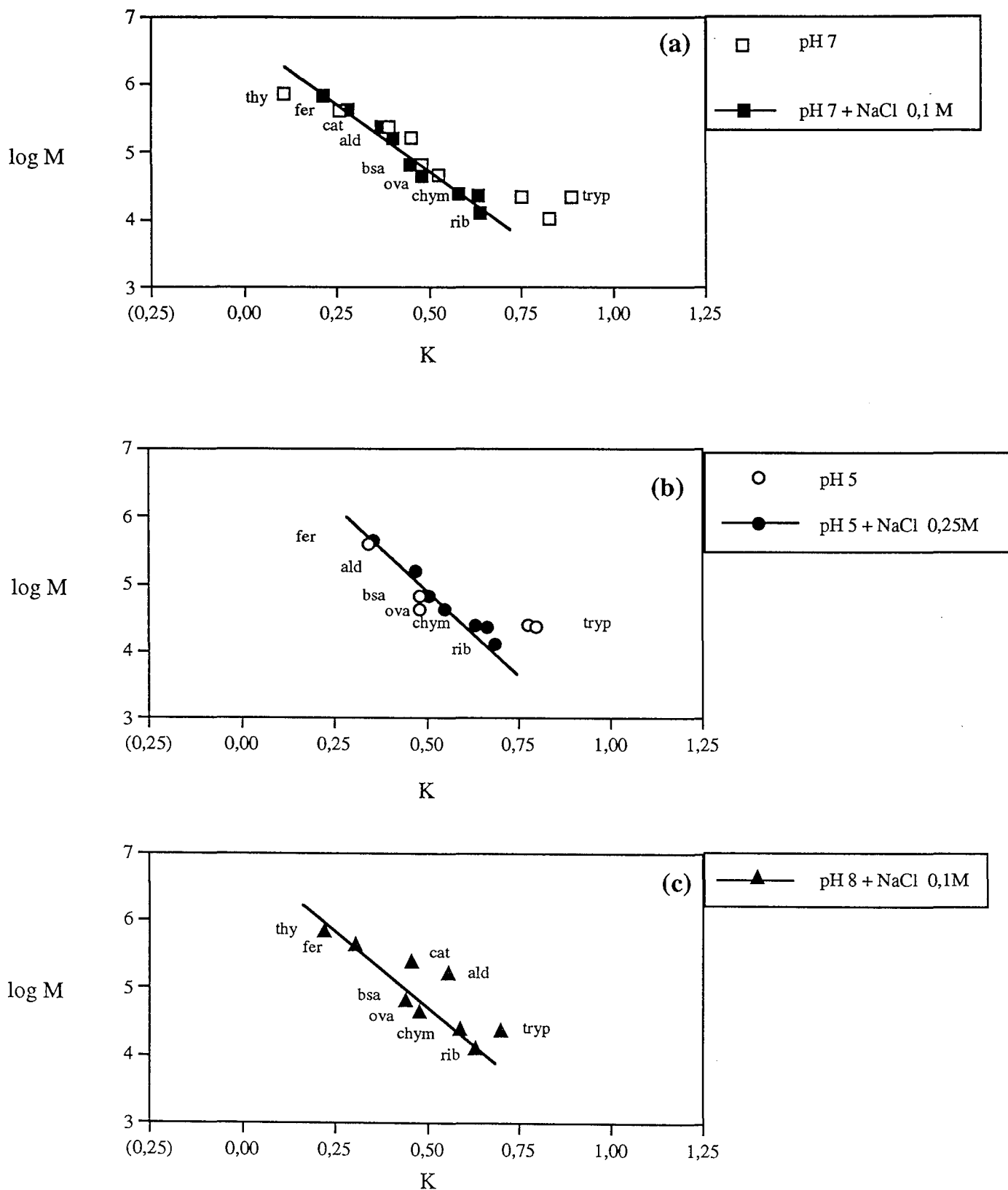


Figure VI.1 : Courbes de calibration en protéines obtenues sur la colonne PS-DexPB (250 x 4,6 mm D.I.) à 0,4 mL/min, à différents pH et forces ioniques .
 Avec thy : thyroglobuline, fer : ferritine, cat : catalase, ald : aldolase, bsa : albumine, ova : ovalbumine, chym : chymotrypsinogène, rib : ribonucléase et tryp : trypsine.

1-2 COURBES DE CALIBRATION EN PROTÉINES

1-2-1 Influence du pH et de la force ionique

Les diverses courbes présentées dans cette partie ont été déterminées plusieurs fois sur la même colonne mais également sur des colonnes distinctes. Malgré une incertitude relativement importante liée à la détermination exacte du débit, les résultats se sont avérés reproductibles.

La figure VI.1 compare les courbes de calibration en protéines ($\log M = f(K)$) sur le support PS-DexPB à différents pH en présence ou non de NaCl ajouté.

A pH 7, en l'absence de sel dans l'éluant, les protéines acides semblent éluées par un mécanisme d'exclusion stérique pur. A l'inverse, les protéines basiques telles que l'aldolase, l' α -chymotrypsine et la trypsine sont davantage retenues sur la colonne, vraisemblablement en raison d'interactions ioniques résiduelles. La présence de charges négatives sur le polymère adsorbé (mises en évidence dans le chapitre II) peut provoquer un effet léger d'exclusion d'anions vis-à-vis de certaines protéines acides et exercer un caractère échangeur faible de cations vis-à-vis des protéines basiques.

La présence de sel (en faible concentration) dans l'éluant contribue à minimiser ces interactions non-spécifiques. La courbe de calibration présente alors un domaine de linéarité plus marqué (supérieur à 20 000- 800 000, en protéines). Aucune protéine n'est éluee ni dans le volume d'exclusion, ni dans le volume de perméation totale. Ces derniers sont estimés d'après les volumes d'élution respectifs d'un pullulane de masse moléculaire élevé ($M = 1660 \text{ kg/mol}$) et du méthanol. Le support PS-DexPB semble donc convenablement hydrophilisé puisque les protéines globulaires les plus hydrophobes du kit telles que l'albumine et le chymotrypsinogène ne sont pas retenues en présence d'une faible concentration saline. Ceci confirme les résultats obtenus en "batch" avec la BSA (chapitre IV) .

La figure VI.2 représente l'effet de la concentration en NaCl dans l'éluant sur l'élution de l'albumine. La BSA est éluee quantitativement et aux mêmes volumes, quelle que soit la concentration en NaCl (0,1- 2M). Le support PS-DexPB est donc parfaitement hydrophile. Suite à une étude similaire, Yang et Regnier ont démontré le caractère hydrophile d'un de leur support à base de polystyrène modifié (1).

Des courbes de calibration ont également été établies à pH 5 et à pH 8 (figure VI.1). Dans tous les cas, l'apport d'ions est nécessaire pour masquer les interactions de type ionique et permettre une élution quantitative des protéines.

A pH 5, la force ionique doit être supérieure à celle utilisée à pH plus élevé. Certaines protéines telles que la thyroglobuline et la catalase sont insolubles dans ce tampon. D'une façon générale,

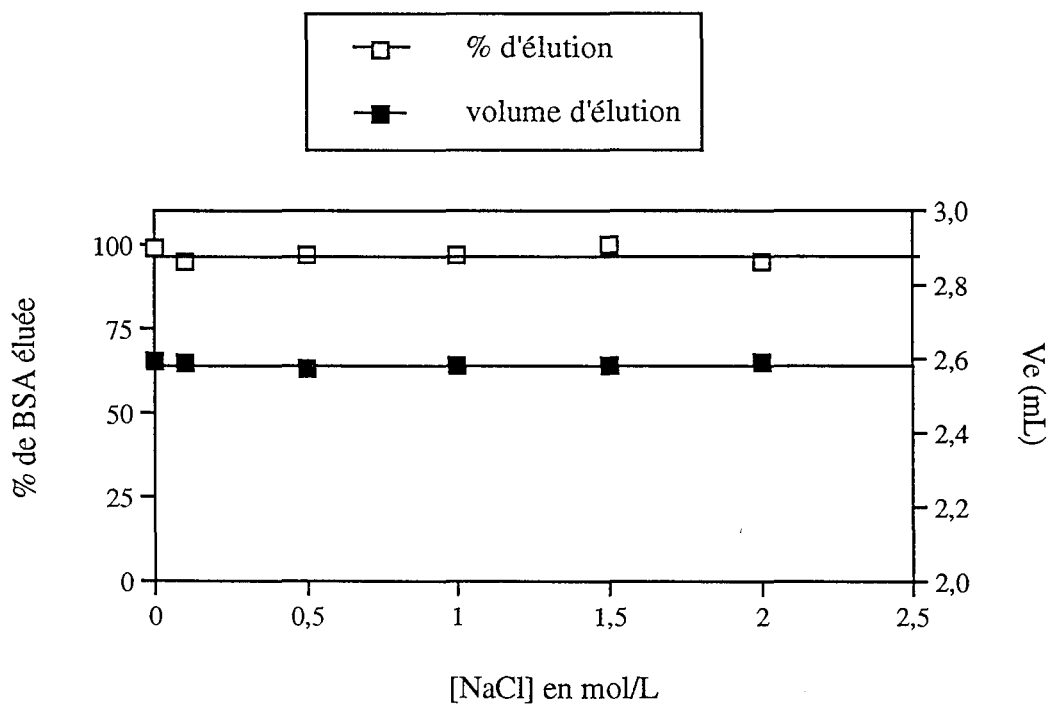


Figure VI.2 : Elution de l'albumine (BSA) sur le support PS-DexPB (0,56 mmol de phénoxy/g de polymère) en tampon phosphate 0,05M, pH 7 en présence de concentrations croissantes en chlorure de sodium.

les protéines sont éluées plus tardivement qu'à pH 7. Cette différence peut être liée à une légère modification de porosité du support (réarrangement de la couche de dextrane déposée), et/ou à un changement de conformation des protéines dans ces conditions de pH et de force ionique. Cependant, nous pouvons remarquer que la pente de la droite de calibration reste quasiment identique.

A pH 8, on constate une augmentation des temps de rétention des protéines les plus basiques (trypsine et aldolase). La catalase, de pI égal à 5,4, a également un comportement anormal. Les autres protéines présentent des temps de rétention comparables à ceux obtenus à pH 7. Il convient de souligner que la seule connaissance de la charge nette d'une protéine ne suffit pas à expliquer son comportement dans un système chromatographique. Seule une analyse de la distribution des charges et des domaines hydrophobes à sa surface pourrait permettre d'expliquer l'ensemble des phénomènes observés.

Quoiqu'il en soit, la plupart des protéines étudiées sont éluées de manière quasi-quantitative aux trois pH étudiés comme le montre le tableau VI.2, exception faite de l'aldolase et de la catalase (à tous les pH) et de la ferritine (à pH 5).

Protéines	% de protéine éluée ± 5 %		
	pH 7 + 0,1 M en NaCl	pH 5 + 0,25 M en NaCl	pH 8 + 0,1 M en NaCl
Thyroglobuline	89	—	87
Ferritine	86	75	91
Catalase	65	—	68
Aldolase	83	71	76
Albumine	95	100	100
Ovalbumine	95	91	98
Chymotrypsinogène A	90	97	94
Ribonucléase	100	100	88
Trypsine	100	87	70

Tableau VI.2 : Pourcentages de protéines éluées du support PS-DexPB en fonction du pH de la phase mobile

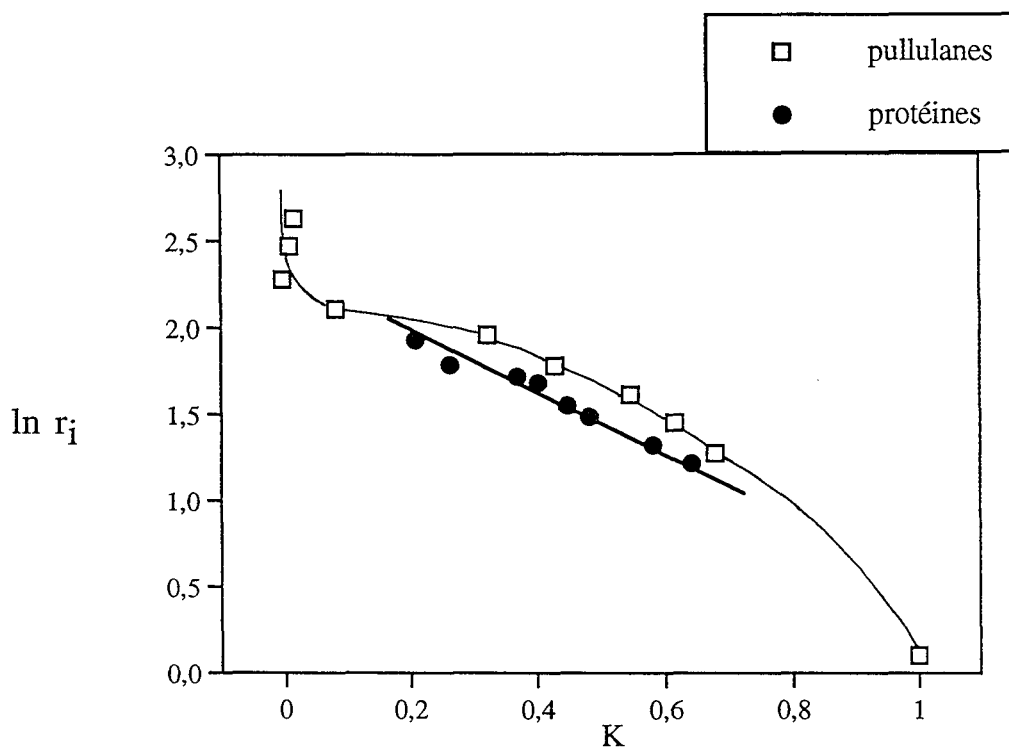


Figure VI.3: Comparaison des courbes de calibration en protéines et pullulanes obtenues sur la colonne PS-DexPB (250 x 4,6 mm D.I., 0,4 mL/min) à pH 7. r_i représente respectivement le rayon hydrodynamique des pullulanes et le rayon de Stokes des protéines.

1-2-2 Comparaison avec les courbes de calibration en pullulanes

La figure VI.3 compare les courbes de calibration en protéines et en pullulanes obtenues sur les support PS-DexPB à pH 7. Les caractéristiques des pullulanes ont été par ailleurs décrites dans le chapitre V.3.

Les courbes de calibration relatives aux pullulanes et aux protéines présentent une pente identique. Néanmoins, à taille comparable, les pullulanes sont élués un peu plus tardivement que les protéines. Cette différence peut être attribuée d'une part, à l'absence de chlorure de sodium dans l'éluant utilisé pour la calibration en pullulanes et d'autre part, au fait que les dimensions des molécules ne sont pas déterminées par la même méthode: les rayons de stokes sont utilisés pour les protéines alors que nous avons mentionné les rayons hydrodynamiques pour les pullulanes (4). De plus, les protéines sont sphériques et rigides contrairement aux pullulanes.

