

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère d'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi de Bordj Bou Arreridj



Faculté des sciences et des technologies

Domaine des sciences de la matière

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Analytique

Mémoire de master

Thème

Synthèse d'un support fonctionnaliser à partir de
monolithe PS/Silice a usage en
nanobioséparation

Présenté par :

AlloutiOumessad

Encadré par :

Tahar Mekhalif

Promotion : 06/2022

Jury de soutenance :

Président	:	Mustapha Boubatra,	MC, B,	Univ BBA
Encadreur	:	Tahar Mekhalif,	MC, A,	Univ BBA
Examineur	:	Abdelkader Dilmi,	MC, B,	Univ BBA

2021-2022

Remerciements

Ce travail a été encadré par *Dr. Tahar Mekhalif*, professeur au Département des sciences de la matière, de l'université de BBA, Maître de conférences. Si la gentillesse et la disponibilité sont peut être les qualités humaines les plus évidentes, j'ai plus particulièrement apprécié le dévouement, l'enthousiasme et la rigueur scientifique avec lesquels il a su diriger mon travail. Toujours à l'écoute, Mr **Mekhalif** m'a accordé une très grande liberté d'action. Que je remercie pour leur accueil durant mon séjour. Veuillez trouver ici le témoignage de ma respectueuse considération.

J'exprime ma gratitude à Monsieur **A. BOUBETRA**, Professeur à l'Université de BBA, pour l'honneur qu'il ma fait en acceptant de présider ce jury.

Je remercie aussi les membres du jury, M. **A. DILMI**, Enseignant à l'Université de BBA, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail et apporter leur expertise.

Je présente mes remerciements les plus sincères à l'équipe du laboratoire de chimie, Chromatographie ainsi que groupe de techniciens de l'université, et le laboratoire de chimie de Sétif. Leurs conseils, leurs discussions et aussi les chaleureux moments passés avec eux auront permis une ouverture d'esprit et une amélioration certaine de la qualité de mon travail.

Je voudrais remercier également mes parents qui mon aider tout le long de ma formation ainsi que mon seul frère et sœurs pour leur soutien et leur présence et la confiance dont ils ont fait preuve.

Résumé

Nous avons étudié les paramètres qui conditionnent l'adsorption d'une protéine sur des supports synthétisés. Par la suite, nous avons effectué la projection de cette étude sur des copolymères que nous utilisons dans la préparation de phases stationnaires. L'objet de ce travail était donc le développement des supports sélectifs pour l'analyse d'une protéine cible qui est la HSA.

Dans ce contexte, nous avons entrepris la synthèse de polymères fonctionnels insolubles susceptibles d'adsorber spécifiquement la HSA et, de ce fait, utilisables pour sa séparation. La synthèse ayant conduit à l'obtention de deux différents supports dérivés de polymères réticulés, dont l'un est un composite du PS/Silice comportant a leur surface des ions de Cu et doté d'excellentes propriétés, pouvant être utilisés comme phases stationnaires en chromatographie.

Parallèlement à cela l'étude contribue à élucider le mécanisme régissant les interactions entre la HSA et la surface du polymère ayant des ions métalliques Cu^{2+} fixés par chélation a ses groupements fonctionnels. Pour chaque étape, nous avons étudié l'influence de certains paramètres afin de mettre en évidence leur rôle et de les optimiser dans le but de préparer des résines ayant des propriétés déterminées.

Les différentes méthodes de caractérisation ont permis d'établir pour cette étape de synthèse, et par les résultats concordants, l'obtention des fonctions chimiques prévues sur la chaîne de polymère. La substitution a conduit à disposer d'un polymère dérivé du polystyrène réticulé comportant à des taux assez importants, des groupements COOH et CNH_2 , aminoacides et amines.

Nous pouvons ainsi dire que l'Albumine présente une bonne affinité vis à vis des supports préparées, mais cette affinité diffère d'une surface à une autre.

Les isothermes d'adsorption à 25°C de l'albumine sur les matériaux à propriétés adsorbantes sont de type Langmuir. Ces résultats suggèrent que l'adsorption est due à la présence de sites actifs caractérisés par la nature des fonctions qui les constituent.

LISTE DES ABREVIATIONS

°C : degré Celsius

DCM : dichlorométhane

DO : densité optique

h: heure

HSA:albumine du sérum humain

IR : infrarouge

M : molaire

mg: milligramme

min: minute

ml: millilitre

mM ou mmol: millimole

pH: *potentiel*hydrogène

PS: polystyrène

ASH : Albumine du Sérum humain

TA : température ambiante

PEI : polyéthylèneimine

UV: ultraviolet

V: volume

µl: microlitre

liste des figures

Figure I. 1: Structure tridimensionnelle de l'albumine avec ses 3 domaines et ses ponts disulfures.

Figure I.2 : Différents types d'hydrogels

Figure I.3 : Ethylènediamine ligand de chélation à un métal avec deux liaisons

Figure I.4 : Complexes de Cu^{2+} avec ligands méthylamine non chélatants (à gauche) et éthylènediamine chélatante (à droite)

Figure II.1 : photo d'un appareil UV-vis.

Figure II.2 : photo d'un appareil IRTF.(FTIR-8300 Shimadzu).

Figure II.3 : Schéma réactionnel, étapes de synthèse des supports chélateurs.

Figure II.4 : Montage expérimentale utilisé dans la réaction chlorosulfonation du PS par l'acide chlorosulfonique.

Figure II.5 : Photos, Observations d'une importante modification de l'aspect externe visuel des particules finis de PS après la réaction de fonctionnalisation.

Figure II.6 : Nature de la solution de Cu^{2+} .

Figure II.7 : le protocole expérimental l'adsorption de l'albumine.

Figure II.8 : Isothermes d'adsorption à 25°C, de l'albumine sur PS-NH: variation de Q_{ads} , Concentration interfaciale, en fonction de C, concentration de la solution d'albumine.

Figure II.9 : Courbe d'étalonnage permettant de déterminer la concentration de l'albumine en solution.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

PARTIE SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

I.1. LES POLYMERES

I.1. introduction.....	7
I.1.1.définition.....	7
I.1.2Structure des polymères	8
I.1.3.Les propriétés des polymères	10
I.1.3.1.Propriétés thermiques.....	10
I.1.3.2.Propriétés mécaniques.....	10
I.1.3.3.Propriétés optiques.....	11
I.1.4.Classification des réactions de polymérisation	11

I.2. L'ADSORPTION

I.2.1.phénomène d'adsorption	11
I.2.2.1.introduction.....	11
I.2.2.2. Définition.....	12
I.2.3.Les grands types d'adsorbants « physiques »	12
I.2.3.1.Les charbons actifs.....	12
I.2.3.2.Les zéolithes.....	13
I.2.3.3. Les alumines activées.....	13
I.2.3.4.Les gels de silice.....	13
I.2.3.5.Les argiles activées.....	14
I.2.4.Equations utilisées pour l'adsorption d'un soluté en phases liquide sur une phase solide .	14
I.2.5.ISOTHERMES D'ADSORPTION.....	15
I.2.5.1.Remarque préliminaire.....	15

I.2.5.2. Isotherme de LANGMIUR.....	16
I.2.5.3. Isotherme de FRUNDLICH.....	17
I.2.5.4. Isotherme de TEMPKIN.....	17
I.2.6. CINÉTIQUE D'ADSORPTION.....	18
I.2.7. TECHNIQUES D'ANALYSE DE L'ADSORPTION.....	19

I.3. ETUDE de L'ALBUMINE

I.3.1. Généralités.....	19
I.3.2. ...Structure biochimique de l'albumine.....	20
I.3.3. Propriétés physico-chimiques de l'albumine.....	20

I.4. Les Adsorbants Hydrogels

I.4.1. Définition.....	21
I.4.2. Classification des hydrogels.....	22

I.5. La Chélation

I.5.1. Effet chélateur objet de notre étude.....	23
I.5.2. En biochimie et microbiologie.....	23

CHAPITRE II

PARTIE EXPERIMENTAL

II. 1. Matériel et Méthodes	25
.II.2. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES Supports.....	26
II.2.1. SYNTHÈSE DES SUPPORTS PS-SO₂CL ET PS-SO₂-AMINES.....	28
II.2.2. Les dérivés aminés du PS-SO₂CL.....	28
II.2.3. Protocole de Préparation des supports PS-SO₂Cl et PS-SO₂-Amine.....	29
II.2 .4. Préparation des matériaux chélateurs utilisés comme adsorbants	32
.II.2.5. Étude de l'adsorption de l'albumine sur les Adsorbants préparés.....	33

II.2.5.1. Méthode de dosage de la concentration de l'albumine.....	33
II.2.6. Détermination des Isothermes d'adsorption de l'albumine.....	34
II. 3. RESULTAS ET DISCUSSIONS	
II.3.1. Caracterisation des Adsorbants préparés.....	35
II.3.2. Utilisation des Adsorbants préparés.....	36
III. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	41
ANNEXES	43

INTRODUCTION GENERALE

Les protéines biomolécules indispensables aux être vivants, sont des constituants exceptionnellement importants des cellules vivantes, non seulement d'un point de vue quantitatif (elles représentent en générale plus de la moitié du poids sec des cellules) mais aussi du point de vue qualitatif, puisque à côté des protéines dites structurales, on trouve des protéines ayant un rôle biologique fondamental en particulier les enzymes, catalyseurs biologiques indispensables au déroulement des réactions dans les cellules des organismes vivants [1-5].

L'immobilisation des protéines sur des supports organiques ou inorganiques est à l'origine d'un grand nombre de travaux de recherche avec des applications extrêmement importantes en biologie, en pharmacie ou aussi en biochimie.

Les procédés d'adsorption dans le domaine de la biologie tendent à se développer rapidement et sont essentiellement utilisés pour l'élimination et la séparation des protéines. L'attention a été focalisée par la suite sur l'utilisation de nouveaux adsorbants à base de matériaux polymères naturelles ou synthétiques.

Parmi les différentes matrices organiques, on trouve les polymères. Les applications des polymères, connaissent actuellement un développement très important dans le domaine des biomatériaux. L'élaboration de ces derniers sous forme de biomatériaux par des méthodes adaptées au contrôle de ces propriétés est donc d'un intérêt fondamental dans la mesure où elle peut conduire à des structures nouvelles et à la mise en évidence des interactions moléculaires impliquées.

Ces polymères présentent un intérêt croissant car leurs applications ne cessent de se diversifier. Trouvant beaucoup d'application dans le domaine médical et pharmaceutique.

Ces matériaux sont de très bonnes matrices d'immobilisation de protéine et d'enzymes pour la réalisation de biocapteurs. Ainsi des interactions spécifiques entre des hémoprotéines ou enzymes et des polymères favorisent la formation de complexes direct entre les matériaux et les sites actifs de la biomolécule.

Cette propriété très particulière et rare permet de concevoir des bioadsorbants spécifiques. Parallèlement ces matériaux organiques, les polymères synthétiques modifiés, ont également été utilisés pour immobiliser des molécules biologiques.

Toutefois, les composés les plus importants dans la pratique sont ceux qui associent un une ou plusieurs entités « complexentes » appelées chelateurs. Les coordinats peuvent être des molécules organiques ou inorganiques ou des anions, ou des cations pour qui nous limiterons notre propos.

Dans ce contexte le polymère qui fait l'objet de ce travail est le polystyrène, polymère largement utilisée dans un bon nombre de ces domaines. L'intérêt accordé à ce matériau se justifie par son abondance, sa facilité de synthèse, sa capacité d'échange, sa porosité, sa biocompatibilité.

L'attention a été concentrée par conséquent sur l'utilisation de nouveaux adsorbants à base de matériaux polymères modifiés. Dans ce travail nous tacherons de mettre en évidence le rôle éventuel des ions Cu^{2+} dans les complexes se produisant à la surface des polymères modifiées.

Comme protéine, nous avons choisi l'Albumine du sérum humain 'HSA'. Les différents polymères préparés ont été caractérisés par des méthodes physico-chimiques avant d'être utilisés comme matrices d'immobilisation. Les propriétés adsorptives des supports immobilisée ont été étudiées.

Le but de notre travail est donc l'étude de phénomène « adsorption » de l'albumine humaine sur des supports polymérique synthétisés au laboratoire.

Dans ce contexte, nous avons entrepris la synthèse de polymères fonctionnels insolubles susceptibles d'interagir spécifiquement avec la HSA et, de ce fait, utilisables pour sa purification.

Ce travail est constituer de deux parties principales, et sera présenté selon le plan suivant :

Dans une première partie nous présenterons une synthèse bibliographique sur les protéines, d'adsorption d'une manière générale, mécanisme d'adsorption des protéines sur les polymères, la diversité des supports, procédés chromatographiques.

La deuxième partie comprenant les différentes étapes expérimentales est aussi consacrée aux méthodes de travail suivies. Une discussion des différents résultats obtenus sera exposée.

Enfin on terminera avec une Conclusion générale.

Objectif :

L'objectif principal que nous voulons atteindre à travers ce travail consiste à préparer un support pour l'adsorption de l'albumine. Ce support doit répondre à un ensemble de critères chromatographiques, chimiques et physico-chimiques afin d'éviter certains problèmes inhérents aux supports chromatographiques naturels tels que l'agarose en particulier.

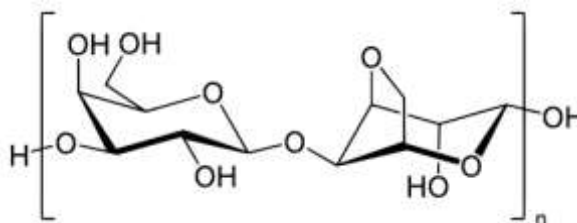


Figure1: Structure du l'agarose

En effet l'agarose, le sépharose....., polymères naturels, présentent de très sérieux inconvénients.

- ◆ Caractère aléatoire de la qualité de ce produit.
- ◆ Biodégradabilité facile par les bactéries et certaines enzymes.
- ◆ Instabilité à la chaleur, au froid ($T < 0^{\circ}\text{C}$), aux agents dissociant et aux détergents.
- ◆ Présence de sites d'adsorption non spécifiques vis-à-vis de macromolécules biologiques
- ◆ Très faible résistance à la pression dans les colonnes de chromatographie, ce qui limite leur utilisation au niveau préparatif et industriel.

Ainsi, il est possible de définir les caractéristiques du support que nous recherchons.

- ◆ Matériau macromoléculaire réticulé, de structure chimique bien définie.
- ◆ Fabrication aisée et reproductible.
- ◆ Présentation sous forme de particules d'une taille moyenne de 200 à 400 μm .
- ◆ Matériau hydrophile renforcer par la présence de silice sous forme de gel, résistant à des pressions et à la chaleur, aux solvants, aux détergents et aux agents dissociants.

Dans ce contexte, nous avons entrepris la synthèse de polymères fonctionnels insolubles capables d'interagir avec la HSA pour sa purification.

La synthèse ayant conduit à l'obtention de deux supports polymères dérivés du polystyrène réticulé dont l'un a été renforcer par le gel de silice, pouvant être utilisés comme adsorbant.

L'étude doit contribuer aussi à étudier le mécanisme des interactions entre la HSA et la surface du polymère afin de mettre en évidence leur rôle dans le but de préparer des résines ayant des propriétés déterminées.

I. PARTIE SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. 1. INTRODUCTION :

En 1990, la production mondiale de polymères s'est élevée à 86 Mt. Les Etats –Unis avec une production de 27 Mt occupent le 1er rang ; la France se situe en 5ème position avec production de 4,3 Mt. Les thermoplastiques représentent l'essentiel de la production. Le polyéthylène qui regroupe le PEbdr (bdr = basse densité radicalaire), le PEbd (bd= basse densité linéaire) et le PEhd (hd = haute densité) est de loin le matériau plastique le plus utilisé comme le montre le tableau 1 [1].

Tableau 1 : Production 1990 des principales matières plastique en Mt (d'après Modern plastic International, janvier 1991).

		Etats-Unis	Europe	Japon
Thermo-plastiques	PE	8,6	8	2,5
	PVC	3,8	4,6	2
	PP	3,5	3,3	1,8
	PS	2,4	1,8	1,1
Thermo-durcissables	PF	1,5	1,3	0,4
	UP	1,4	1,2	0,6

I.1.1. Définition

Un **polymère** est un matériau constitué de macromolécules. Le terme **macromolécule** désigne une molécule de très grande taille formée par l'enchaînement d'un très grand nombre d'unités moléculaires de base appelées motifs constitutifs. Souvent, les termes polymère et macromolécule sont utilisés indifféremment.

Un **monomère** désigne les molécules à partir desquelles le polymère a été synthétisé. La réaction de synthèse des polymères est appelée réaction de polymérisation.

On distingue les homopolymères et les copolymères.

Un **homopolymère** est le résultat de la polymérisation d'un seul type de monomère[2]

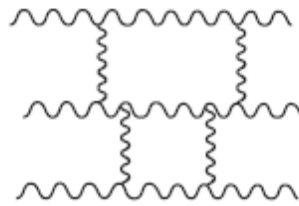
Exemple :

si A est le monomère, $\cdots -A-A-A-A-A-A-A-A-\cdots$ est

l'homopolymère noté également $-(A)_n$

–où n est nombre de motifs constitutifs.