1-2-3 Comparaison avec une colonne commerciale

Afin d'évaluer les performances de la colonne de PS-DexPB (250 x 4,6 mm de D. I.), nous avons comparé la courbe de calibration en protéines obtenue sur ce support avec celle obtenue sur un support commercial destiné à la biochromatographie. Pour cette étude, nous avons choisi une colonne TSK-G3000-SW (Merck, 300 x 7,5 mm diamètre interne). La phase stationnaire est constituée de particules de silice poreuse modifiée chimiquement par fixation covalente de groupements hydrophiles pour masquer les groupes silanols. Les caractéristiques de ce matériau, décrites par le fournisseur, sont les suivantes : un diamètre de particules de $10 \pm 2 \mu\text{m}$ et un rayon poreux moyen centré autour de 125 \AA .

Pour s'affranchir des paramètres géométriques des colonnes, les composés sont caractérisés non pas par leur volume de rétention mais par le coefficient de distribution K. Les performances des colonnes seront ensuite discutées à partir de certaines grandeurs fondamentales dont la hauteur équivalente à un plateau théorique (H), la sélectivité (α) et la résolution (R_s). H est une grandeur qui rend compte de l'élargissement des pics chromatographiques dans la colonne. Elle est obtenue à partir de la relation $H = \frac{L}{N}$. L est la longueur de la colonne et N le nombre équivalent de plateaux théoriques évalué à partir du temps de rétention (t_R) d'un soluté et de la largeur du pic à mi-hauteur (δ) avec $N = 5,54 \left(\frac{t_R}{\delta}\right)^2$, relation valable pour les pics gaussiens.

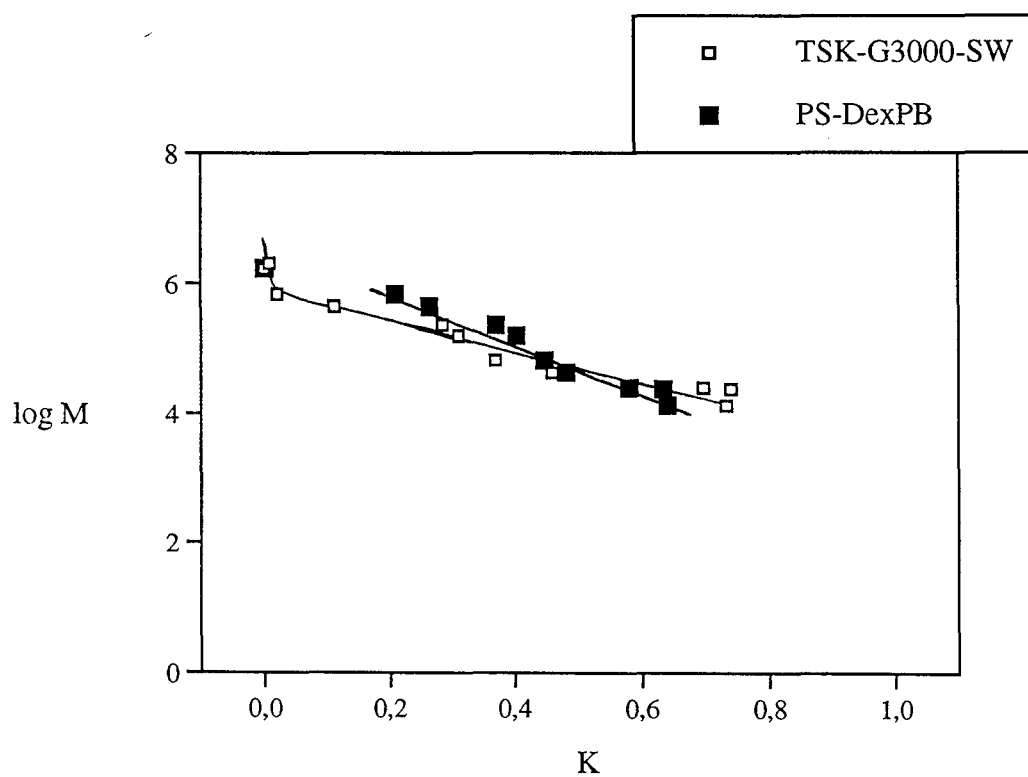


Figure VI.4 : Comparaison des courbes de calibration en protéines obtenues à pH 7 (NaCl à 0,1M) sur la colonne TSK-G3000 - SW (300 x 7,5 mm D.I.) et sur la colonne PS-DexPB (250 x 4,6 mm D.I.).

Cette notion est couramment employée pour comparer des colonnes de longueurs variées, et traduit l'influence des divers facteurs expérimentaux qui contribuent à l'élargissement des pics :

- la résistance au transfert de masse en phase mobile et la diffusion tourbillonnaire qui provoquent une hétérogénéité de l'écoulement d'où l'existence de chemins multiples. Cet effet est d'autant moins prononcé que les particules sont uniformes (sphériques), de répartition granulométrique étroite et que le remplissage des particules est régulier.
- la dispersion des molécules par diffusion longitudinale.
- la résistance au transfert de masse en phase mobile "stagnante" (liée à la dimension des pores) et en phase stationnaire (liée à la profondeur de pénétration des solutés dans la phase stationnaire).

La contribution des résistances au transfert de masse est prépondérante en chromatographie liquide compte-tenu des faibles coefficients de diffusion des solutés en phase liquide. Néanmoins, la résistance au transfert de masse peut être améliorée en réduisant le diamètre des particules, en diminuant l'épaisseur du film de la phase stationnaire, en réduisant la distribution en taille des pores, ou en utilisant des matériaux non poreux.

Dans le cas de la SEC, l'élargissement des pics dépend beaucoup du transfert de masse en phase stagnante (5, 6).

La figure VI.4 représente les courbes de calibration comparatives en protéines à pH 7 obtenues sur la colonne TSK-G3000-SW (à 0,7 mL/min, soit 100 cm/h) et sur la colonne PS-DexPB (à 0,4 mL/min soit 140 cm/h).

Les grandeurs fondamentales des colonnes telles que l'efficacité (H), la résolution (Rs) et la sélectivité (α) sont comparées dans le tableau VI.3. H est calculée à partir du pic caractéristique de l'albumine, Rs et α sont calculées à partir des pics d'albumine et d'ovalbumine.

Colonne	N	H (mm)	h (H/dp)	Rs	α	dp (μm)
PS-DexPB	82	3,00	75	0,05	1,1	40 \pm 20
TSK-G3000-SW	2383	0,13	13	0,91	1,25	10 \pm 2

Tableau VI.3 : Comparaison des grandeurs caractéristiques des colonnes PS-DexPB et TSK-G3000-SW évaluées à partir des pics de l'albumine et de l'ovalbumine.
dp = diamètre moyen des billes

Les résultats obtenus nécessitent plusieurs commentaires:

- Le domaine de fractionnement de la colonne TSK testée est plus étroit que celui du support PS-DexPB car la thyroglobuline est éluée dans le volume exclu. Ce résultat est en accord avec les informations fournies par le fabricant qui donnent un domaine de fractionnement en protéines globulaires compris entre 10 000 et 500 000 g/mol.

- D'une façon générale, les coefficients de distribution des protéines sur PS-DexPB sont supérieurs à ceux obtenus sur la colonne TSK.

- La pente de la droite d'étalonnage est légèrement plus forte dans le cas de la colonne PS-DexPB.

- Les profils chromatographiques des protéines non exclues sont parfaitement gaussiens sur la colonne TSK mais sont légèrement déformés sur le support polystyrénique.

- En ce qui concerne le rendement des éluions, les protéines sont, dans tous les cas, éluées dans des proportions comparables sur les deux colonnes, comme l'indique le tableau VI.4.

Protéines	% de protéine éluée ($\pm 5\%$)	
	TSK-G3000-SW (300 x 7,5 mm D.I.)	PS-DexPB (250 x 4,6 mm D.I.)
Thyroglobuline	79	89
Ferritine	93	86
Catalase	62	65
Aldolase	95	83
Albumine	95	95
Ovalbumine	95	95
Chymotrypsinogène	93	90
Trypsine	92	100
Ribonucléase	89	100

Tableau VI.4 : Comparaison des pourcentages de protéines éluées sur les colonnes TSK-G3000-SW et PS-DexPB en tampon phosphate à 0,05 M, pH 7 en présence de NaCl 0,1 M.

De toute évidence la colonne commerciale TSK présente des meilleures performances que celles de la colonne polystyrénique. Elle est plus résolutive, plus sélective et d'efficacité supérieure. La hauteur équivalente à un plateau théorique réduite est environ six fois inférieure à celle du support PS-DexPB.

Ces différences sont vraisemblablement liées à la taille de particules mais aussi à la répartition de la porosité. Bien que les rayons poreux moyens des deux supports soient centrés autour des mêmes valeurs (125-150 Å), il est probable que la répartition des pores soit différente. En

particulier, nous avons montré (chapitre V), que les pores du support PS-DexPB présentent une large distribution en taille, ce qui nuit aux performances de la colonne. Il convient également de souligner que les deux colonnes n'ont pas été comparées dans des conditions de débit linéaire identiques mais plutôt dans les conditions où elles sont le plus couramment utilisées.

En conclusion, les particules de PS-DVB hydrophilisées par adsorption à saturation de dextrane à taux élevé en groupes phénoxy ($> 0,50$ mmol/g de polymère) conduisent à un support extrêmement hydrophile, utilisable en chromatographie d'exclusion stérique. Un caractère échangeur faible de cations a été mis en évidence mais peut être facilement masqué par augmentation de la force ionique de l'éluant. Des résultats similaires ont été obtenus avec des supports à base de silice qui présentent en surface des groupes silanolates résiduels (3,8).

Néanmoins, les caractéristiques granulométriques et structurales des particules de PS-DVB utilisées ne permettent pas d'obtenir une colonne très performante. Malgré tout, les résultats obtenus sont prometteurs, sachant que les performances du système PS-DexPB peuvent être largement améliorées en utilisant des particules de PS-DVB plus petites, plus régulières et dont la distribution en taille des pores serait plus réduite. Ainsi par exemple, l'utilisation de microsphères dont la taille serait équivalente à celle des billes de la colonne TSK ($10 \mu\text{m}$), réduirait déjà la hauteur de plateau théorique d'environ 85%, d'après la relation empirique $H = A \cdot dp^\beta$ démontrée par de nombreux auteurs (avec $\beta = 1,6 \pm 0,2$) (7).

2- CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ APPLIQUÉE À LA PURIFICATION DE LA TRYPSINE

2-1 GÉNÉRALITÉS SUR LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

Le terme d'affinité se réfère aux modes de chromatographie faisant appel à la reconnaissance protéine-ligand. Le principe de la chromatographie d'affinité est basé sur la formation transitoire d'un complexe spécifique et réversible entre la molécule à purifier et une molécule appelée ligand immobilisée de façon covalente sur le support. Les solutés qui n'ont pas d'affinité pour le ligand ne sont pas retenus sur le support. Le complexe est dissocié par modification de la composition de la phase mobile (pH, force ionique, addition d'un compétiteur). La protéine complexée au ligand puis dissociée est alors purifiée.

La chromatographie d'affinité est une méthode de séparation utilisée pour obtenir des produits de haute pureté, à partir de processus biologiques. La nature fragile des biomolécules exige, le plus souvent, un mode de séparation sélectif. Les interactions qui régissent la purification peuvent être plus ou moins spécifiques. Parmi les plus spécifiques, on peut citer les interactions de type enzyme-substrat, enzyme-inhibiteur, hormone-récepteur, protéine-médicament, antigène-anticorps... Une présentation récente de la chromatographie d'affinité haute performance a été publiée par Van Eyck et coll. (9).

Dans notre cas, nous avons examiné la possibilité d'utiliser les supports à base de PS-DVB hydrophilisé pour la chromatographie d'affinité en utilisant comme modèle le système trypsine-p-aminobenzamidine. Ce choix a été dicté par le désir de comparer différents matériaux préparés par les équipes ayant travaillé au sein du Groupe de Recherche "Biochromatographie" (10, 11, 12).

La connaissance de la structure et des propriétés du site actif d'une protéine est nécessaire pour comprendre son processus de purification en chromatographie d'affinité. Ainsi, dans un premier temps, nous décrirons la structure et les propriétés de la trypsine ainsi que celles de ses inhibiteurs et substrats.

Plusieurs supports différemment fonctionnalisés ont été étudiés : la détermination de la capacité d'adsorption en trypsine par analyse frontale a été entreprise, puis les paramètres d'affinité ont été évalués par analyse zonale. Pour terminer cette étude, des exemples de purification de la trypsine seront ensuite décrits.

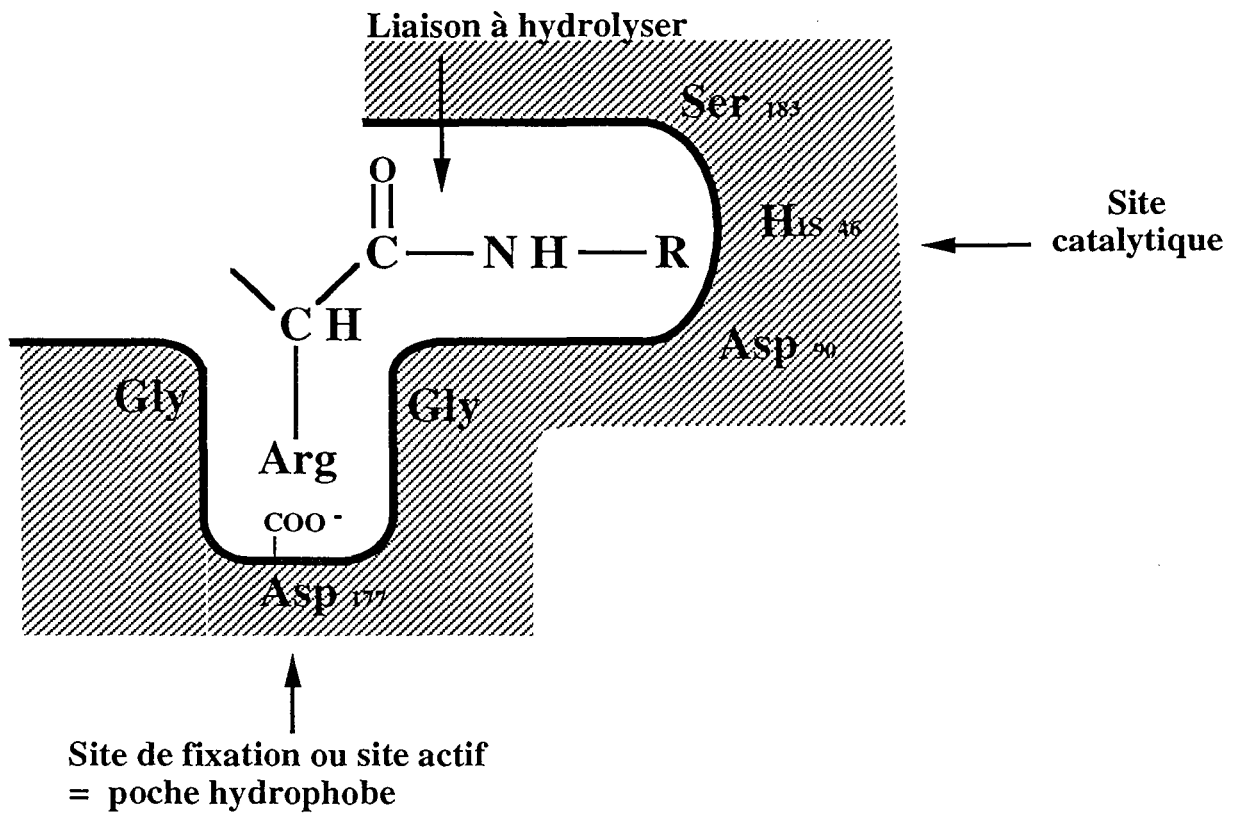


Figure VI.5 : Site catalytique et site de fixation des sérine - protéases
Cas particulier de la trypsine

2-2 LA TRYPSINE

2-2-1 Généralités sur les sérine-protéases

Les sérine-protéases sont des enzymes protéolytiques qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques. Elles interviennent dans la digestion intestinale (trypsine, chymotrypsine, élastase), la coagulation du sang (thrombine), la fibrinolyse (plasmine), les réactions immunitaires (complément)... Elles sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs puis transformées en enzymes dans certaines conditions physiologiques.