C'est le cas des **polymères réticulés** :



I.1.2. Structure des polymères :

Les macromolécules peuvent être constituées d'un seul type de motif, c'est le cas des **homopolymères**, ou bien être constituées de motifs différents A, B, etc. qui s'arrangent au hasard, en bloc AA...BB... ou en séquence alternée ABAB, etc. Dans le cas où il y a deux motifs différents dans la chaîne on obtient un **copolymère** ; avec trois motifs il s'agit d'un **terpolymère** ; beaucoup plus rarement on trouve des **tétrapolymères**.

Le mot **copolymère** désigne un polymère réalisé à partir de deux ou plusieurs monomères. Pour deux monomères on devrait parler de bi ou dipolymères.

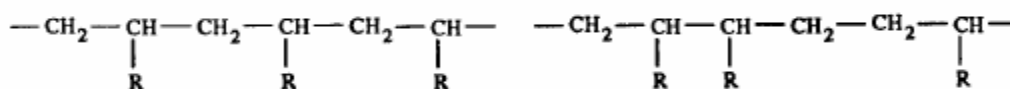
Dans certains cas, les méthodes industrielles de production des homopolymères ne conduisent pas à des chaînes rigoureusement linéaires ; on observe la formation de ramification courtes ou longues qui jouent un rôle important sur les propriétés rhéologiques du matériau. Dans le cas de certains copolymères la ramification est délibérément recherchée pour former des branches plus ou moins espacées et de longueur parfaitement connue.



Homopolymère branché tel que le polyéthylène basse densité.

Au sein d'une chaîne, les motifs unitaires peuvent être disposés de différentes façons les uns par rapport aux autres. Ainsi dans le cas d'une macromolécule linéaire produite à partir d'un seul type

de monomère, par exemple $\text{CH}_2=\text{CHR}$, l'enchaînement peut être tête à queue, le plus probable, ou bien tête à tête. [3].



Enchaînement tête à queue

Enchaînement tête à tête

I.1.3. Les propriétés des polymères :

I.1.3.1 Propriétés thermiques

On distingue trois grandes familles :

- **les thermoplastiques** : ils acquièrent par chauffage une fluidité suffisante pour être transformés sans modification de leur structure chimique, et donc a priori de façon réversible, aux phénomènes de dégradation près. Parmi les principaux thermoplastiques, on peut citer le PE, le PP, le PS, le PVC, les polyamides, le PET ;

- **les thermodurs**: souvent appelés aussi « thermodurcissables » car obtenus à partir de résines dites thermodurcissables, une élévation de température provoque le durcissement du matériau, en lui conférant sa structure définitive, de façon irréversible. Par extension, on inclut dans cette famille tout polymère qui subit une transformation irréversible, même si la chaleur n'est pas indispensable ;

- **les élastomères** sont par définition des polymères ayant des propriétés élastiques réversibles (allongement réversible important). Exemples : caoutchouc naturel, polybutadiène, polyisoprène.

I.1.3.2 Propriétés mécaniques

Comportement plus plastique / métaux. Leurs propriétés dépendent de T

Basse température : état vitreux ou semi-cristallin \diamond rigide

A T plus élevées : transition vitreuse : les chaînes glissent les unes/ aux autres, le polymère se ramollit

Puis pour les polym. non réticulés \diamond écoulement vitreux, les chaînes se désenchevêtrent \diamond puis décomposition thermique

Pour les polym. réticulés (thermodurs): durcissement suivi d'une décomposition thermique

Pour les polymères dont T_g et $T_f < 20^\circ\text{C}$ élastomère, et sinon ils sont plastomères.

I.1.3.3 Propriétés optiques

Transparence: Ex: bouteille d'eau, plexiglas (PMMA), pare-brises feuilletés... [4].

I.1.4. Classification des réactions de polymérisation

La formation ou non d'un coproduit de faible masse moléculaire lors des réactions de polymérisation qui peuvent être classées selon deux critères :

- polymérisation :
 - Polyaddition : ces réactions se font sans élimination de petites molécules.
 - Polycondensation : ces réactions se font avec élimination de petites molécules (H_2O , HCl , NH_3 , etc.). Le polymère résultant de la polycondensation est nommé polycondensat.

La distinction entre polyaddition et polycondensation a été introduite par Wallace Hume Carothers en 1929. [5][6].

- Le mécanisme de réaction :
 - Polymérisation par étape : réaction ayant lieu entre des groupes fonctionnels.
 - Polymérisation en chaîne : réaction ayant lieu grâce à la formation de centres actifs comme des radicaux ou des ions.

La distinction entre polymérisation par étape et polymérisation en chaîne a été introduite par Paul Flory en 1953. [7].

en chaîne se fait par polyaddition et la majorité des polymérisations par étape se fait par La majorité des polymérisations polycondensation.

I.2. l'adsorption

I.2.1. Phénomène d'adsorption

I.2.2.1 Introduction :

L'adsorption est le phénomène qui consiste en l'accumulation d'une substance à l'interface entre deux phases (gaz-solide, gaz-liquide, liquide-solide, liquide-liquide, solide-solide). Il a son origine dans les forces d'attraction intermoléculaires, de nature et d'intensité variées, qui sont responsables de la cohésion des phases condensées, liquides ou solides. Une molécule attirée inégalement par les autres molécules de deux phases trouvera une position énergétiquement favorable à la surface de la phase

qui l'attire le plus ; celle-ci sera appelée l'*adsorbant*, les molécules ainsi adsorbées constituant l'*adsorbat*. Si les conditions énergétiques ou cinétiques permettent à la molécule de pénétrer au sein de la phase adsorbant, il y a *absorption*.

Les cristaux constituent des édifices suffisamment rigides et stables pour que, le plus souvent, les molécules adsorbées ne modifient pas leur structure en surface : on s'intéressera alors surtout aux propriétés des molécules à l'état adsorbé. Par contre, la manifestation essentielle de l'adsorption à la surface des liquides est de modifier leur tension superficielle. Bien que les phénomènes fondamentaux soient les mêmes, l'adsorption se manifeste différemment sur les solides et sur les liquides ; les méthodes d'étude et les domaines d'application sont différents et justifient des traitements distinct. [8].

I.2.2.2 Définition

L'adsorption est un phénomène de surface universel. En effet, toute surface est constituée d'atomes n'ayant pas toutes leurs liaisons chimiques satisfaites. Cette surface a donc tendance à combler ce manque en captant les atomes et molécules passant à proximité. Les chimistes travaillant sur des réactifs de très haute pureté savent bien la difficulté qu'il y a à éliminer les impuretés adsorbées sur la surface interne de leur montage.[9].

I.2.3. Les grands types d'adsorbants « physiques » :

On distingue cinq grands types d'adsorbants « physiques » : les charbons actifs, les zéolithes, les alumines, les gels de silice, les argiles activées.

Il se fabrique environ 150 000 t.an⁻¹ de zéolithes pour adsorption, 400 000 t.an⁻¹ de charbons actifs, 75 000 t.an⁻¹ d'alumines activées, 400 000 t.an⁻¹ d'argiles et 25 000 t.an⁻¹ de gels de silice.

I.2.3.1 .Les charbons actifs

Les charbons actifs sont préparés par pyrolyse d'une matière contenant du carbone, charbon ou matériau végétal, pour conduire à un charbon de bois qui est ensuite oxydé par la vapeur d'eau dans des conditions contrôlées pour créer une structure microporeuse. Il existe plusieurs centaines de qualités de charbons actifs, suivant le précurseur et les conditions de traitement. On peut aussi trouver des charbons actifs dits « chimiques », car activés à chaud en présence d'agents chimiques déshydratants, acide phosphorique ou chlorure de zinc. Les charbons actifs sont des adsorbants

organophiles amorphes. Leur structure n'est donc pas régulière, contrairement à un cristal. Cette structure amorphe se traduit par une répartition continue de taille de pores dont l'étalement (l'écart entre les plus petites et les plus grandes valeurs) peut atteindre plusieurs ordres de grandeur.

I.2.3.2 Les zéolithes

Les zéolithes sont des alumino-silicates cristallisés microporeux de formule globale $(AlO_2M, nSiO_2)$ où M représente le plus souvent un métal alcalin ou alcalino-terreux et $n \geq 1$. Il existe plus de 100 espèces de zéolithes, différant par la valeur de n et la structure cristallographique. La présence de cations dans les micropores génère des champs électriques de l'ordre de $10^{10} V.m^{-1}$, ce qui fait de ces corps de puissants adsorbants polaires.

I.2.3.3. Les alumines activées

Les alumines activées sont obtenues par thermolyse flash du trihydroxyde d'aluminium $Al(OH)_3$ qui conduit à un produit de composition approximative $Al_2O_3, 0.5 H_2O$, possédant une structure poreuse résultant du départ de molécules d'eau. La surface des pores est couverte de groupements Al-OH, et l'adsorption se fait préférentiellement par liaison hydrogène. Les alumines activées sont des adsorbants amorphes, moyennement polaires et hydrophiles.