Le rôle physiologique des sérine-protéases dépend en particulier de deux sites primordiaux, le **site catalytique** et le **site de fixation**. Ces enzymes sont caractérisées par la présence de trois résidus d'acides aminés dans leur site catalytique, qui sont les résidus **séryle** (Ser), **histidyle** (His) et **aspartyle** (Asp) (13, 14). Elles présentent donc le même mécanisme lors du clivage de la liaison peptidique, en particulier au niveau du site catalytique.

Chaque sérine-protéase présente au sein de son site de fixation au substrat ou site actif, une poche hydrophobe dans laquelle se place l'acide aminé qui participe à la liaison peptidique du substrat à couper comme le montre la figure VI.5. La spécificité de chaque sérine-protéase est induite par une faible variation de structure au niveau du site de fixation et les sérine-protéases ne reconnaissent pas toutes les mêmes substrats.

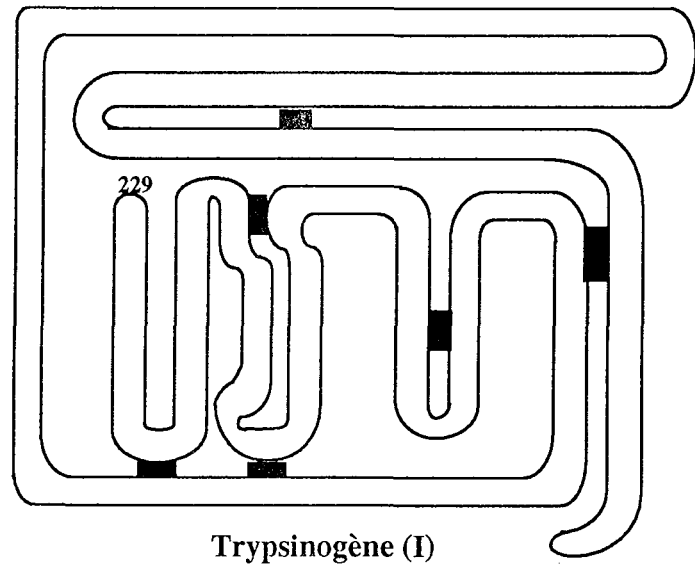
2-2-2 Caractéristiques de la trypsine

2-2-2-1 Formation

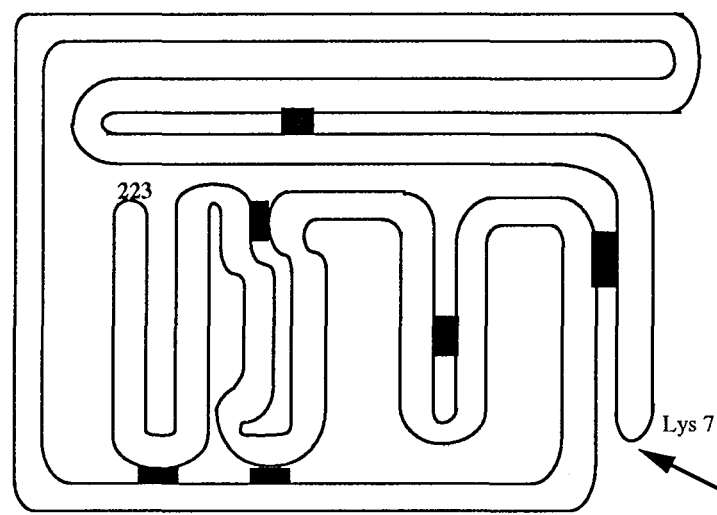
La trypsine est une sérine-protéase qui intervient dans la dégradation des protéines alimentaires au niveau du tube digestif. Son précurseur inactif, le trypsinogène est produit par le pancréas. Puis la transformation en trypsine s'effectue dans le duodénum, catalysée par une glycoprotéine (l'entérokinase), d'autres sérine-protéases, ou par la trypsine elle-même et résulte de la rupture d'une liaison Lys 6 - Lys 7 près du N terminal du zymogène (figure VI.6).

2-2-2-2 Structure (15, 16)

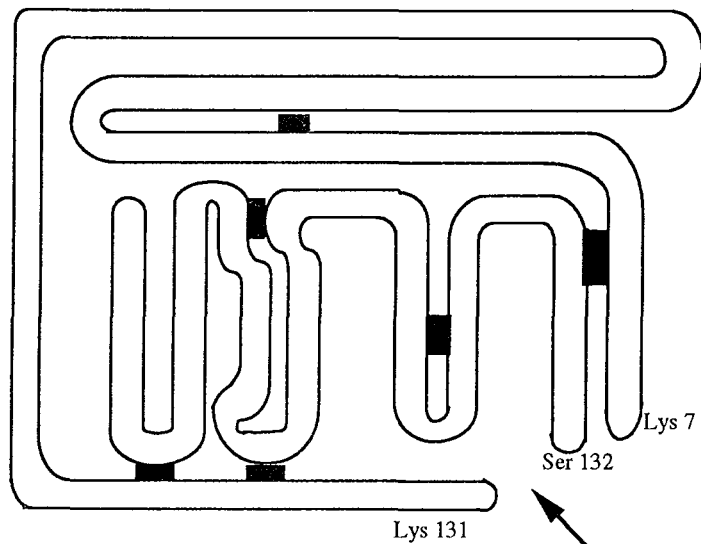
La trypsine est une protéine globulaire formée d'une seule chaîne polypeptidique de 223 acides aminés (cas de la trypsine porcine), repliée sur elle-même par six ponts disulfures. Sa masse molaire est de 23 700 g/mol dans le cas de trypsine porcine avec un pI de 10,8. Sa masse molaire et son point isoélectrique varient légèrement selon son origine. Elle se présente essentiellement sous deux formes α et β . La β -trypsine est majoritaire alors que l' α -trypsine d'activité amidasique plus faible, résulte d'un clivage auto-catalytique de la liaison Lys 131 -



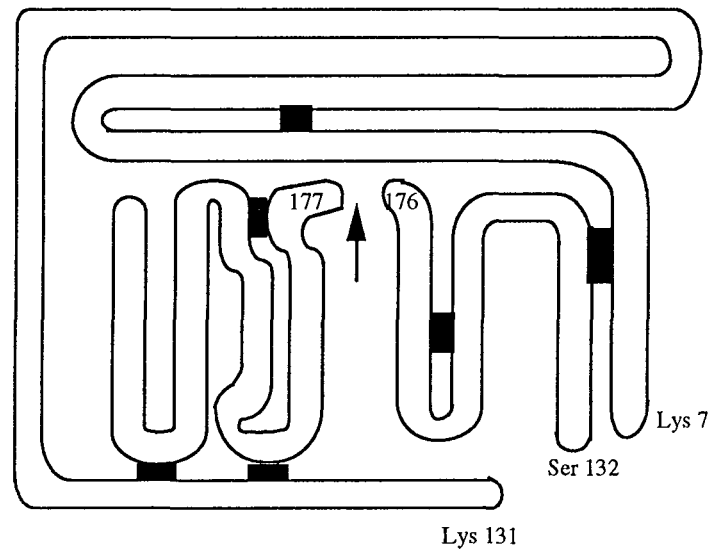
Trypsinogène (I)



β -Trypsine (II)



α -Trypsine (III)



Pseudotrypsine (IV)

Figure VI.6 : Les différentes formes de la trypsine et de son précurseur

Ser 132. De même, l' α -trypsine peut également s'auto-digérer par clivage de la liaison Lys 176 - Asp 177 donnant naissance à la pseudotrypsine peu active. La figure VI.6 représente les différentes formes de la trypsine (de boeuf) et de son zymogène d'après Keil (15).

** Le site catalytique*

Le site catalytique de la trypsine est constitué par trois acides aminés caractéristiques des sérine-protéases qui sont les résidus Ser 83, His 46 et Asp 90. Le mécanisme catalytique des sérine-protéases en général et de la trypsine en particulier se déroule en deux étapes principales (13).

Au cours de la première étape, l'atome d'oxygène du groupe hydroxyle du résidu séryle attaque la fonction carbonyle de la liaison peptidique concernée. Cette acylation de l'enzyme au niveau de la sérine est favorisée par un transfert de proton du groupe hydroxyle de la sérine sur la fonction carboxylate de l'acide aspartique via l'histidine, le résidu aspartique renforçant le caractère nucléophile de la sérine. Puis le proton est transféré de nouveau sur l'atome d'azote de la liaison peptidique via l'histidine et la partie aminée du substrat est alors libérée (RNH_2). Dans un second temps, une molécule d'eau déclenche le processus inverse de l'acylation qui conduit à la libération de la partie acide du substrat et donc à la régénération de l'enzyme.

** Le site de fixation*

Le site de fixation (figure VI.5) ou site actif de la trypsine est constitué de plusieurs acides aminés formant une poche hydrophobe au fond de laquelle un résidu aspartique (Asp 177) est chargé négativement. La présence de ce résidu détermine la spécificité de la trypsine pour les résidus basiques.

2-2-2-3 Propriétés physico-chimiques de la trypsine

Cette enzyme est stable en solution acide, alors que sa dénaturation est irréversible en milieu alcalin. L'activité enzymatique est maximale à pH 8,2.

La trypsine est particulièrement délicate à manipuler en raison de son instabilité soit par dénaturation, soit par apparition de formes secondaires (dégradation auto-catalysée). Ces mécanismes de dégradation dépendent du pH, de la température, d'agents stabilisants, de la présence de certains cations...

Sa solubilité est relativement faible en milieu aqueux et elle a tendance à former des agrégats insolubles.

2-2-2-4 Les substrats de la trypsine

La trypsine catalyse préférentiellement le clivage des liaisons peptidiques impliquant la fonction carboxylique de l'arginine et de la lysine. De plus, l'enzyme présente une affinité plus grande pour la chaîne latérale de l'arginine. La cinétique enzymatique dépend des structures primaires et tertiaires du substrat macromoléculaire. Ainsi une modification de la chaîne latérale de l'arginine ou de la lysine provoque une baisse de l'affinité de la trypsine pour le substrat et une diminution de la vitesse d'hydrolyse.

2-2-2-5 Les ligands

L'affinité de la trypsine vis-à-vis de ses inhibiteurs (ou des substrats) résulte de la combinaison de deux types d'interaction dans le site de fixation :

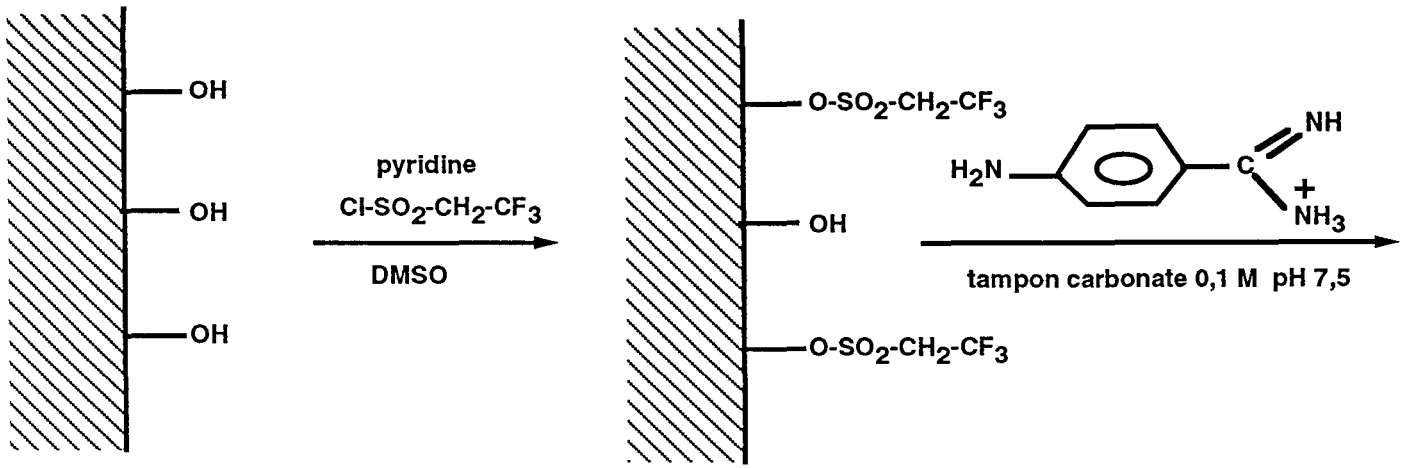
- **une interaction ionique** entre la fonction carboxylate du résidu Asp 177 et un groupe chargé positivement de l'inhibiteur (ou un résidu basique du substrat),
- **des interactions hydrophobes**, établies au sein du site primaire de fixation, participent également à l'interaction enzyme-inhibiteur (enzyme-substrat).

Ainsi, il existe plusieurs sortes d'inhibiteurs spécifiques qui répondent à ces conditions structurales et qui sont utilisables en chromatographie d'affinité de la trypsine (17). Il s'agit d'inhibiteurs d'origine protéique ou synthétique.

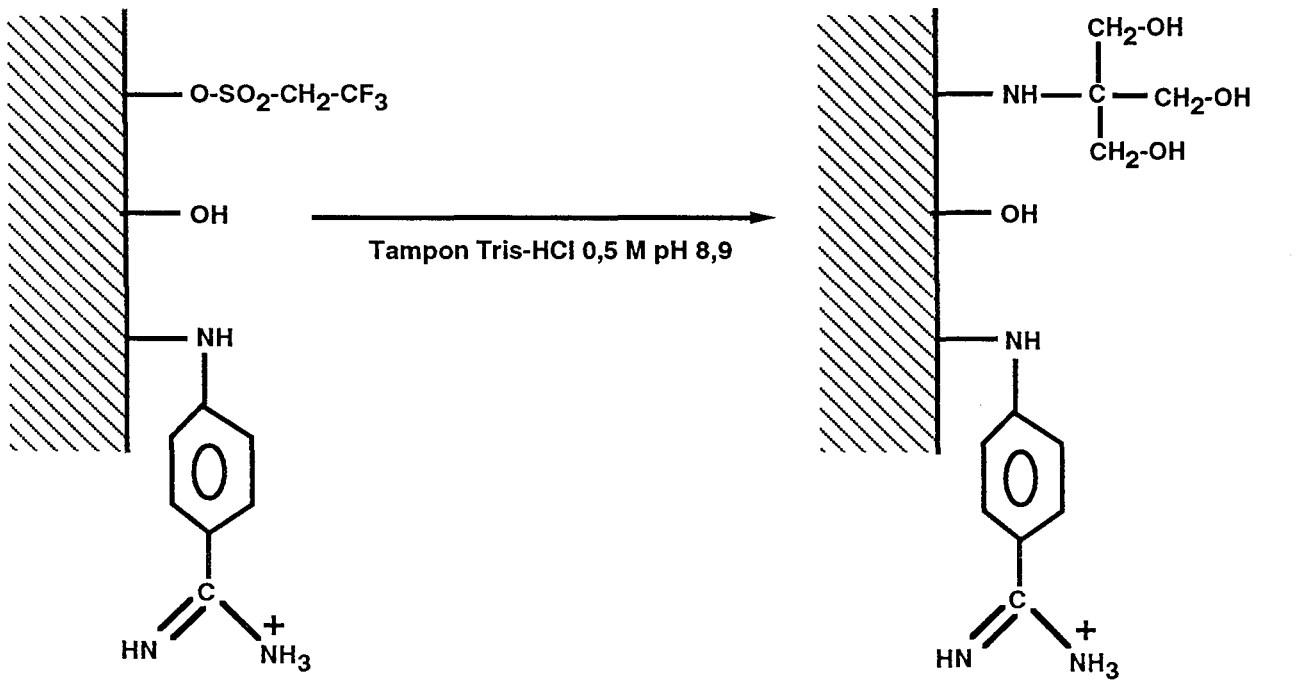
Les inhibiteurs synthétiques de faible masse molaire sont généralement des chaînes aliphatiques ou aromatiques, porteuses d'ion ammonium, guanidinium ou amidinium. Parmi eux, les amidines et particulièrement les benzamidines présentent des constantes d'inhibition très fortes (18). La L-arginine est également un inhibiteur de la trypsine. L'interaction enzyme-inhibiteur peut être renforcée par acylation du groupe carboxyle de la L-arginine, formant par exemple l'ester méthylique de l'arginine.

2-2-3 Chromatographie d'affinité de la trypsine

Séparer la trypsine de ses divers contaminants, en particulier des autres sérine-protéases, est une opération relativement difficile, en raison de la grande analogie structurale des sérine-protéases entre elles. Notamment, la séparation d'un mélange trypsine- chymotrypsine n'est possible que par chromatographie d'affinité, en choisissant des ligands de haute spécificité. Bien que la trypsine puisse être pré-purifiée de différentes façons, l'étape finale qui permet la récupération de la protéine à l'état pur est toujours une étape de chromatographie d'affinité (17).



Dexrane-phénoxy = DexP
 adsorbé à la surface du polystyrène



Dexrane-phénoxy substitué par la p-ABA

Figure VI.7 : Couplage de la p-aminobenzamidine sur le dexrane adsorbé à la surface des billes de PS-DVB

La plupart des supports pour la chromatographie d'affinité de la trypsine décrits dans la littérature ont été fonctionnalisés par des amidines (10, 11, 17, 19).

La p-aminobenzamidine (p-ABA) est la plus couramment utilisée comme ligand spécifique de la trypsine, du fait de sa structure simple et de la présence de sa fonction amine primaire facilitant son greffage sur un grand nombre de matrices, par l'intermédiaire ou non d'un bras espaceur. Certains de ces supports sont commercialisés ; il s'agit par exemple de gels de sepharose 4B-aminocaproyl-pABA (Pierce) et d'agarose trypsin-inhibitor (Sigma) utilisables en basse pression, et des supports d'origine synthétique ASAHIPAK-GS et Toyopearl HW65S utilisables en chromatographie haute performance.

La chromatographie de la trypsine peut être réalisée de deux façons :

- soit **en présence d'inhibiteur compétitif présent dans l'éluant**. Dans ce cas, les temps de rétention de la trypsine sont inversement proportionnels à la concentration en inhibiteur dans l'éluant. L'étude des paramètres de l'interaction (ligand/trypsine/compétiteur) par analyse zonale peut être ainsi réalisée. Néanmoins, la trypsine est récupérée sous forme de complexe enzyme/compétiteur. Ce complexe est dissocié dans certaines conditions et la trypsine est ensuite séparée de son ligand par dialyse ou par SEC.
- soit **par une diminution du pH de l'éluant**, après adsorption de la trypsine sur le support, sachant que la trypsine est stable en milieu acide (17). Ce procédé, de loin le plus simple, est le plus couramment utilisé.

Récemment, la purification de la trypsine a été entreprise sur divers supports de silice poreuse fonctionnalisés par la p-ABA. Dans un premier cas, la silice est préalablement passivée par une couche de dextrane-DEAE (11), puis la p-ABA est fixée sur le dextrane par l'intermédiaire d'une carbodiimide. Dans un autre cas, la silice est recouverte par un copolymère de N-vinylpyrrolidone et de chloroformiate de vinyle (10) ; ce dernier co-monomère très réactif permet la fixation de la p-ABA. Dans ces deux cas, l'influence des caractéristiques structurales de la silice sur la purification de la trypsine a été considérée.

2-3 PRÉPARATION DES SUPPORTS D'AFFINITÉ

Des supports d'affinité de la trypsine ont été préparés à partir des matériaux PS-DexPB dans lesquels le dextrane adsorbé possède un taux élevé de groupes phénoxy (> 0,50 mmol de phénoxy/g de dextrane). La première étape de la préparation consiste à activer les fonctions hydroxyles du dextrane par un agent de couplage classique tel que le chlorure de trétylène. La deuxième étape consiste à coupler la p-aminobenzamidine dans des conditions appropriées. Enfin, une étape de désactivation est nécessaire pour éliminer les groupes trétyles résiduels, particulièrement hydrophobes. Le schéma réactionnel est donné sur la figure VI.7.

2-3-1 Activation

1g de billes recouvertes ($\Gamma = 1,60 \text{ mg/m}^2$ de PS-DVB) est lavé successivement par des mélanges eau-acétone (25 mL) en pourcentages croissants en acétone jusqu'à 100 % d'acétone anhydre. Les particules sont mises en suspension dans 25 mL d'acétone anhydre contenant 2,7 mol pyridine / mol chlorure de trétylène. Dans ces conditions, trois supports (respectivement PS-DexPB-pABA_{1, 2 et 3}) ont été activés en présence de quantités variables de chlorure de trétylène soient 2,25 - 4,50 et 9,0 mmol/g de support. Les suspensions sont agitées par rotation à température ambiante. Après 2 heures de réaction, les billes sont d'abord lavées avec de l'acétone anhydre (25 mL) puis avec des mélanges acétone-acide chlorhydrique 1 mM jusqu'à 100 % d'HCl.

2-3-2 Couplage de la p-aminobenzamidine et désactivation

La p-ABA (4,55 mmol/g de support) est couplée aux supports activés (1 g) dans 25 mL de tampon carbonate à 0,1 M à pH 7,5 pendant 48 heures à température ambiante. Le pH initial est ajusté par addition de soude 1 M. Les supports sont récupérés par filtration, lavés à l'eau puis désactivés dans un tampon Tris-HCl 0,5 M à pH 9 pendant 48 heures.

2-3-3 Remplissage des colonnes

Des colonnes en PEEK (50 x 4,6 mm de diamètre interne) sont remplies des particules différemment fonctionnalisées au moyen d'une buse de remplissage pendant 30 minutes à 0,6 mL/min, puis conditionnées en tampon phosphate à 0,05 M, pH 7 en présence de NaCl 0,1 M.

2-4 DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES D'AFFINITÉ

Au cours de cette étude, les constantes d'association trypsine/p-ABA ont été évaluées par analyse zonale en présence d'un ligand soluble (L-arginine méthyl ester). La détermination de la capacité d'adsorption des divers supports en trypsine a été réalisée par analyse frontale .

2-4-1 Évaluation des interactions non spécifiques

Pour vérifier que la présence de la p-aminobenzamidine fixée n'engendre pas d'interactions non spécifiques, l'élution de certaines protéines sur les supports fonctionnalisés a été entreprise. Pour ce faire, les protéines choisies sont relativement hydrophobes, acides (albumine de sérum bovin) ou basiques (α -chymotrypsine et lysozyme).

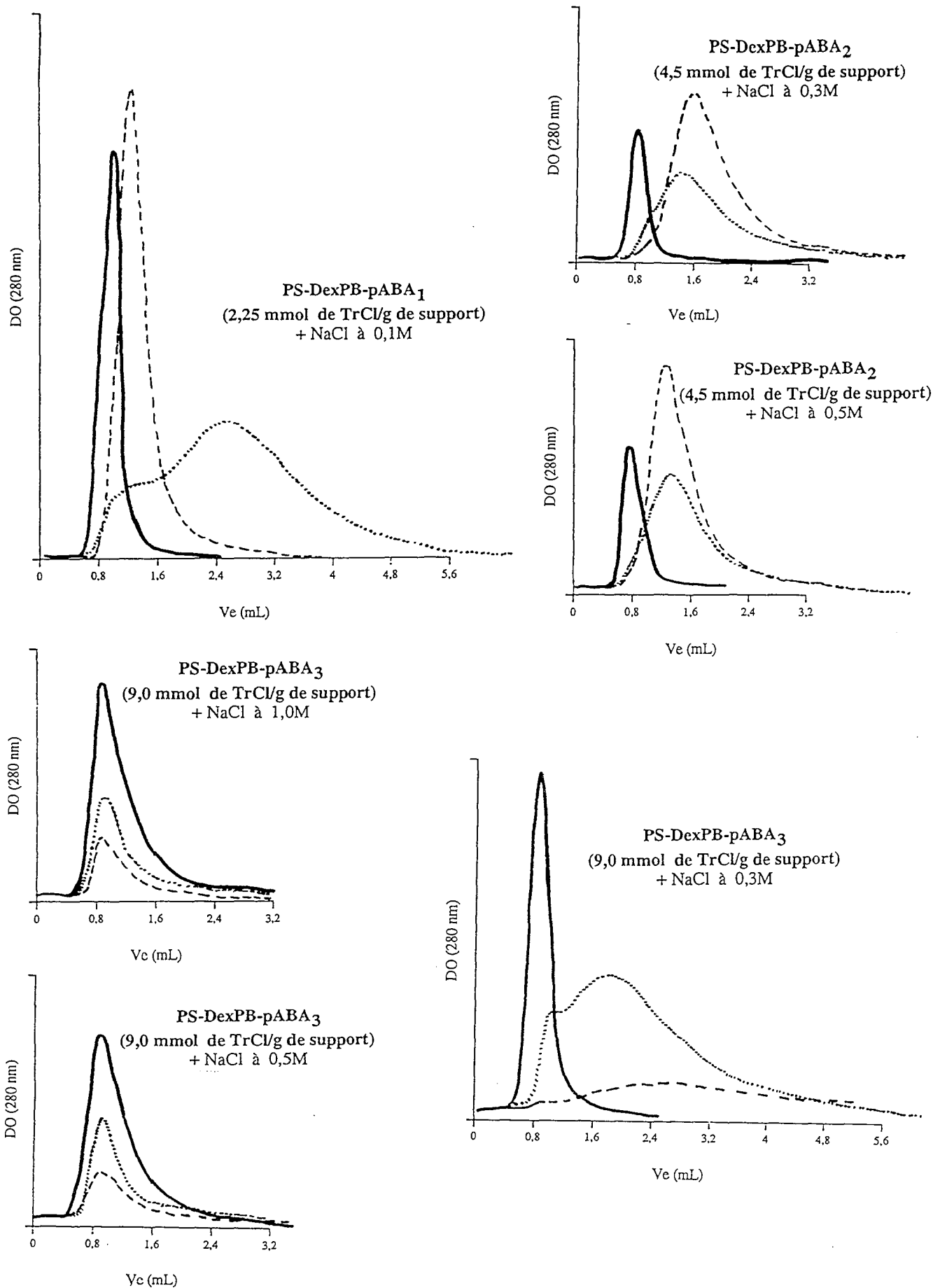


Figure VI.8 : Evaluation des interactions non spécifiques sur les diverses colonnes (50x4,6 mm D.I.) en milieu phosphate 0,05 M pH 7 en présence de NaCl à différentes concentrations

- albumine
- α -chymotrypsine
- - - - - lysozyme

Notre démarche a consisté à optimiser la concentration saline de l'éluant de façon à minimiser les interactions ioniques, sans pour autant exacerber les interactions hydrophobes, et cela pour chaque support fonctionnalisé.

Les profils chromatographiques à pH 7 de ces protéines sont représentés sur la figure VI.8 en fonction de la nature du support et de la concentration en chlorure de sodium ajouté dans l'éluant. Les pourcentages de protéines éluées (à 0,4 mL/min) sont donnés dans les tableaux VI.5 a, b, c.

(a) : % de protéine éluée sur le support PS-DexPB-pABA ₁			
[NaCl] en M	albumine	α -chymotrypsine	Lysozyme
0,1	90	85	100

(b) : % de protéine éluée sur le support PS-DexPB-pABA ₂			
[NaCl] en M	albumine	α -chymotrypsine	Lysozyme
0,1	91	57	22
0,3	89	80	95
0,5	92	87	90

(c) : % de protéine éluée sur le support PS-DexPB-pABA ₃			
[NaCl] en M	albumine	α -chymotrypsine	Lysozyme
0,1	59	≈ 11	≈ 5
0,5	70		
1,0	79		

Tableau VI.5 : Pourcentages d'éluion des protéines sur divers supports fonctionnalisés par la p-ABA en fonction de la concentration en NaCl dans l'éluant (pH 7). Avec (a) TrCl à 2,25 mmol/g de support, (b) TrCl à 4,5 mmol/g de support et (c) TrCl à 9 mmol/g de support.

Les protéines basiques (α -chymotrypsine et lysozyme) sont toujours éluées à pH 7 avec des coefficients de distribution K supérieurs à 1 quels que soient le support et la concentration saline considérée. A concentration saline équivalente, la rétention des protéines est plus importante sur les supports les plus fonctionnalisés.

En première approche, la rétention des protéines basiques s'explique vraisemblablement par la présence d'interactions hydrophobes entre ces protéines et les noyaux aromatiques des molécules de p-aminobenzamidine immobilisées.

Cependant, l'augmentation de la force ionique conduit, dans certains cas, à une augmentation du pourcentage de protéine éluée et à une diminution des volumes de rétention. Il est alors possible que des interactions de type ionique contribuent également à la rétention des protéines.