I.2.3.4. Les gels de silice

Les gels de silice sont préparés à partir de $Si(OH)_4$ en phase aqueuse, obtenu par acidification d'un silicate de sodium, ou bien à partir d'un sol de silice (suspension dans un liquide, tel que l'eau, de microparticules (20 à 100 nm), appelées micelles, stables car trop petites pour décanter), ou bien par hydrolyse d'un alcoxy-silane. La solution fluide obtenue ne tarde pas à polymériser, ce qui conduit à un gel qui conserve sa structure lâche après rinçage et séchage. Les groupements Si-OH conduisent à des liaisons hydrogène. Il existe deux types de gels de silice : les microporeux, assez hydrophiles, et les macroporeux, versatiles, qui diffèrent par la taille des pores comme le nom l'indique.

I.2.3.5. Les argiles activées

Les argiles activées sont des alumino-silicates de formule brute proche des zéolithes, mais de structure cristalline différente. Ce sont des produits naturels, utilisés surtout pour le séchage.

I.2.4. Equations utilisées pour l'adsorption d'un soluté en phases liquide sur une phase solide

Nomenclature

C₀ : concentration initiale du soluté en solution (mol.L⁻¹)

C : concentration résiduelle du soluté en solution (mol.L⁻¹)

K₀ : constante d'adsorption adsorbat-adsorbant (L.moM) de TEMKIN

K : constante de l'équilibre d'adsorption adsorbat-adsorbant de LANGMUIR, FOWLER-GUGGENHEIM, ELOVICH

K_h : constante d'adsorption adsorbat-adsorbant de HILL et DE BOER, Kiselev

K_F : constante de la relation de FREUNDLICH

K₂ : constante d'interaction entre molécules adsorbées (kJ. mol⁻¹) de HILL et DE BOER

K_n : constante de formation de complexe entre molécules adsorbées de KfSELEV * "

m : concentration du charbon dans la solution (g.L⁻¹)

n : coefficient de l'équation de FREUNDLICH

q : capacité d'adsorption (mol.g⁻¹)

q_m : capacité maximum d'adsorption (mol.g⁻¹)

AQ : variation de l'énergie d'adsorption (kJ. moi⁻¹) de TEMKIN

Q₀ : constante énergétique de distribution numérique des sites (kJ. moM) de ZELDOVICH $n = Q_0 < RT$

W : énergie d'interaction entre molécules adsorbées (kJ.mol⁻¹) de FOWLER-GUGGENHEIM

Z : nombre de sites entourant un site donné (coordinations latérales) de FOWLER-GUGGENHEIM

θ : degré de recouvrement des sites du charbon $\theta = q/q_m$

exp : exponentielle

R : constante des gaz parfaits

T : température en degrés Kelvin[10].

I.2.5.ISOTHERMES D'ADSORPTION :

On peut décrire un processus d'adsorption à l'aide des modèles théoriques ou empiriques qui représentent la relation entre la quantité d'impuretés adsorbées par unité de masse de solide et la concentration d'impuretés en solution. On obtient une telle courbe à partir des résultats d'essais de laboratoire effectués à une température constante. Pour se faire, on introduit des quantités connues de solide dans des volumes d'eau à traiter et après un temps de contact donné, on mesure la concentration résiduelle d'impuretés en solution. Afin d'extraire cette information, il est nécessaire de modéliser les données expérimentales en utilisant une isotherme d'adsorption. [10.11]

I.2.5. 1 Remarque préliminaire :

Une ambiguïté de langage fait que le mot isotherme désigne parfois la présentation graphique d'un résultat de mesure brut, ou parfois l'équation d'une courbe utilisée pour décrire ce résultat.

L'isotherme d'adsorption relie la quantité **S** d'une espèce adsorbée par unité d'aire, de masse ou de volume d'adsorbant à la concentration **Ce** de cette espèce en solution à l'équilibre. Elle présente la réponse globale de l'adsorbant à la présence de l'adsorbat: la courbe tracée est le résultat de tous les phénomènes qui entraînent une baisse de concentration en solution regroupés sous l'appellation générique adsorption; ainsi elle recouvre des phénomènes multiples tels que la complexation ou la précipitation de surface, l'échange d'ions, l'oxydo-réduction. Notons enfin que la grande majorité des isothermes publiées dans la littérature ont été obtenues en batch et quelques autres en colonne.

Les conditions à respecter pour réaliser une isotherme d'adsorption sont:

- l'équilibre doit être atteint, d'où l'importance d'étudier la cinétique de sorption avant de tracer l'isotherme;
- les paramètres physico-chimiques doivent être maintenus constants, notamment la température et le pH, la force ionique étant fixée au départ.

La notion d'équilibre ne doit pas occulter l'aspect dynamique du phénomène d'adsorption :

L'équilibre est établi quand la quantité instantanée de soluté qui s'adsorbe est égale à la quantité instantanée de soluté qui se désorbe [12, 13]

Nous allons décrire maintenant les quelques équations d'isothermes les plus utilisées :

I.2.5.2. Isotherme de LANGMIUR:

Le type d'isotherme le plus simple a été défini par Langmuir. [14]. D'autres études ont également utilisées l'isotherme de Langmuir pour décrire l'adsorption des protéines sur des surfaces solides [15,16,17,18]. La surface du solide est représentée par un nombre de sites définis

L'application expérimentale de l'équation de Langmuir peut être placée sous la forme graphique suivant la formule: L'isotherme de LANGMUIR est proposée en 1918 [Weber et coll., 1991]. C'est un modèle simple et largement utilisé. Il est basé sur les hypothèses suivantes:

- ◆ L'espèce adsorbée est située sur un site bien défini de l'adsorbant (adsorption localisée).
- ◆ Chaque site n'est susceptible de fixer qu'une seule espèce adsorbée
- ◆ L'énergie d'adsorption de tous les sites est identique et indépendante de la présence des espèces adsorbées sur les sites voisins (surface homogène et d'interactions entre espèces adsorbées).

Il est applicable à l'adsorption monomoléculaire du soluté (S) à la surface de l'adsorbant (A) à l'équilibre. Elle est exprimée par la relation suivante [Dipa et coll., 2002; Avom et coll., 2001]:

$$Q_e = Q_m \cdot [K_L \cdot C_e / (1 + K_L \cdot C_e)]$$

Q_e : Quantité adsorbée à l'équilibre (mg/g).

Q_m : Capacité maximale d'adsorption de la monocouche (mg/g).

K_L : Paramètre de LANGMUIR.

Dans le cas d'une faible quantité de soluté adsorbée, le terme $K_L \cdot C_e$ peut être très inférieur à (1) et il est alors négligé. La relation de LANGMUIR se réduit alors à une relation directe entre la capacité d'adsorption et la concentration à l'équilibre de l'adsorbât en phase liquide :

$$Q = Q_m \cdot K_L \cdot C_e$$

Dans le cas d'une forte quantité de soluté adsorbée, le terme $K_L \cdot C_e$ devient largement supérieur à (1). Cela implique que Q_e tend vers Q_m .

Par ailleurs, la linéarisation de l'équation par passage aux inverses donne :

$$C_e/Q_e = [(1/Q_m \cdot K_L) + (C_e/Q_m)]$$

L'équation obtenue est celle d'une droite de pente $1/Q_m$ et d'ordonnée à l'origine $1/Q_m \cdot K_L$, ce qui permet de déterminer deux paramètres d'équilibre de la relation Q_m et K_L .

I.2.5.3. Isotherme de FRUNDLICH :

En 1926 FREUNDLICH a établi une isotherme très satisfaisante qui peut s'appliquer avec succès à l'adsorption des gaz, mais qui a été principalement utilisée pour l'adsorption en solution, [Arias et coll., 2002].

Si la surface n'est pas uniforme, c'est-à-dire, si les molécules adsorbées ne sont pas en interactions entre elles, on utilise l'équation de FREUNDLICH : [19]

Elle repose sur les équations empiriques suivantes :

$$Q_e = K_F \cdot C_e^{1/n}$$

Q_e : Quantité adsorbée à l'équilibre (mg/g).

C_e : Concentration d'équilibre du corps dissous (mg/l).

K_F, n : Constantes qu'il faut évaluer pour chaque solution et pour chaque température.

L'équation de FREUNDLICH est cependant plus utile sous la forme logarithmique :

$$\ln Q_e = \ln K_F + 1/n \ln C_e$$

Il s'agit de l'équation d'une droite de pente $1/n$ et d'ordonnée à l'origine $\ln K_F$.

I.2.5. 4. Isotherme de TEMPKIN

Tempkin se base sur le fait que la chaleur d'adsorption varie linéairement avec le degré de recouvrement ; cette variation peut être liée à l'hétérogénéité de la surface, ou à des interactions latérales entre molécules adsorbées [20].