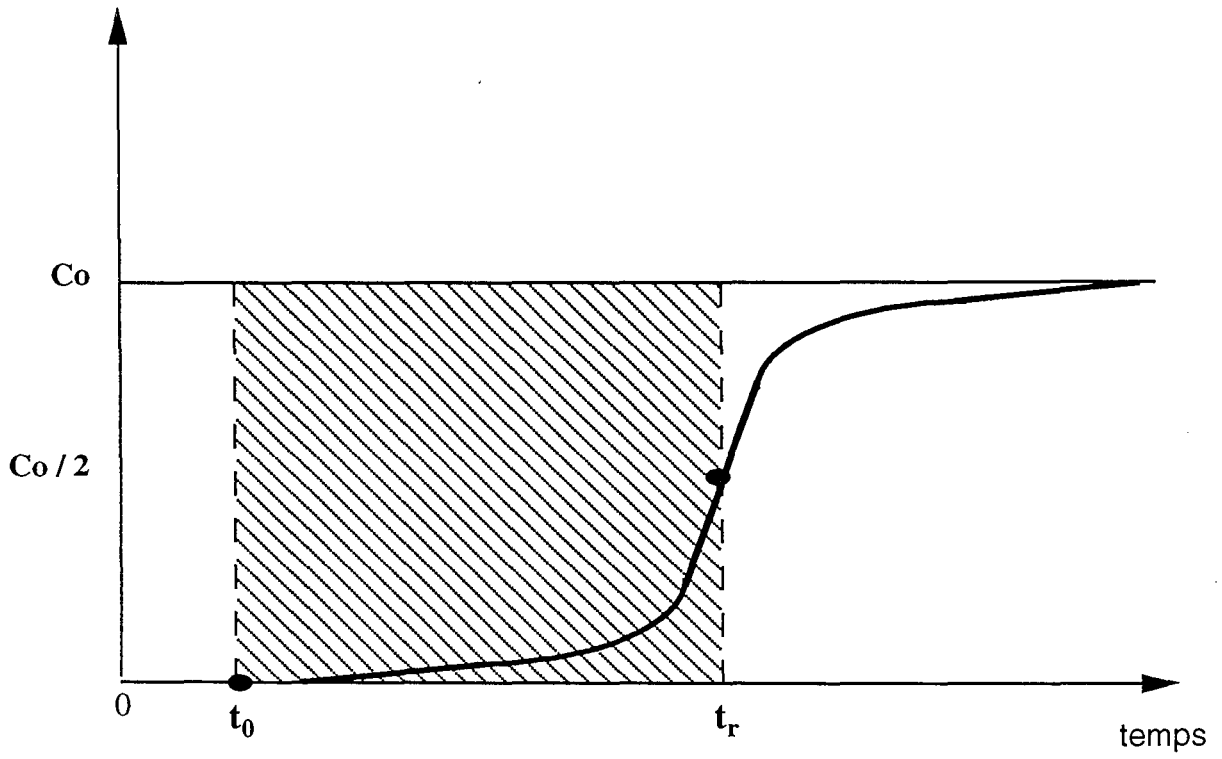


Figure VI.9 : Isotherme d'adsorption d'un soluté en analyse frontale

En ce qui concerne les protéines basiques, ces interactions pourraient être liées à la présence de charges négatives sur le dextrane-phénoxy adsorbé à la surface du polystyrène.

L'albumine, chargée négativement à pH 7, pourrait interagir avec les supports non seulement par le biais d'interactions hydrophobes (noyaux aromatiques du ligand) mais aussi par le biais d'interactions ioniques liées à la présence des groupes amidiniums du ligand.

Il ressort donc de cette étude les conclusions suivantes :

- Aucune condition d'élution satisfaisante n'a été obtenue pour le support PS-DexPB-pABA₃, supposé être le plus riche en ligand greffé. L'évaluation des paramètres d'affinité sur ce support ne sera donc pas entreprise, en raison d'adsorptions non spécifiques trop importantes.
- Le support PS-DexPB-pABA₂ nécessite l'utilisation d'une concentration élevée (0,5 M) en NaCl dans l'éluant, pour que les trois protéines soient éluées quantitativement.
- De toute évidence, le support PS-DexPB-pABA₁ est le moins hydrophobe et le moins chargé puisqu'une concentration en NaCl de 0,1 M suffit pour obtenir des éluions quantitatives.

La trypsine est retenue spécifiquement sur les supports (PS-DexPB-pABA₁ et 2), dans les conditions précédemment déterminées alors que l' α -chymotrypsine, sérine-protéase de structure très proche de celle de la trypsine est éluee. Ces supports présentent donc une spécificité pour la trypsine.

2-4-2 Analyse frontale

2-4-2-1 Détermination de la capacité d'adsorption Q_x

La capacité d'adsorption en trypsine des supports est évaluée dans les conditions dynamiques par analyse frontale. La trypsine, dissoute dans l'éluant d'adsorption (pH neutre ou légèrement basique) percole en continu le support et se fixe progressivement sur la p-ABA immobilisée jusqu'à saturer tous les sites accessibles. L'isotherme d'adsorption d'un soluté en analyse frontale est représentée sur la figure VI.9 ; le plateau de saturation est atteint lorsque la concentration du soluté dans la phase mobile effluente est égale à la concentration initiale. La capacité d'adsorption effective, notée Q_x est calculée d'après l'équation suivante [1] sachant que théoriquement, une molécule de trypsine interagit avec une molécule de ligand fixée :

$$Q_x \text{ (en mol)} = \frac{(t_r - t_0) \times [\text{Trypsine}]_0 \times \text{débit}}{M} \quad [1]$$

avec : t_r : temps de rétention à 50 % du front d'élution

t_0 : temps d'élution de la trypsine dans des conditions de non-rétention

$[\text{Trypsine}]_0$: concentration initiale de la trypsine dans la phase mobile

M : masse moléculaire de la trypsine

La capacité effective Q_x est très souvent différente de la capacité théorique, obtenue par détermination de la concentration en ligand fixé. Q_x dépend principalement de l'accessibilité du ligand et de la présence ou non d'interactions non-spécifiques. Si l'état d'équilibre n'est pas atteint, Q_x dépendra également de la vitesse à laquelle la protéine va diffuser dans la phase stationnaire et interagir avec son ligand.

C'est pourquoi, avant de déterminer Q_x , il est nécessaire de vérifier préalablement l'absence d'interactions non spécifiques entre le ligand et la protéine à purifier et de travailler à faible débit, de façon à atteindre les conditions d'équilibre.

2-4-2-2 Conditions expérimentales

La capacité d'adsorption des supports fonctionnalisés (PS-DexPB-pABA₁ et 2) a été déterminée en tampon phosphate 0,05 M, à pH 7 en présence de NaCl (0,1 et 0,5 M respectivement). Le débit est fixé à 0,3 mL/min. Deux concentrations différentes en trypsine pure (Sigma, T0134) dans la phase mobile ont été utilisées à savoir 0,5 et 2 g/L. La détection s'effectue à 295 nm pour éviter la saturation du détecteur.

Après saturation des colonnes (50 x 4,6 mm de D. I.), la trypsine est éluée en tampon glycine-HCl 0,1 M, pH 2,8 à 0,4 mL/min.

2-4-3 Analyse zonale

2-4-3-1 Détermination des constantes d'association

La détermination des paramètres d'affinité nécessite une adsorption réversible de la protéine sur le support étudié, obtenue en ajoutant un compétiteur soluble dans l'éluant.

Dünn et Chaiken (20, 21) ont établi en chromatographie linéaire une relation simple entre le volume de rétention de la protéine et les constantes d'affinité protéine/ligand immobilisé et protéine/ligand soluble.

Nous proposons d'exposer leur théorie développée ici dans le cas d'un système monovalent, c'est-à-dire à un seul site de fixation (cas de la trypsine). La protéine notée A peut interagir avec le ligand fixé sur le support noté X et avec le ligand en solution appelé L. Ces interactions sont régies chacune par un équilibre thermodynamique auquel correspond une constante d'association (exprimée en $L \cdot mol^{-1}$), aucune interaction entre les ligands L et X n'étant possible.

Les équilibres établis sont les suivants :



Les expressions respectives des constantes sont :

$$K_{AX} = \frac{[AX]}{(A) [X]} \qquad \text{et} \qquad K_{AL} = \frac{(AL)}{(A) (L)}$$

où les concentrations $[X]$ et $[AX]$ représentent les concentrations (en mol/g de support) du ligand immobilisé sous forme libre et associée à la trypsine. Les autres concentrations correspondent aux diverses espèces présentes en solution.

Si on appelle $(A)_t$, la concentration totale (en mol/L) de la protéine dans la phase mobile, son expression peut s'écrire :

$$(A)_t = (A) + (AL) = (A) (1 + K_{AL}(L)) \qquad [2]$$

Si Q_{At} est la quantité totale de protéine adsorbée sur le support (en mol) alors on peut l'exprimer de la façon suivante (S étant la surface spécifique du support) :

$$Q_{At} = [AX] S = K_{AX} (A) [X] S \qquad [3]$$

Sachant que Q_x , la quantité de ligand actif immobilisé sur le support (en mol) a pour expression :

$$\begin{aligned} Q_x &= ([X] + [AX]) S \\ Q_x &= ([X] (1 + K_{AX} (A))) S \end{aligned} \qquad [4]$$

$$\text{d'où } [X] = \frac{Q_x}{S(1 + K_{AX} (A))} \qquad [5]$$

En combinant, les équations [2] et [5], l'expression [3] de Q_{At} devient alors :

$$Q_{At} = \frac{Q_x (A)_t K_{AX}}{1 + (A)_t K_{AX} + (L) K_{AL}} \qquad [6]$$

On reconnaît alors l'équation d'une isotherme de partage de la protéine entre la phase liquide et la phase solide. Il s'agit d'une isotherme de Langmuir de la forme :

$$Q_{At} = \frac{K \cdot (A)_t Q_x}{1 + K (A)_t} \qquad [7] \qquad \text{avec } K = \frac{K_{AX}}{1 + (L) K_{AL}}$$

L'établissement d'une relation entre l'isotherme de partage et le volume de rétention en élution zonale repose sur des conditions de linéarité, c'est-à-dire que le volume de rétention doit être indépendant de la quantité de protéine injectée et du débit de l'éluant. Ainsi pour une dilution infinie (ou faible volume injecté), le volume de rétention V_z de la protéine correspondant à la partie linéaire de l'isotherme à l'origine, est donné par :

$$V_z - V^* = \frac{\delta Q_{At}}{\delta(A)_t} = \frac{K_{AX} Q_x}{1 + (L)_t K_{AL}} \quad [8]$$

V^* est le volume d'élution de la protéine, mesuré dans des conditions de non-rétention.

Sachant que $(L)_t = (L) + (AL) \approx (L)$, on obtient :

$$\frac{1}{V_z - V^*} = \frac{1}{K_{AX} Q_x} + \frac{(L) K_{AL}}{Q_x K_{AX}} \quad [9]$$

L'équation [9] traduit la relation linéaire entre $1/(V_z - V^*)$ en fonction de la concentration du ligand soluble dans l'éluant à Q_x constante et conduit à la détermination de K_{AL} par le rapport de la pente à l'ordonnée à l'origine. La détermination de K_{AX} nécessite la connaissance de la quantité de ligand actif immobilisé.

2-4-3-2 Conditions expérimentales

Le compétiteur soluble choisi pour cette étude est l'ester méthylique de l'arginine dont les interactions avec la trypsine sont très fortes. Sa structure chimique est représentée sur la figure VI.10.

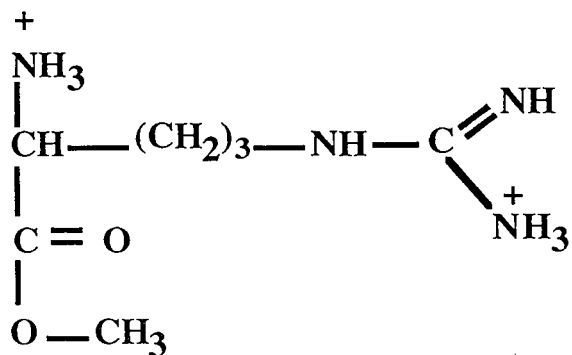


Figure VI.10: Formule de l'ester méthylique de l'arginine

DO (280 nm)

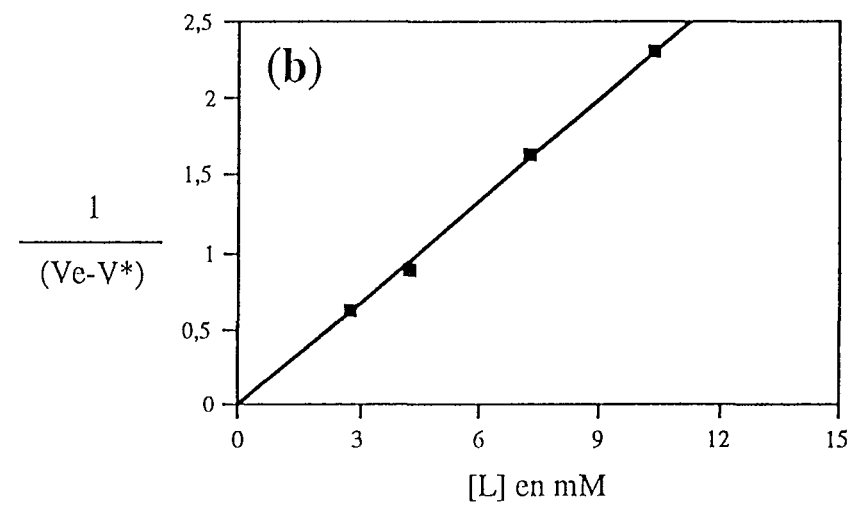
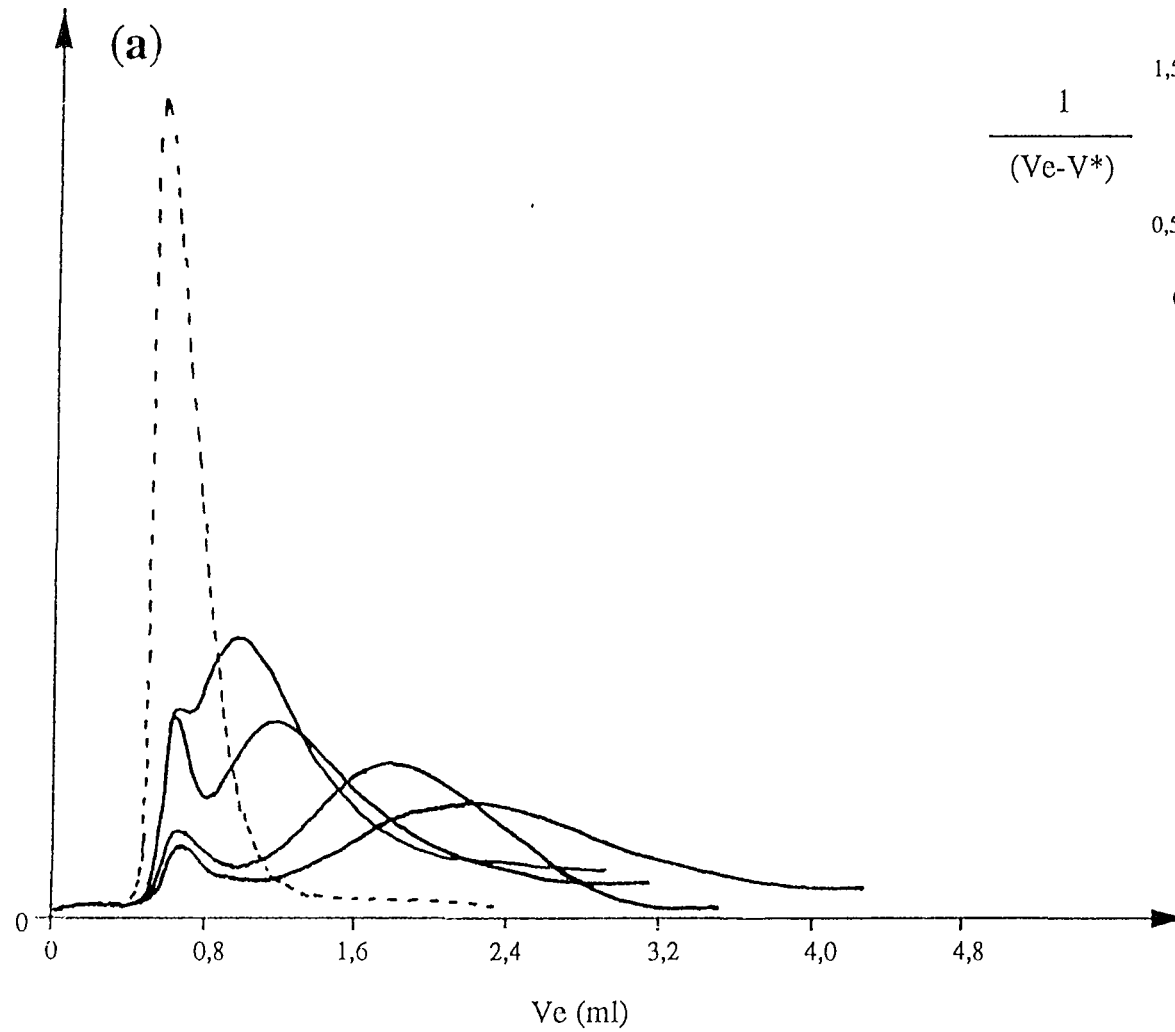


Figure VI.11 : Elution de la trypsine sur le support PS-DexPB-pABA₁ (2,25 mmol de chlorure de trétyl/g de support) à pH 7 en présence d'ester méthylique de l'arginine à différentes concentrations (2,75 - 4,40 - 7,25 - 10,40 mM).

(a) : Profils chromatographiques de la trypsine

(b) : Application du modèle de Chaiken

Ce compétiteur est dissous dans l'éluant (tampon phosphate 0,05 M, pH 7 + NaCl 0,1 M) à des concentrations comprises entre 2 et 10 mM. Les éluions isocratiques de la trypsine en analyse zonale sont réalisées sur le système CLHP décrit au cours du chapitre précédent (chapitre V.3), le volume injecté étant de 20 μ L. L'applicabilité du modèle de Chaiken repose sur des conditions d'indépendance du volume de rétention avec la quantité d'enzyme injectée et le débit de l'éluant. Dans notre cas, les conditions de linéarité sont vérifiées pour une concentration en trypsine comprise entre 0,25 et 0,6 g/l et un débit compris entre 0,2 et 0,4 mL/min. En deçà de ces conditions, l'imprécision sur le volume de rétention devient trop grande et la limite de sensibilité du détecteur est atteinte.

2-4-4 Résultats et discussion

Les capacités d'adsorption en trypsine des supports PS-DexPB fonctionnalisés ont été mesurées par analyse frontale dans des conditions d'adsorption spécifique et sont identiques quelle que soit la concentration en trypsine dans l'éluant utilisée.

La détermination des constantes d'équilibre à partir des profils chromatographiques a été réalisée en analyse zonale en choisissant l'ester méthylique de l'arginine comme compétiteur soluble. Les résultats obtenus figurent dans le tableau VI.6 ci-dessous :

Support	Chlorure de trétyl (en mmol/g de support)	Conditions d'éluion	Q _x (mol)	K _{AX} (l/mol)	K _{AL} (l/mol)
PS-DexPB-pABA ₁	2,25	tampon phosphate à 0,05 M, pH 7 + [NaCl] 0,1 M	1,60.10 ⁻⁷	1,04.10 ⁶	3,7.10 ⁴
PS-DexPB-pABA ₂	4,50	tampon phosphate à 0,05 M, pH 7 + [NaCl] 0,5 M	0,92.10 ⁻⁷	0,11.10 ⁶	0,4.10 ⁴

Tableau VI.6 : Détermination des paramètres d'affinité de la trypsine sur les supports PS-DexPB fonctionnalisés par la p-aminobenzamidine

L'influence de la concentration en ligand soluble sur le volume de rétention de la trypsine est caractéristique des équilibres qui s'établissent lors du processus chromatographique. La connaissance de la quantité de p-ABA active immobilisée sur les supports ou Q_x permet de déterminer les constantes d'association selon le modèle de Chaiken (équation [8]). Les figures VI.11 et 12 représentent les profils chromatographiques de la trypsine obtenus sur les supports fonctionnalisés et la relation de 1/(V_z - V*) en fonction de la concentration en ester méthylique de l'arginine dans l'éluant.

Sur les deux supports, l'éluion de la trypsine en présence de compétiteur (à faible concentration) est représentée par deux pics (épaulés ou séparés). Le premier pic, élué à V*, correspond vraisemblablement à une fraction de trypsine dénaturée.

DO (280 nm)

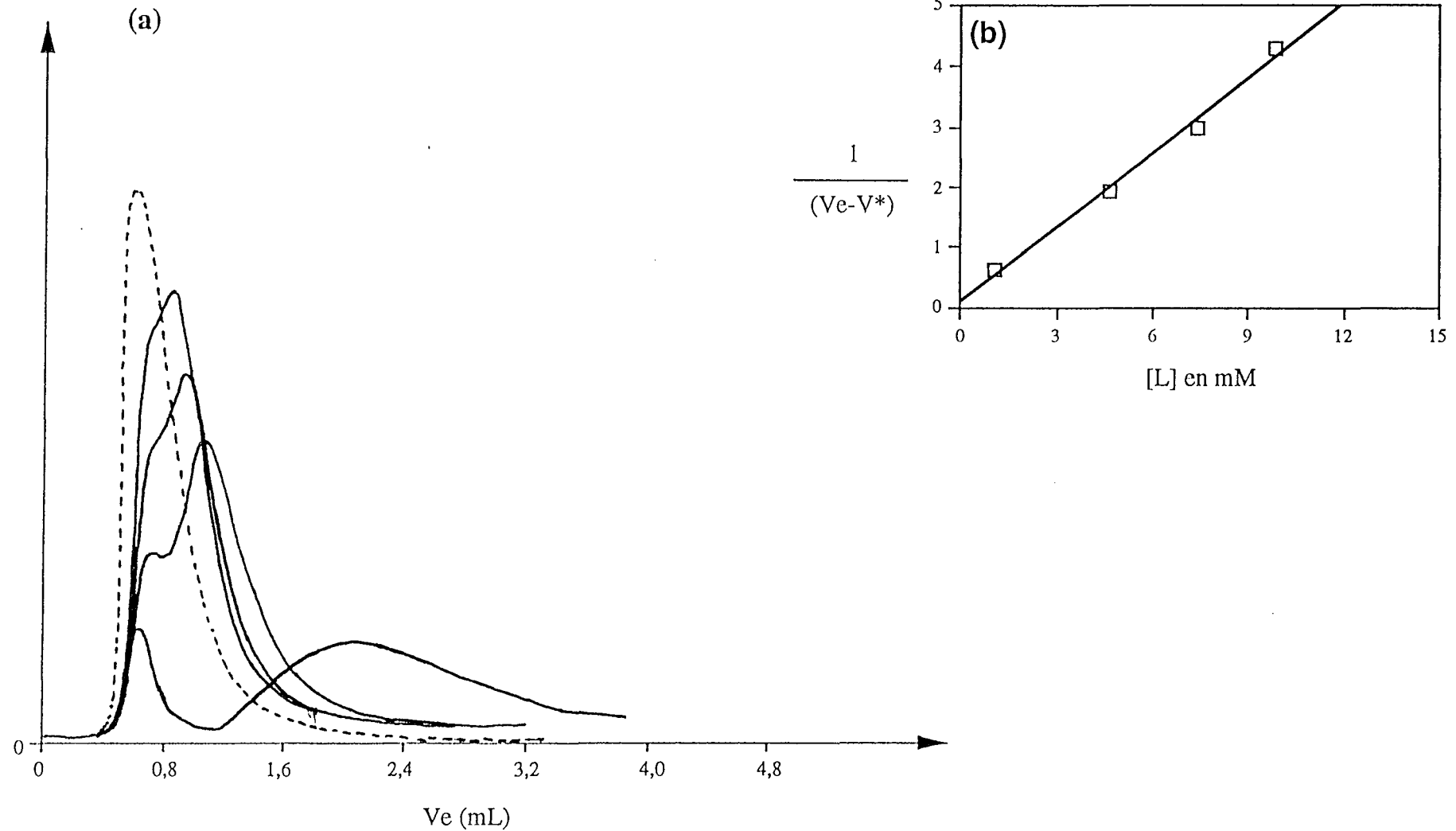


Figure VI.12: Elution de la trypsine sur le support PS-DexPB-pABA₂ (4,50 mmol de chlorure de trétyl/g de support) à pH 7 en présence d'ester méthylique de l'arginine à différentes concentrations (1,10 - 4,60 - 7,40 - 9,90 mM).

(a) : Profils chromatographiques de la trypsine

(b) : Application du modèle de Chaiken

L'obtention de relations linéaires, dans des conditions expérimentales fixées pour chaque support, montrent que les systèmes étudiés vérifient le modèle de Chaiken dans des conditions de linéarité relativement restreintes.

Dans le cas du support PS-DexPB-pABA₁, les valeurs de la capacité d'adsorption en trypsine et de la constante d'association K_{AX} sont plus élevées que celles correspondantes au support PS-DexPB-pABA₂, alors que la capacité théorique est supposée plus faible. Par ailleurs, il faut noter que K_{AL} est également plus élevée pour le premier support testé. Néanmoins, il convient de souligner que ces différentes grandeurs expérimentales ont été déterminées dans des conditions de concentrations salines différentes et la présence de sels semble défavoriser les interactions enzyme-ligand, que le ligand soit ou non fixé sur le support.

Concernant le support PS-DexPB-pABA₁, les valeurs des constantes d'association K_{AX} et K_{AL} obtenues sont du même ordre de grandeur que celles déjà mentionnées dans la littérature (11, 19).

2-5 EXEMPLES DE PURIFICATION DE LA TRYPSINE

La purification de diverses solutions de trypsine a été réalisée sur la colonne PS-DexPB-pABA₁ (2,25 mmol de TrCl/g de support).

2-5-1 Conditions expérimentales

2-5-1-1 Éluion de la trypsine

Les solutions de trypsine sont injectées sur le support en tampon phosphate 0,05 M à pH 7 en présence de chlorure de sodium 0,1 M. Le débit de l'éluant est fixé à 0,4 mL/min. La désorption de la trypsine spécifiquement adsorbée est réalisée en présence de tampon glycine 0,1 M à pH 2,8 et en présence de NaCl 0,1 M.

2-5-1-2 Dosage de la concentration de trypsine

La trypsine utilisée pour cette étude est d'origine porcine (Sigma) dite pure 96 % (T 0134) ou impure (T 8128). Les solutions de trypsine purifiée sont dosées en UV à 280 nm au moyen d'une courbe d'étalonnage établie à partir d'une solution de trypsine pure avec ϵ égal à 1,17 L.g⁻¹.cm⁻¹ en glycine 0,1 M, pH 2,8 avec NaCl 0,1M.

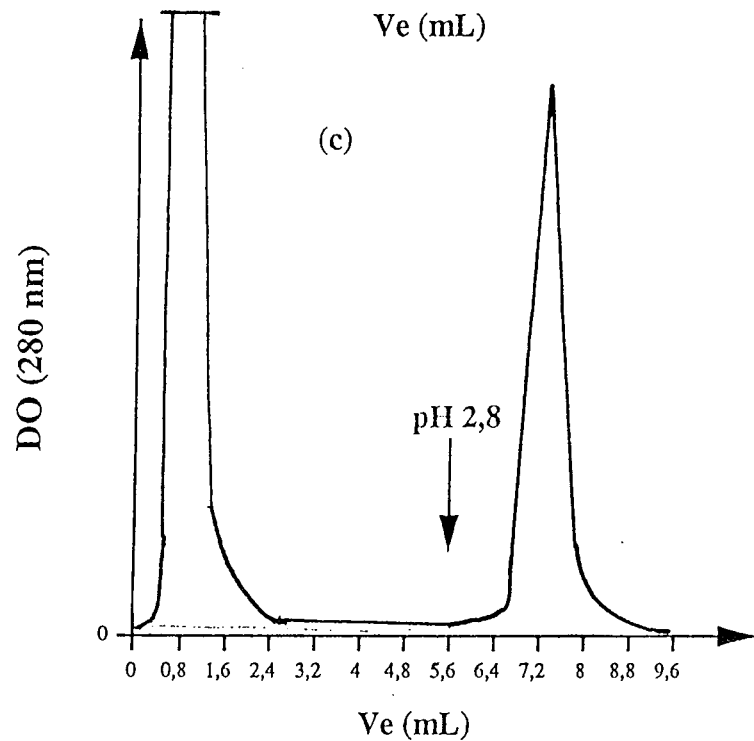
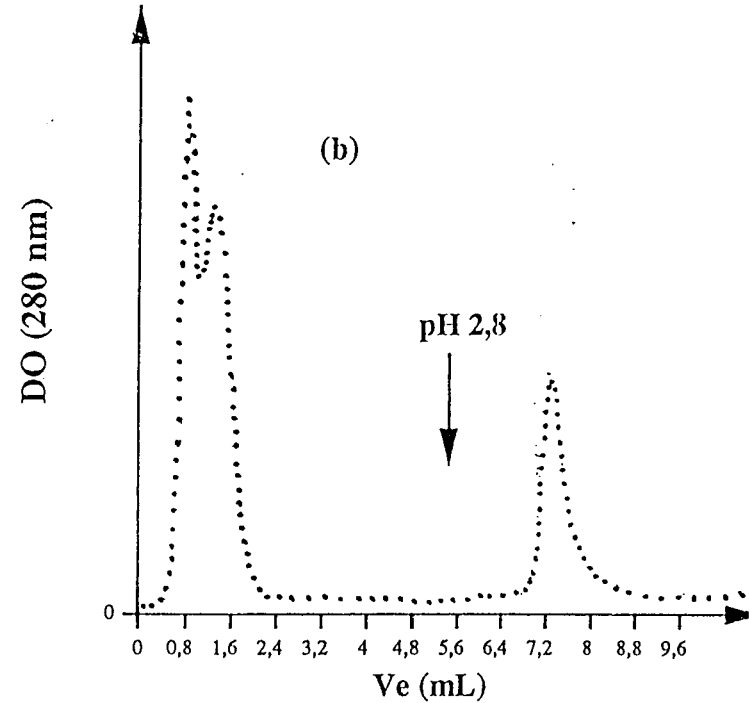
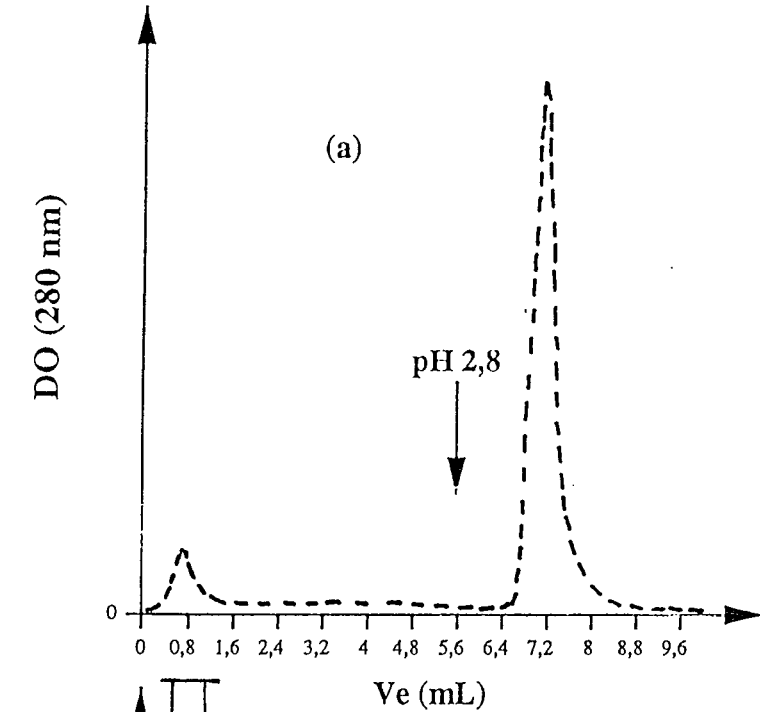


Figure VI.13 : Purification de la trypsin sur le support PS-DexPB-pABA₁

(50 x 4,6 mm de D.I.).