L'isotherme de Tempkin [Arsianoglu et al. 2005; Baar, 2006] est représentée par l'équation suivante :

$$\Theta = RT/\Delta Q \cdot \ln K_0 \cdot C_e$$

Θ : représente le taux de recouvrement de la surface de l'adsorbant, il est donné par la relation :

$$\Theta = Q_e/Q_m$$

C_e : Concentration à l'équilibre en (mg/l).

K_0 : Constante d'équilibre.

ΔQ : Variation de la chaleur d'adsorption (kJ/mole).

Q_e : Quantité adsorbée en (mg/g).

Q_m : Capacité maximale d'adsorption en (mg/g).

La linéarisation du modèle de tempkin a donné l'équation suivante :

$$Q_e = Q_m \frac{RT}{\Delta Q} \ln K_0 + Q_m \frac{RT}{\Delta Q} \ln C_e$$

Si on trace $Q_m = f(\ln C_e)$, on obtient une droite de pente et d'ordonnée à l'origine qui nous permettent le calcul de K_0 et ΔQ .

I.2.6. CINÉTIQUE D'ADSORPTION

La cinétique de l'adsorption des protéines plasmatiques a été largement étudiée en utilisant divers techniques expérimentales [21,22].

Le processus réactionnel de l'adsorption d'un soluté à la surface d'un adsorbant est complexe. En effet, le soluté doit atteindre la surface active et son cheminement vers celle-ci se décompose en plusieurs étapes de transfert modifiant à chaque fois les potentiels chimiques des différentes espèces.

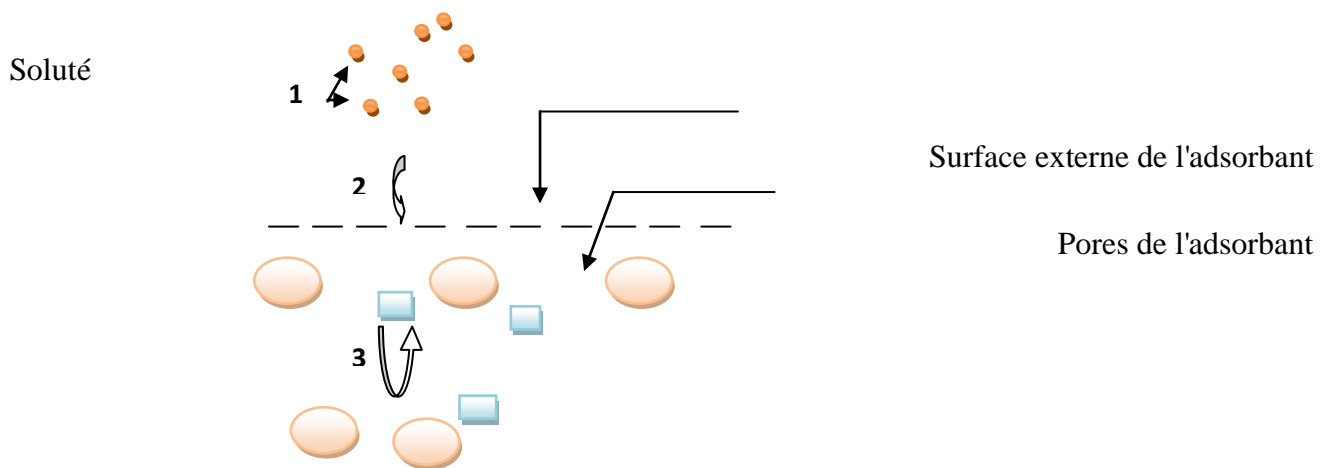
L'équilibre de l'adsorption est atteint quand tous les sites de la surface sont saturés ce qui correspond à la capacité de surface. Celle-ci correspond à une concentration en protéine faible, Brash et coll. [23] ont déterminé, par exemple, des valeurs de $0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour l'albumine.

Dans le plasma, les cinétiques et les équilibres sont différents en raison de la compétition entre les différentes protéines [24].

Il est admis, en général, que le processus de l'adsorption peut être divisé en trois étapes:

- Le soluté diffuse vers le grain de l'adsorbant.
- Le soluté diffuse dans les pores de l'adsorbant.
- L'adsorption à lieu.

Si l'adsorbant n'est pas poreux, c'est l'étape du transfert de masse externe qui contrôle la vitesse d'adsorption, et si l'adsorbant est poreux (ce cas est le plus souvent), c'est l'étape de transfert de masse interne qui limite la vitesse d'adsorption. La figure suivante schématise les transferts de matière successifs :



- (1) : Le soluté diffuse vers l'adsorbant.
- (2) : Le soluté diffuse les pores de l'adsorbant.
- (3) : L'adsorption proprement dite.

I.2.7. TECHNIQUES D'ANALYSE DE L'ADSORPTION

Plusieurs techniques expérimentales sont actuellement utilisées pour obtenir des informations concernant l'adsorption des protéines sur les surfaces.

Parmi les différentes méthodes, celles qui permettent de déterminer la concentration de la protéine libre à l'équilibre avec un matériau sont les plus simples. Des méthodes chimiques et biochimiques sont de même employées, comme les techniques immunologiques.

Les techniques analysent seulement le mécanisme d'adsorption d'une protéine donnée sur un matériau adsorbant. La spectroscopie et les méthodes optiques sont plus précises.

I.3. ETUDE DE L'ALBUMINE :

I.3.1. Généralité

L'albumine est une protéine plasmatique produite par le foie, l'intervalle normal de concentration en albumine dans le sang est 35 à 50 g/l, et elle représente habituellement environ 60% des protéines

plasmatiques, toutes les autres protéines du plasma sont désignées collectivement sous le nom de globulines.

L'albumine est essentielle pour le maintien de la pression oncotique indispensable pour la bonne répartition des liquides entre les vaisseaux sanguins et les tissus.

I.3.2. Structure biochimique de l'albumine :

Le sérum albumine humaine est une protéine monocaténaire de 585 résidus ayant un poids moléculaire de 68000 daltons. La séquence polypeptidique a été depuis confirmée par la séquence génomique.

Une étude de la séquence en acides aminés a permis de dénombrer 35 cystéines dont les positions influent sur la structure tertiaire de la molécule en la stabilisant par 17 ponts sulfures.

L'organisation de la molécule en domaines et boucles a été confirmée par les études de fragmentation de l'albumine, en particulier, l'action du bromure de cyanogène.

Celle-ci a permis l'obtention de trois fragments A, B et C résultant d'une coupure au niveau des résidus méthionines 123 et 198 localisés sur les brins reliant les boucles [25,26,27].(figure I-1).



Figure I.1: Structure tridimensionnelle de l'albumine avec ses 3 domaines et ses ponts disulfures [28].

I.3.3. Propriétés physico-chimiques de l'albumine

A l'intérieur du pool des protéines plasmatiques, l'albumine humaine occupe quantitativement et qualitativement une place prépondérante, c'est en effet le constituant majeur du sérum.

Le taux d'albumine humaine est compris entre 38 et 44 g/l dans une population normale, lorsque l'albumine est dépourvue de tous les ligands, c'est une protéine incolore, dont la molécule porte plus de 200 résidus chargés, ce qui confère une hydrophilie importante et lui assure une grande solubilité.

Sa charge électrique nette est de -18 dans les conditions physiologiques, et son point isoélectrique se situe entre 4,8 et 5,6 sa valeur exacte dépend de la force ionique du milieu.

L'hydrophilie élevée de l'albumine, lui permet de prendre en charge 75 à 80% de l'effet oncotique du plasma. C'est une protéine soluble isolée de la fraction V de Colin, qui peut être obtenue sous forme cristallisée par addition de sels minéraux.

Elle est dotée d'une grande capacité de combinaison in-vivo (acides gras, bilirubine, quinine, strychnine, pénicilline). Grâce à ses groupements tyrosyl, elle peut aisément fixer l'iode.

Une couche dense de molécules d'albumine disposées sur une surface dans le sens de leur longueur (couchées) correspond à une concentration interfaciale d'environ $0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; une couche dense de molécules orientées perpendiculairement à la surface (debout) donne une concentration interfaciale de $0,71 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. La séparation des différentes formes moléculaires est réalisée par la technique de l'électrophorèse en gel polyacrylamide, c'est la molécule la plus rapide en électrophorèse [29,30].

I.4. Les Adsorbants Hydrogels :

I.4.1- Définition :

Un **hydrogel** est un gel dans lequel l'agent gonflant est l'eau. La matrice d'un hydrogel est généralement un réseau de polymères. Ces derniers sont insolubles dans l'eau, mais sont capables de gonfler substantiellement en présence d'une grande quantité d'eau ou de solutions aqueuses telles que les fluides biologiques. Les polymères utilisés pour fabriquer un hydrogel peuvent être superabsorbants.

Il a diverses applications biomédicales notamment dans les systèmes de délivrance de médicaments, dans le traitement de brûlures cutanées et dans les lentilles de contact souples. Il peut être imprimé en 3D.