Conditions : élution : Tampon phosphate à 0,05 M pH 7 - NaCl 0,1 M

désorption : Tampon glycine 0,1 M pH 2,8 - NaCl 0,1 M

débit : 0,4 mL/min

Injections de : trypsin pure (Sigma, T 0134) - - - - (a)

trypsin impure (Sigma, T 8128) (b)

mélange trypsin pure / albumine (1 / 3,5 en poids) ——— (c)

2-5-1-3 Dosage de l'activité amidasique

L'activité enzymatique a été déterminée par un substrat chromogénique : N-benzoyl-L-arginine-4-nitroaniline, 2HCl commercialisé par Merck. En présence de trypsine, le substrat est hydrolysé et libère la p-nitroaniline de coloration jaune.

Le dosage de l'activité amidasique a été réalisé dans les conditions suivantes : 300 µL de tampon phosphate 0,3 M, pH 8 et 200 µL de solution de trypsine en glycine 0,1 M, pH 2,8 sont ajoutés à 2,5 mL de substrat 4 mM en solution dans l'eau. La vitesse d'hydrolyse du substrat ($\Delta DO/min$) est déterminée à 405 nm pendant les cinq premières minutes de réaction, à température ambiante. La concentration en trypsine est comprise entre 15 et 25 µg/mL afin d'avoir une sensibilité suffisante et d'éviter une vitesse d'hydrolyse excessive ($\Delta DO/min < 0,2$).

Ainsi le calcul de l'activité enzymatique s'effectue de la façon suivante :

$$IU/mg = \frac{V_{tryp} \cdot \Delta DO/min \cdot 10^6}{V_t \cdot \epsilon \cdot C \cdot l}$$

- avec
- V_{tryp} : volume de la solution de trypsine (0,2 mL)
 - V_t : volume total de la solution de dosage (3,0 mL)
 - C : concentration de la solution de trypsine (15 à 25 µg/mL)
 - l : longueur du trajet optique (1 cm)
 - ϵ : coefficient d'extinction molaire de la p-nitroaniline ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

1 IU est définie par la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute. La détermination de l'activité enzymatique dépend des conditions de dosage ; afin de pouvoir comparer les résultats entre eux, toutes les mesures doivent donc être effectuées dans des conditions rigoureusement identiques.

2-5-2 Purification

Les figures VI.13 a, b, c représentent les éluions isocratiques de 3 solutions différentes de trypsine pure (Sigma, T0134), trypsine impure (Sigma, T8128) et un mélange trypsine/albumine détectées à 280 nm. Le changement d'éluant est imposé après 3 minutes (soit à 1,2 mL), le tampon de désorption parvient en tête de colonne au bout de 14 minutes (soit à 5,6 mL).

Les chromatogrammes relatifs aux trois solutions de trypsine présentent un premier pic (à $V \approx 0,6 - 0,7$ mL) correspondant aux protéines non retenues; un second pic, correspondant à la trypsine, est obtenu lorsque le tampon glycine est appliqué sur la colonne.

Le premier pic, de très faible intensité pour la solution de trypsine pure, est majoritaire dans le cas de la trypsine impure soit $\approx 80\%$ de la quantité totale de protéine injectée. Il peut être attribué en partie, à la présence de forme(s) de trypsine dénaturée(s) donc non active(s) et/ou de chymotrypsine. L'élution du mélange de protéines (trypsine/BSA) à pH 7 conduit logiquement à l'obtention d'un pic important d'albumine non retenue. Dans les trois cas, le premier pic possède une activité enzymatique nulle.

Le second pic obtenu par désorption de la trypsine à pH acide, dont l'activité enzymatique est donnée dans le tableau VI.7, correspond à la fraction de trypsine spécifiquement adsorbée sur le support à pH 7. L'activité enzymatique est récupérée quantitativement, quelle que soit la solution initiale de trypsine considérée. Les taux de purification de la trypsine impure ou de celle issue du mélange sont satisfaisants.

Ces diverses mesures d'activité biologique ont démontré la haute spécificité du support PS-DexPB-pABA₁ pour la trypsine après immobilisation de p-aminobenzamidine. De surcroît, malgré une utilisation intensive, ce dernier s'est avéré parfaitement stable et régénérable, critères particulièrement requis pour la chromatographie d'affinité.

Solution injectée	Quantité de protéine injectée	Quantité de trypsine récupérée (mg)	Activité Enzymatique de la solution initiale		Activité Enzymatique de la solution purifiée		% d'activité récupérée	Taux de purification $\frac{\text{IU final}}{\text{IU initial}}$
	(mg)		en IU/mg	Nombre total de IU	en IU/mg	Nombre total de IU		
trypsine pure [tryp] ^a = 2,42 g/L	0,727	0,708	0,47	0,33	0,49	0,35	106	1,02
mélange BSA/trypsine [BSA] = 4,25 g/L [tryp] ^a = 1,21 g/L	trypsine : 0,363 + BSA : 1,275	0,336	0,11	0,18	0,54	0,18	100	3,2
trypsine impure [tryp] ^b = 4,239 g/L	4,239	0,935	0,12	0,51	0,50	0,48	95	4,2

Tableau VI.7 : Purification de la trypsine sur le support PS-DexPB-pABA ₁

a) trypsine porcine pure : lot T 0134 (Sigma)

b) trypsine porcine impure : lot T 8128 (Sigma)

Les solutions de trypsine purifiée sont dosées par spectoscopie UV à 280 nm au moyen d'une courbe d'étalonnage établie à partir d'une solution de trypsine pure (lot T 0134).

3- CONCLUSION

L'adsorption à saturation de dextrane à fort taux de substitution en groupes phénoxy sur les billes de polystyrène conduit à l'obtention de supports très hydrophiles utilisables en biochromatographie. Ces supports ont été testés, dans un premier temps en chromatographie d'exclusion stérique des protéines. Ces matériaux ont révélé un caractère échangeur faible de cations dû à la présence de charges négatives portées par le polymère adsorbé : ces charges sont écrantées en présence de chlorure de sodium ajouté dans l'éluant.

Les performances des colonnes polystyréniques en termes d'efficacité, de résolution et de sélectivité sont assez médiocres comparées à celles d'une colonne TSK-G3000-SW mais pourraient largement être améliorées en choisissant des billes de PS-DVB monodisperses, de taille réduite et de distribution poreuse plus étroite.

De telles phases stationnaires sont potentiellement utilisables dans divers modes de chromatographie (chromatographie d'interaction hydrophobe, d'échange d'ions, d'affinité) puisque le dextrane est un polymère facilement fonctionnalisable. Un exemple d'application en chromatographie d'affinité de la trypsine a été étudié, après immobilisation de la p-aminobenzamidine sur le dextrane adsorbé via une activation classique au chlorure de trésyle. Différents supports ont été préparés à partir de quantités variables de chlorure de trésyle. Nous avons mis en évidence une augmentation des interactions non-spécifiques sur les supports les plus fonctionnalisés. Ces interactions peuvent être supprimées par ajout de sel. Néanmoins, nous avons montré, en appliquant le modèle de Chaiken, qu'une augmentation de la force ionique engendre une diminution des constantes d'affinité de la trypsine pour ses ligands. Dans certaines conditions, il est possible de purifier la trypsine sans perte d'activité enzymatique.

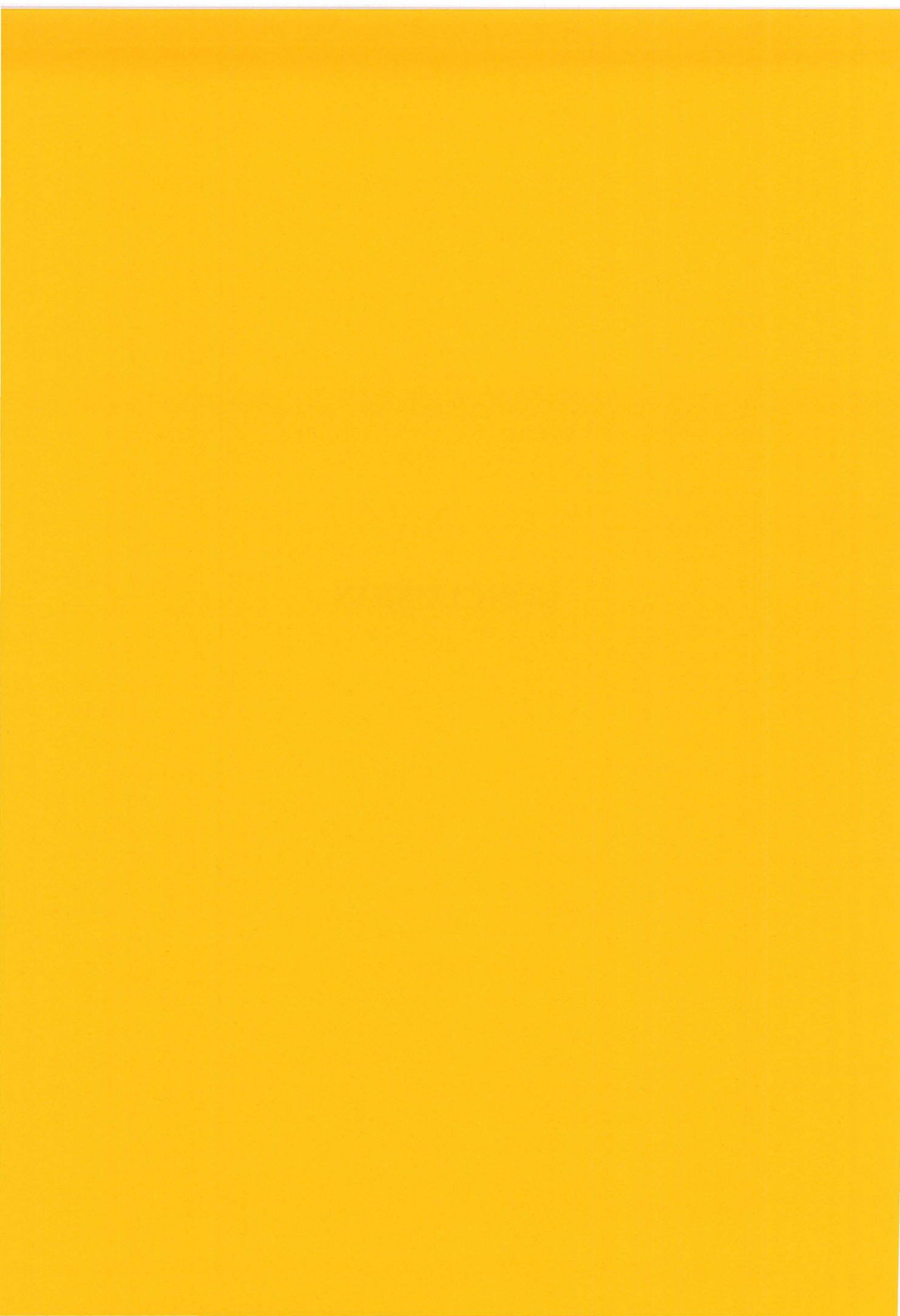
Une étude plus approfondie consisterait notamment à préparer des supports fonctionnalisés avec des quantités moindres de ligand immobilisées et à étudier l'influence d'un bras espaceur sur le comportement chromatographique de tels supports vis-à-vis de la trypsine.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Y. B. Yang et F. E. Regnier
Coated hydrophilic polystyrene-based packing materials
J. Chromatogr., **544**, (1991) 233-247
- (2) Y. B. Yang et M. Verzele
High-speed and high performance size-exclusion chromatography of proteins on a new hydrophilic polystyrene-based resin.
J. Chromatogr., **391**, (1987), 383-393
- (3) D. E. Schmidt Jr, R. W. Glese, D. Cannon et B. L. Karger
High performance liquid chromatography of proteins on a diol-silica gel stationary phase
Anal. Chem., **52**, (1980), 177-182
- (4) G. Shah et P. L. Dubin
Adsorptive interaction of ficoll standards with porous glass size-exclusion chromatography columns
J. Chromatogr., **693**, (1995), 197-203
- (5) J. C. Giddings
Dynamics in chromatography - Part I - Principles and theory
Marcel Dekker, New York, (1965)
- (6) W. W. Yan, J. J. Kirkland et D. D. Bly
Modern size exclusion chromatography
John Wiley and Sons, New York, (1979)
- (7) L. R. Snyder et J. J. Kirkland
Introduction to modern liquid chromatography
2nd Ed., Wiley-Interscience Ed., New York, (1979)
- (8) F. E. Regnier
High Performance Liquid Chromatography of Biopolymers
Science, **222**, (1983), 245-252
- (9) J. E. Van Eyck, C. T. Mant et R. S. Hodges
HPA of peptides and proteins in HPLC of peptides and proteins : separation, analysis and conformation
C. T. Mant et R. S. Hodges Eds, CRC Press, Boca Raton, (1991), 479-491
- (10) M-P. Vivarat-Perrin
Réalisation de nouveaux supports à base de copolymères réactifs adsorbés sur silice poreuse. Etude de leurs propriétés en chromatographie d'échange d'ions de protéines. Etude quantitative des paramètres d'interaction en chromatographie d'affinité.
Thèse de doctorat, Université Paris VI, (1992)
- (11) M-P. Vivarat-Perrin, B. Sebille et C. Vidal-Mdjar
Study of affinity supports based on reactive polymers immobilized on silica : affinity constant determination from isocratic zonal elution
J. Chromatogr., **584**, (1992), 3-9
- (12) A. Serres
Supports de silice passivée à ligands biospécifiques : Synthèse, caractérisation et propriétés de séparation en chromatographie des protéines
Thèse de doctorat, Université Paris-Nord, (1994)

- (13) C. S. Craik, S. Roczniale, C. Largman et W. J. Ruttei
The catalytic role of the active site aspartic acid in the serine-protease
science, **237**, (1987), 909-914
- (14) K. A. Walsh et P. E. Wilcox
Serine-proteases, dans *Methods in enzymology*
Ladzalo Lorand Ed., Academic Press, **19**, (1970), 31-41
- (15) B. Keil
Trypsin, dans *The Enzymes*
P. Boyer Ed., Academic Press, New York, **3**, (1971), 249-271
- (17) K. A. Walsh
Trypsinogens and Trypsins of various species
Ladzalo Lorand Ed., Academic Press, **19**, (1970), 41-43
- (17) K. Kasai
Trypsin and affinity chromatography
J. Chromatogr., **297**, (1992), 3-18
- (18) M. Mares-Guia et E. Shaw
Studies on the active center of trypsin
The binding of amidines and guanidines as modes of the substrate side chain
J. Biol. Chem., **240**, (1965), 1579-1585
- (19) J. Turkova
Affinity chromatography
J. Chromatogr. Library, **12**, (1978)
- (20) B. M. Dünn et I. M. Chaiken
Quantitative affinity chromatography. Determination of binding constants by elution
competitive inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **71**, (1974), 2382-2385
- (21) I. M. Chaiken
Analytical affinity chromatography in studies of molecular recognition in biology :
a review
J. Chromatogr., **376**, (1986), 11-32

CONCLUSION



CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce travail a été la conception et la préparation de supports destinés à la Bio-Chromatographie Liquide Haute Performance, à partir de billes poreuses de polystyrène-divinylbenzène, et leur caractérisation.

En raison de son caractère hydrophobe prononcé, le PS-DVB n'est pas directement compatible avec les solutions aqueuses de protéines. Pour pallier cet inconvénient, la voie poursuivie a consisté à enrober ces particules avec des polymères hydrophiles capables de s'adsorber fortement à leur surface.

Après adsorption, ces polymères doivent conférer aux billes de PS-DVB un caractère suffisamment hydrophile afin de limiter au maximum les interactions non spécifiques avec les protéines. La modification de la surface du polystyrène est réalisée par adsorption de polymères ayant les propriétés suivantes:

- posséder des domaines suffisamment hydrophobes pour permettre leur adsorption sur le PS-DVB,
- être capables de conférer aux particules de polystyrène un caractère hydrophile,
- posséder de nombreux groupes réactifs permettant l'introduction de groupes fonctionnels à la surface des particules (application à la préparation de supports pour la chromatographie d'échange d'ions, d'affinité...),

Le polymère choisi dans le cadre de ce travail est le dextrane de masse molaire moyenne en poids de 40 000 g/mol en raison de son caractère hydrophile, de sa biocompatibilité et de sa richesse en groupes hydroxyles, lesquels permettent d'envisager un grand nombre de modifications chimiques. Le dextrane ne possédant pas d'affinité pour le polystyrène, il doit donc être modifié chimiquement. La voie choisie pour cela a consisté à introduire sur le squelette polysaccharidique des groupements phénoxy, à faible concentration, de façon à préserver au mieux les propriétés hydrophiles du polysaccharide de départ. La modification chimique du dextrane réalisée en deux étapes, conduit à des dérivés plus ou moins substitués en groupements phénoxy (0,5 à 6,0 10^{-4} mol/g de polymère). Ces dérivés ont fait l'objet de caractérisations physico-chimiques variées par spectroscopie UV-Visible, chromatographie d'exclusion stérique dans divers milieux, diffusion de lumière laser, viscosimétrie et fluorescence. L'ensemble des résultats obtenus indique clairement que la fixation de groupes phénoxy sur le dextrane conduit à la formation de dérivés ayant un caractère amphiphile plus ou moins marqué selon le degré de modification de la chaîne macromoléculaire. La formation de microdomaines hydrophobes a été mise en évidence par la diminution de viscosité intrinsèque et par la modification des bandes de fluorescence du pyrène solubilisé dans une solution contenant le polymère.

Dans un second temps, les isothermes d'adsorption des différents dextrans hydrophobisés, sur les particules de polystyrène ont été déterminées. La première remarque que nous avons été

amenés à faire concerne l'allure des isothermes obtenues : toutes sont de type Langmuir mono-couche et ne mettent pas en évidence l'adsorption d'agrégats de polymères. La seconde remarque concerne la quantité de dextrane déposée sur les billes : nous avons observé que le taux de substitution du polymère en motifs aromatiques n'influence pas de façon significative la quantité de polymère adsorbé. Les taux de recouvrement au plateau de l'isotherme sont dans tous les cas égaux à $2 \pm 0,2 \text{ mg/m}^2$.

Quelle que soit la modification apportée aux particules de PS-DVB (quantité adsorbée de polymère et/ou contenu en groupes phénoxy), la couche de dextrane doit nécessairement être stabilisée. Cette étape a été réalisée par réticulation chimique à l'épichlorhydrine dans des conditions soigneusement contrôlées. La stabilisation ainsi entreprise confère une bonne stabilité chimique à la couche adsorbée.

Bien que les propriétés d'adsorption semblent peu influencées par le contenu en groupes hydrophobes des polymères adsorbés, les propriétés physico-chimiques de la couche déposée, quant à elles, dépendent entièrement de ce paramètre.

En particulier, le caractère plus ou moins hydrophile des billes de polystyrène modifiées a été évalué par mesure de la capacité d'adsorption de l'albumine de sérum bovin, protéine relativement hydrophobe. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'adsorption de cette protéine sur polystyrène recouvert diminue lorsque le taux de recouvrement des billes en dextrane-phénoxy augmente et, à taux de recouvrement identique, lorsque le contenu du dextrane en groupes phénoxy augmente. L'adsorption non-spécifique de la BSA est même totalement supprimée sur les particules recouvertes par le dextrane-phénoxy le plus substitué.

Ces résultats ont été corrélés avec l'étude réalisée par RPE, qui indique clairement que la structure de la couche de dextrane adsorbée est influencée par la teneur en groupes phénoxy. En effet, les couches de dextrans peu substitués en groupes aromatiques sont relativement épaisses mais diffuses. A contrario, les dextrans les plus riches en groupes hydrophobes conduisent à des couches plus denses et donc moins perméables aux protéines ; ceci est de toute évidence lié à la présence d'interactions plus nombreuses entre les groupes phénoxy et la surface du polystyrène-divinylbenzène.

La distribution poreuse des matériaux à l'état sec est rétrécie après adsorption de dextrane, et ce d'autant plus que le polymère adsorbé est riche en groupes phénoxy. La disparition des pores de rayons inférieurs à 100 \AA a été expliquée, dans tous les cas, par le remplissage et/ou le masquage de ces pores, dont la taille est comparable à celles des molécules de dextrane. Par ailleurs, la disparition des macropores est d'autant plus marquée que le polymère est riche en groupes phénoxy. Ceci a été attribué à la formation d'un réseau plus ou moins lâche à l'intérieur des pores, du à la mise en place d'interactions entre les groupes phénoxy qui ne participent pas à l'ancrage du polymère sur la surface. Ce réseau est partiellement stabilisé lors de la réticulation chimique à l'épichlorhydrine.

En ce qui concerne les supports préparés par adsorption de dextrans-phénoxy à taux de substitution élevés, la formation de ce réseau poreux a été clairement mise en évidence par la mesure de porosité à l'état solvato. La comparaison des courbes de calibration obtenues sur ces supports en milieux purement aqueux et mixte (eau/méthanol 80/20 % V/V) montre que certaines des interactions phénoxy-phénoxy restent labiles et peuvent être supprimées en présence de méthanol.

Concernant la chromatographie des protéines en milieu aqueux, les protéines sont retenues sur la grande majorité des supports. Seuls les supports préparés par adsorption à saturation des dextrans riches en groupes phénoxy ont donné des résultats intéressants. Dans ce cas, l'élution de la BSA est quantitative et aucun phénomène de rétention n'a été observé, même à forte concentration saline (NaCl 2M). Par ailleurs, des courbes de calibration en protéines ont été établies et de faibles interactions ioniques ont été mises en évidence entre certaines protéines étudiées et le support. Ces interactions sont probablement liées à la présence de quelques charges négatives sur les dextrans-phénoxy. Cependant, en augmentant la force ionique de l'éluant, l'élution des protéines semble basée principalement sur un mécanisme d'exclusion stérique.

Puisque le dextrane est un polymère facilement fonctionnalisable, l'immobilisation de la p-aminobenzamidine, ligand spécifique de la trypsine, a été entreprise après activation du dextrane adsorbé par le chlorure de trétylène. Un exemple de purification de la trypsine illustre bien l'application potentielle de tels supports en chromatographie d'affinité des protéines. L'applicabilité du modèle de Chaiken a été vérifiée par analyse zonale en présence de l'ester méthylique de l'arginine, autre ligand de la trypsine. Les constantes d'affinité de la trypsine pour ses ligands soluble et immobilisé ont pu être déterminées. Des exemples de purification de la trypsine sans perte d'activité sont montrés. Néanmoins, une étude plus approfondie mériterait d'être réalisée pour étudier l'influence de la teneur en ligand fixé et celle d'un bras espaceur sur le comportement de tels supports vis-à-vis de la trypsine.

Le but que nous avons poursuivi pendant cette étude a donc consisté à préparer de nouveaux supports à base de billes de polystyrène-divinylbenzène hydrophilisées, pour la Chromatographie Liquide Haute Performance des protéines. Les matériaux obtenus présentent à la fois la résistance mécanique des billes de PS-DVB natives et le caractère hydrophile du dextrane. Néanmoins, leur faible performance chromatographique semble être essentiellement associée à l'hétérogénéité de leur structure, liée en partie aux caractéristiques propres du matériau initial.

Afin d'améliorer les performances de ces matériaux (augmentation de l'efficacité, de la sélectivité...), un certain nombre de modifications peuvent être envisagées. En particulier, le protocole d'hydrophilisation que nous avons mis au point pourrait être amélioré de façon à minimiser les interactions phénoxy-phénoxy et utilisé pour modifier :

- soit des particules de PS-DVB non poreuses de faible diamètre pour des applications analytiques,
- soit des particules de PS-DVB macroporeuses ($R_p = 150-250 \text{ \AA}$) présentant une distribution en taille de pores plus étroite. Cependant, de telles particules polystyréniques ne sont encore qu'au stade de l'expérimentation.
- soit des billes de PS-DVB commerciales de type POROS. L'utilisation de tels matériaux dits perfusifs est également envisageable.

A l'inverse, le protocole d'hydrophilisation pourrait être optimisé de façon favoriser le remplissage des pores, afin de préparer des matériaux à pores composites. Ces derniers sont actuellement obtenus à partir de matrices rigides dont les ultramacropores ($2000 < R_p < 6000 \text{ \AA}$) sont remplis de polymère, lequel forme un réseau dont la porosité est suffisamment grande pour permettre la diffusion des protéines.

En effet, nous avons montré au cours de cette étude, que le dextrane modifié par introduction de groupes phénoxy est capable d'une part, de s'associer étroitement à la surface du PS-DVB et d'empêcher l'adsorption des protéines et d'autre part, de former un réseau à l'intérieur des pores les plus larges de ce matériau, et ce de façon d'autant plus marquée que le taux de groupements phénoxy augmente. De ce fait, le type de structure poreuse auquel nous sommes parvenu peut s'apparenter à celui des matériaux à pores composites. Cependant, ni le choix des billes de PS-DVB, ni les procédés que nous avons mis en oeuvre n'ont été optimisés à cet égard. Toutefois, ces résultats laissent entrevoir de nouvelles perspectives quant à l'élaboration de matériaux de ce type.

ANNEXE

Dosage colorimétrique des dextrans par l'anthrone

En milieu acide et chaud, l'anthrone (jaune) réagit avec le glucose pour former un complexe coloré (vert).

- Préparation de la solution d'anthrone :

1 g d'anthrone est agité dans 150 mL dans un ballon refroidi par un bain de glace. 350 mL d'acide sulfurique concentré sont ajoutés goutte à goutte. Progressivement, la coloration jaune apparaît par dissolution de l'anthrone. La solution d'anthrone se conserve un mois à 4°C.

- Préparation des solutions étalons :

Une courbe d'étalonnage est nécessaire à chaque série de dosage. Elle est obtenue à partir de solution de polymère de concentration comprise entre 1 et 2g/L dans le milieu aqueux concerné (eau, soude, SDS, ...) éventuellement en présence d'agent réticulant.

- Préparation des solutions à doser :

Les surnageants à doser sont dilués dans le milieu concerné (eau, soude, SDS, ...) à des concentrations de 1 à 2 g/L.

- Préparation des solutions de dosage :

En principe, des volumes variables (0 à 200 µL) de solutions sont complétés à 200 µL dans le milieu concerné puis mis en contact avec 5 mL de solution d'anthrone. Les solutions sont placées dans un bain-marie à 80°C pendant 16 minutes. Après 10 minutes de refroidissement, les densités optiques sont lues à 630 nm.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE**

o o o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur SEBILLE Bernard, Professeur, Laboratoire de Physico-Chimie des
Biopolymères THIAIS,**

Monsieur MULLER Daniel, Professeur, Institut Galilée - Université Paris 13

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Mademoiselle FOURNIER Clara

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Hydrophilisation de billes de polystyrène-divinylbenzène par
adsorption de dérivés amphiphiles du dextrane. Préparation et
caractérisation structurales de nouveaux supports pour la
chromatographie des protéines."**

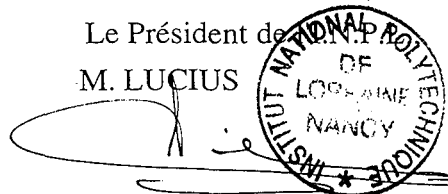
en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

Spécialité : **"GENIE DES PROCEDES"**

Fait à Vandoeuvre le, 28 Novembre 1996

Le Président de
M. LUCIUS



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

RÉSUMÉ

HYDROPHILISATION DE BILLES DE POLYSTYRÈNE-DIVINYLBENZÈNE PAR ADSORPTION DE DÉRIVÉS AMPHIPHILES DU DEXTRANE. PRÉPARATION ET CARACTÉRISATIONS STRUCTURALES DE NOUVEAUX SUPPORTS POUR LA CHROMATOGRAPHIE DES PROTÉINES.

De nouvelles phases stationnaires pour la Chromatographie Liquide Haute Performance des protéines ont été préparées à partir de microsphères poreuses de polystyrène-divinylbenzène. Ce matériau étant très hydrophobe, il est nécessaire d'en modifier la surface afin de le rendre compatible avec la nature des biomolécules à séparer. Le procédé utilisé consiste à adsorber sur les particules, un polymère hydrophile tel que le dextrane. L'introduction de groupes phénoxy sur ce polysaccharide, à différentes concentrations, conduit à des dérivés amphiphiles capables de s'adsorber fortement sur le polystyrène. La couche de polymère déposée est stabilisée, dans les conditions optimales, par réticulation chimique à l'épichlorhydrine. Le taux de groupements phénoxy fixés sur le dextrane n'a pas une grande influence sur la quantité maximale de polymère qui peut être déposée sur le polystyrène mais est déterminant quant à l'aptitude des matériaux obtenus à adsorber les protéines. La porosité des supports préparés est étudiée tant à l'état sec par porosimétrie au mercure et par adsorption d'azote qu'à l'état solvaté dans divers milieux aqueux et organiques par chromatographie d'exclusion stérique. Elle dépend non seulement de la composition et de la conformation de la couche adsorbée mais aussi de l'aptitude des dextrans modifiés à s'associer par le biais d'interactions phénoxy-phénoxy. Finalement, des billes poreuses de polystyrène, modifiées par adsorption à saturation d'un dextrane présentant un taux élevé en groupes phénoxy, sont testées en chromatographie d'exclusion stérique des protéines. Le dextrane étant un polymère facilement fonctionnalisable, de tels supports sont utilisables pour d'autres modes de chromatographies; un exemple de purification de la trypsine par chromatographie d'affinité est donné.

Mots-clés : Polystyrène-divinylbenzène - Amphiphile - Dextrane - Adsorption - Porosité - Chromatographie - Protéines - RPE (Résonance Paramagnétique Électronique).