Des hydrogels existent dans la nature avec comme exemples des mucilages fongiques, les œufs de grenouilles et de crapauds (qui gonflent au contact de l'eau) ou le mucusfilmo-filamenteux défensif des myxines.

I.4. 2- Classification des hydrogels :

La structure d'un hydrogel dépend de son mode de préparation. La formation d'un hydrogel peut résulter soit d'une réticulation physique due à un enchevêtrement de liaisons associatives telles que les liaisons hydrogène, les liaisons de Van der Waals entre les chaînes, soit à une réticulation chimique due à la présence des liaisons chimiques covalentes ou ioniques ils peuvent être synthétisés par réticulation de deux unités de monomère, au moins un des monomères doit être plus hydrophile que l'autre pour rendre l'hydrogel plus absorbant.

Les hydrogel peuvent être : neutre (figure (a)) ou ionique (cationique ou anionique) (figure (b et c), selon la nature de base des groupements –type de charge.

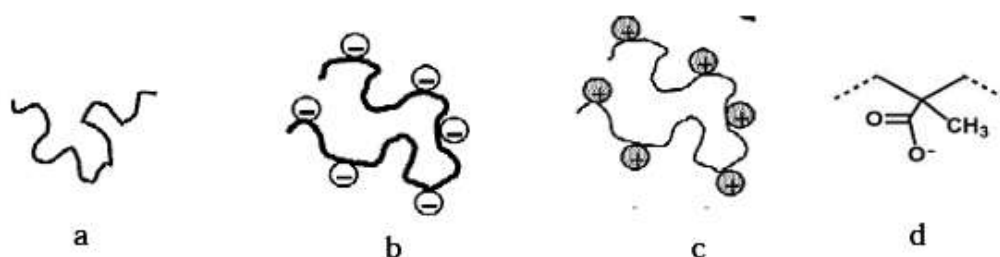


Figure I.3: Différents types d'hydrogels : (a) neutre, (b) anionique, (c) cationique et (d) avec des groupements pendants ioniques

Quand l'hydrogel est immergé dans un solvant compatible thermodynamiquement, le solvant diffuse dans l'hydrogel, et provoque une extension des chaînes considérable

Ainsi la diffusion du solvant provoque un gonflement du réseau certain jusqu'à un volume d'expansion qui peut être considérable. Cette expansion ou gonflement du réseau peut être exprimée par le taux de gonflement en volume ou en poids, le taux de gonflement en poids d'un hydrogel est déterminé selon l'équation :

$$Q = m_{hg} / m_{hs}$$

m_{hg} : masse de l'hydrogel obtenu à l'état gonflé dans l'eau distillée

m_{hs} : masse de l'hydrogel obtenu à l'état sec

I.5. La Chélation

Chélation est un type de liaison des ions et des molécules à des ions métalliques. Il implique la formation ou la présence de deux ou plusieurs liaisons de coordonnées séparées entre un ligand polydenté (à liaisons multiples) et un seul atome central. ^{[1][2]} Ces ligands sont appelés chélateurs. Ce sont généralement des composés organiques, mais ce n'est pas une nécessité, comme dans le cas du cuivre et de son utilisation comme adsorbant pour l'absorption de l'albumine.

I.5.1 Effet chélateur objet de notre étude :

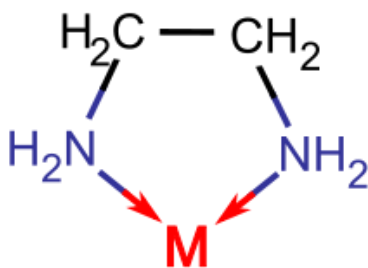


Figure I.3 : Ethylènediamine ligand de chélation à un métal avec deux liaisons

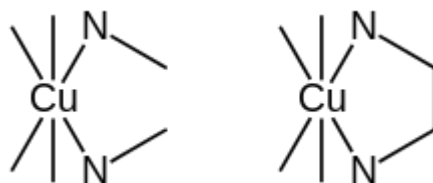


Figure I.4 : Complexes de Cu^{2+} avec ligands méthylamine nonchélatants (à gauche) *et* éthylènediamine chélatante (à droite)

L'effet chélate est la plus grande affinité des ligands chélateurs pour un ion métallique que celle des ligands non chélateurs (monodentates) similaires pour le même métal.

Les principes thermodynamiques sous-tendant l'effet chélate sont illustrés par les affinités contrastées du cuivre (II) pour l'éthylènediamine (en) par rapport à la méthylamine.

En (1), l'éthylènediamine forme un complexe chélate avec l'ion cuivre. La chélation entraîne la formation d'un cycle CuC_2N_2 à cinq chaînons. En (2), le ligand bidenté est remplacé par deux ligands méthylamine monodentate d'approximativement le même pouvoir donneur, indiquant que les liaisons $\text{Cu} - \text{N}$ sont approximativement les mêmes dans les deux réactions.

L'approche thermodynamique pour décrire l'effet chélate considère la constante d'équilibre de la réaction: plus la constante d'équilibre est grande, plus la concentration du complexe est élevée.

I.5. 2 En biochimie et microbiologie

Pratiquement tous les métalloenzymes contiennent des métaux qui sont chélatés, généralement en peptides ou en cofacteurs et en groupes prothétiques. De tels agents chélateurs comprennent les anneaux de porphyrine dans l'hémoglobine et la chlorophylle . De nombreuses espèces microbiennes produisent des pigments solubles dans l'eau qui servent d'agents chélateurs, appelés sidérophores . Par exemple, les espèces de *Pseudomonas* sont connues pour sécréter de la pyochéline et de la pyoverdine qui se lient au fer. L'entérobactine , produite par *E. coli* , est l'agent chélatant le plus puissant connu. Les moules marines utilisent la chélation du métal esp. ^{Chélation} Fe ³⁺ avec les résidus de Dopa dans la protéine de pied de moule-1 pour améliorer la résistance des fils qu'ils utilisent pour se fixer aux surfaces. ^{[10] [11] [12]}

Chapitre II. PARTIE EXPERIMENTAL

II. 1. Matériel et Méthodes :

II. 1. 1. Matériel :



Figure II.1:photo d'un appareil UV-vis



Figure II.2 :photo d'un appareil IRTF.(FTIR-8300 Shimadzu)

Spectroscopie infrarouge

L'analyse spectroscopique infrarouge permet une identification rapide des fonctions présentes dans les différentes résines.

Les spectres IR sont obtenus au moyen d'un spectrophotomètre à faisceau, type FTIR-8300 Shimadzu, sur des pastilles d'environ 100 mg obtenues par compression d'une poudre du polymère dispersée à 5 % dans du KBr anhydre.

Malgré de très nombreuses bandes d'absorption (figure II.1.....) du polymère, on distingue cependant nettement les bandes caractéristiques des différentes substitutions réalisées, les fonctions suivantes sont ainsi observées, $-\text{SO}_2\text{Cl}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ et $-\text{NH-CO-}$ etc.,.

II. 1. 1. Produits et réactifs

Produits :

Produits	La masse	La masse molaire	
PS	5g	17300g/mol	
PEI	0.2g	43.04g/mol	
ASH	1g	65000g/mol	

Reactifs :

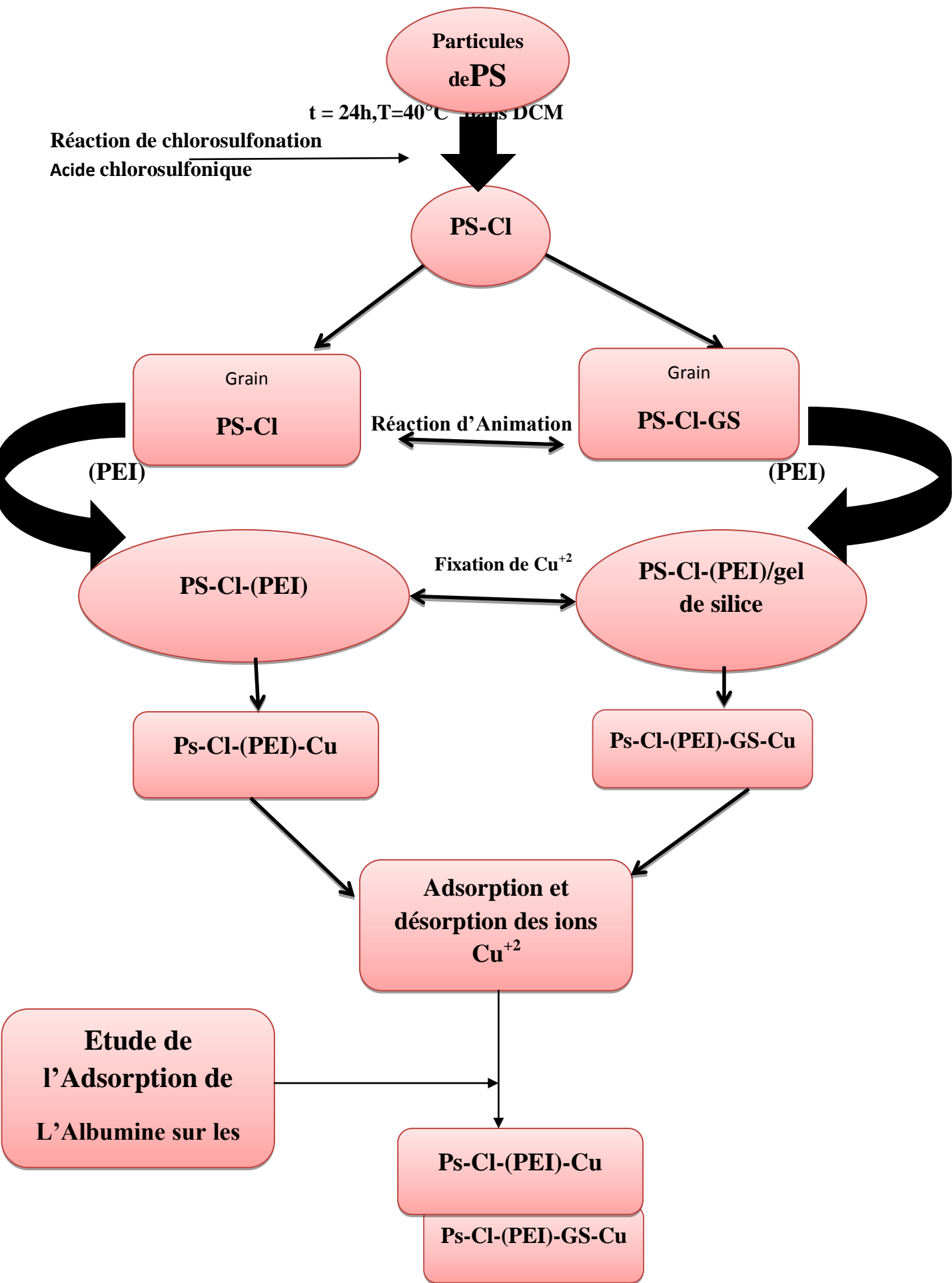
Réactifs	La maase molaire	volume	
DCM	84.93g/mol	50ml	
Acide chlorosulfonique	116.52g/mol	10ml	

II. 2.SYNTHESE ET CARACTERISATION DES SUPPORTS

La voie de synthèse (greffage du ligand PBC sur le support fonctionnel) que nous avons explorée a été le greffage par une réaction a partir d'un groupement fonctionnel contenant un atome de chlore labile : CH_2Cl ou SO_2Cl , pour produire le support fonctionnalisé sur lequel on souhaiterait greffer d'une façon covalente le bras espaceur qui est l'Ethylènediamine 'EDA'.

Pour réaliser et mettre en œuvre cette approche nous avons mis au point l'organigramme suivant : qui se résume en deux parties une partie synthèse qui est consacrée a la description du protocole de synthèse des matériaux objet de notre travail et une deuxième partie consacrée a la

Mise en évidence de l'existence d'une affinité de l'albumine grâce a des interactions de type chelatrice entre les matériaux préparés et grâce a l'étude de l'adsorption de cette protéine sur ces matériaux chélateurs via des ions du Cu^{2+} .



II.2.1.SYNTHESE DES SUPPORTS PS-SO₂CL ET PS-SO₂-AMINES.

En s'inspirant des travaux précédents [31-32] nous avons mis en place une stratégie de synthèse de supports chlorés, suivie de l'introduction de bras espaceur portant une fonction amine le PEI :

le support solide PS-SO₂Cl précédemment préparés, et l'étape de greffage laisse sur le support la fonctionnalité **amine primaire** libre, qu'il est possible d'exploiter par la suite dans la réaction de chélation des molécules du PEI par des cations Cu²⁺.

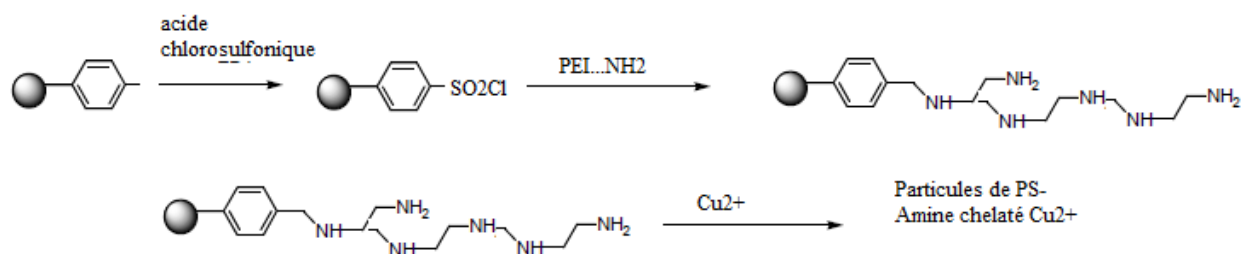


Figure II.3 :Schéma réactionnel, étapes de synthèse des supports chélateurs.

Avec ce support solide, nous avons cherché à immobiliser la molécule de HSA avec le minimum de variations structurales ou fonctionnelles. D'après ces résultats, il semble que le PS ainsi modifié, et plus particulièrement PS-SO₂Cl qui permet d'obtenir les meilleurs résultats en termes de rendement et d'accès.

Nous avons présentés aussi des photos de microscopie effectuée sur les échantillons de résines sèches (Figure II. 2).

II.2.2.Les dérivés aminés du PS-SO₂CL

Cette partie est consacrée à l'étude de la réaction de sulfonation du copolymère ST/PEI par l'acide chlorosulfurique et consiste à introduire un groupement chlorosulfonique sur le polystyrène.

En fait, il a déjà été démontré au laboratoire que la cinétique de fixation d'acide aminés comme la cystéine, et l'histidine, etc., sur les résines PSSO₂Cl, s'est révélée difficilement reproductible, car la réaction s'effectue en milieu hétérogène, composé de plusieurs phases peu compatibles, le polymère insoluble, le solvant organique et les réactifs hydrosolubles. Cette hétérogénéité n'a pas permis d'obtenir un taux de substitution satisfaisant. Pour essayer d'accélérer la réaction de substitution, un milieu basique a été utilisé comme milieu réactionnel.

En effet, la détermination des valeurs moyennes des compositions ne nous renseigne en aucune manière quant à l'hétérogénéité de la distribution des groupements fonctionnels dans la phase solide ; celle-ci provient du fait que les cinétiques globales sont la résultante d'une part de la vitesse locale des réactions au sein du polymère, et d'autre part, de la diffusion des réactifs depuis la surface jusqu'au cœur des résines.

L'étape activation et de fonctionnalisation est une phase critique dans le processus de synthèse qui nécessite donc des conditions spécifiques notamment éviter la présence d'oxygène dissous dans le milieu réactionnel qui peut nuire au rendement de la réaction qui est donc éliminé par barbotage de l'azote. Le mélange est porté à une température de 40°C pendant 4h à la fin le copolymère est récupéré selon la procédure décrite ci-après.

II.2.3. Protocole de Préparation des supports PS-SO₂Cl et PS-SO₂-Amine

Dans un réacteur thermostaté, des substrats de polystyrène (sous forme de billes) ont été immergés dans l'acide chlorosulfonique à température ambiante. Après 20 minutes, les échantillons ont été prélevés et lavés à froid. Enfin, ils ont été lavés dans un mélange éthanol/eau et séchés à température ambiante.

Dans un protocole typique, 5 g de polystyrène sont mélangés avec 10 ml de dichlorométhane (CH₂Cl₂), pendant unedemi heure sous agitation douce, pour le gonflement, est alors ajouté 40 ml d'un mélange d'acide chlorosulfonique H₂SO₃Cl et DCM dans rapport de 1/4 avec précaution car la réaction est exothermique. Le mélange est maintenu à 40°C pendant 4 heures sous agitation. Voir le montage ci-après.



Figure II.4 : Montage expérimentale utilisé dans la réaction de chlorosulfonation du PS par l'acide chlorosulfonique

Après réaction, le produit final est filtré et lavé au DCM et séché à l'abri de l'air.

Tableau 2 : récapitulatif des conditions de modification du PS

Rapport	La masse	Volume	Risque	Forme		
PS/Acide Chlorosulfonique	3g		Inflammable toxique	Grain		
PS-Cl/PEI		10ml	Irritant	Grain		



Figure II.5 : Photos, Observations d'une importante modification de l'aspect externe visuel des particules finis de PS après la réaction de fonctionnalisation

II.2 .4. Préparation des matériaux chélateurs utilisés comme adsorbants :

La préparation de matériaux insolubles que nous avons appelés “HSA-Chelate” a donc été envisagée, le matériau de base est une résine polystyrène, se présentant sous forme de particules, qui sont modifiés par la fixation des ions Cu^{2+} via des groupements chélateurs portant NH_2 qui sont les portés par les chaînes de PEI via un pont (-NH) (réaction d’amination, figure II.1 et figure II.2. N.BELATTAR et Col ont pu démontrer les propriétés “ heparin-like” de ces résines modifiées. Des supports de PS-DVB fonctionnalisés par des groupements chlorosulfonyle modifiés par des acides aminés ont également pu être préparés et leur affinité vis-à-vis de l’albumine étudiée [33].

Méthode de fixation des ions Cu^{2+} :



Figure II.6 : Nature de la solution de Cu^{2+}

Les substrats chlorosulfonyles aminés ont été mis en contact avec 100ml de solutions aqueuses de Cu^{2+} ($C = 0.02 \text{ mol}$) en batchet mis à réagir pendant un intervalle de temps allant de 5 à 10 min à température ambiante avec des doses fixes de supports mais des temps d’incubation variables. A la fin, les différents matériaux ont été récupérés, rincés à l’eau et séchés à température ambiante.

Les prélèvements au cours du temps ainsi que le dosage des ions Cu^{2+} résiduels permettent de suivre les cinétiques d’adsorption du cuivre sur ces supports.

Dosage de Cu^{2+} :

Pour déterminer la teneur des ions Cu^{2+} dans les échantillons d’eau, nous avons employé un

spectrophotomètre UV-vis (.....). La gamme de mesure varie de 0 à 5mg/l avec une précision de 0,02 mg/l.

II.2.5. Etude de l'adsorption de l'albumine sur les Adsorbants préparés

Dans cette partie du travail, nous avons délibérément choisi de travailler sur un système défini et simplifié que nous dénommons système purifié, c'est à dire dépourvu de toute autre protéine plasmatique que celle qui nous intéresse, à savoir l'Albumine humaine.

Nous avons donc essayé de tester l'affinité de cette protéine vis à vis des résines préparées. Nous avons alors étudié les différents paramètres qui expriment ce phénomène : constante d'affinité, surface spécifique.



Figure II.7 : le protocole expérimental l'adsorption de l'albumine.

II.2.5.1. Méthode de dosage de la concentration de l'albumine

Avant toute procédure de dosage, l'Albumine qui se trouve initialement sous forme de particules solides, obtenue de la compagnie de chimie SIGMA et qui est de type (A- 1953) est dissoute dans l'eau (20mM) qui constitue la solution d'Albumine dans un pH proche du pH physiologique de 7,3.

La méthode utilisée pour doser la concentration de l'Albumine est celle de la spectroscopie UV-vis.

Tout d'abord, on établit une concentration donnant la densité optique mesurée à 288 nm en fonction de la concentration de la protéine qui constituera la courbe d'étalonnage de la HSA.

Pour lire la densité optique (D.O), on a utilisé un spectrophotomètre visible de type (spectroscopie)

et deux cuvettes en verre.

On prépare ensuite des solutions constituées de 10 ml de la solution d'Albumine, dans la cuvette de référence la solution d'Albumine est remplacée par l'eau.

Après un temps d'incubation donné, on lit la densité optique correspondant à la concentration de la protéine à une longueur d'onde fixée à **288nm**. La courbe d'étalonnage ainsi obtenue est représentée sur la figure II **9.voirannex**

La solution de HSA à différentes concentrations, est mise à incuber à 25°C, avec une concentration donnée de résine pendant 20 mn. Après décantation de la résine, le surnageant est prélevé et sa concentration en HSA mesurée. Les isothermes d'adsorption sont établies en portant la concentration de HSA adsorbée en fonction de la concentration de HSA initialement introduite. Les concentrations sont lues sur la courbe d'étalonnage.

Protocol :

Prendre 6 tubes et dans chaque tube mettre 50mg du produit, des volumes variables de la solution d'albumine sont ajoutés un gradient de volume de 10 micro. On complète ensuite les différents tubes à 5ml avec eau distillée.

Agiter à la main pendant 20mn. Ensuite laisser décanter et prendre 4ml et faire une lecture UV après avoir déterminé préalablement la longueur d'onde max.

II.2.6.Détermination des Isothermes d'adsorption de l'albumine

Pour apprécier l'affinité de l'Albumine pour les supports préparés, il est nécessaire d'établir les isothermes d'adsorption.

Les solutions d'Albumine sont mises en contact avec des masses fixes (**xmg**) de résines dans des tubes à essais, maintenus à la température ambiante de 25°C ; ils y sont sous agitation magnétique pendant 20 mn.

Pour le dosage, il est nécessaire de diluer les solutions d'albumine afin d'avoir des résultats précis et des concentrations comprises entre 0 et 1.2 mg/ml, le domaine où la loi de Beer-Lambert reste vérifiée.

Les figuresII.8montre les isothermes d'adsorption des deux supports. On constate que dans les deux cas, la concentration de HSA adsorbée, donne lieu à une augmentation initiale de la quantité

adsorbée pour de faibles concentrations (adsorption presque quantitative puis croît pour atteindre un plateau de saturation aux fortes concentrations).

Les courbes typiques obtenues avec l'interface PS-SO₂NH et PS-SO₂NH/Silice (composite) traduisant les variations de la concentration interfaciale G avec la concentration de la solution d'équilibre sont présentées sur la figure **II.8**. On remarque :

* une croissance rapide de G aux faibles concentrations.

* L'existence d'un plateau de saturation aux fortes concentrations (valeur notée G_y) qui est pratiquement atteint à une concentration de l'ordre de 1.2 g/ml et 1.0 g/ml pour les résines PS-SO₂NH et PS-SO₂NH/Silice, respectivement.

Dans l'hypothèse d'une adsorption de la HSA sur ces supports, cette concentration au plateau de saturation représente la capacité d'adsorption limite de la résine pour l'albumine, les sites étant alors saturés. Partant de ces simples observations qualitatives on a conclu que les isothermes étaient de type LANGMUIR. Une telle assertion peut être vérifiée de manière quantitative, comme nous allons le montrer (figure II.8).

II.3. RESULTAS ET DISCUSSIONS :

II. 3. 1. Caracterisation des Adsorbants préparés :

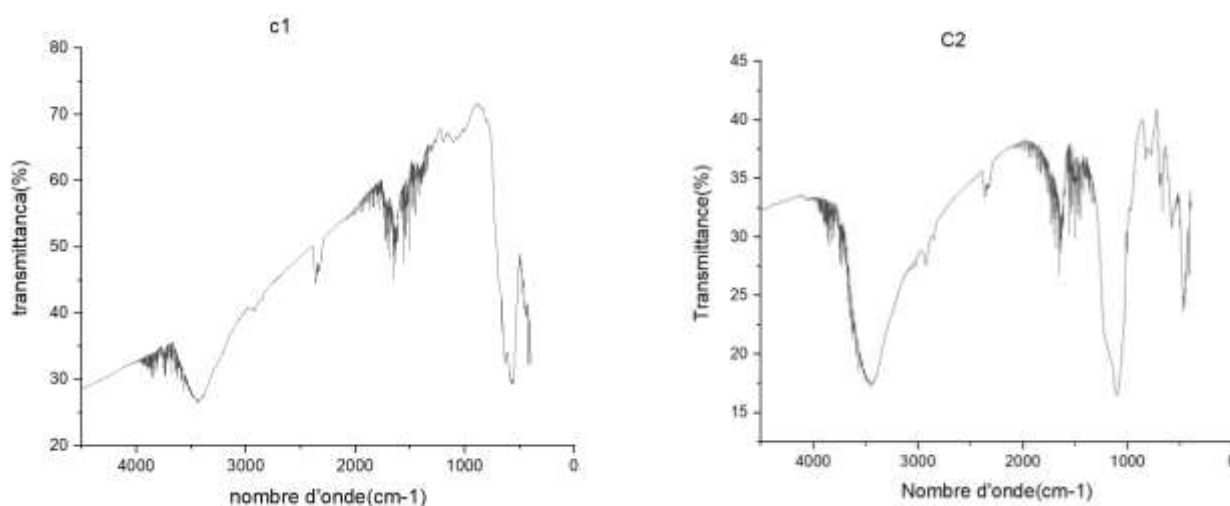


Figure II.8 : Spectres IR des adsorbants préparés, 1) PS modifié, 2) Composite PS/Si modifié.

L'analyse chimique des surfaces modifiées a été effectuée par spectroscopie IR, deux spectres d'échantillon de PS exposée aux différentes modifications :

Lors de chlorosulfonation, le spectre IR est considérablement modifié et de nouvelles bandes fortes dues aux symétrique à 1370 cm^{-1} et asymétrique O=S=O liaisons de valence à 1170 cm^{-1} dans le groupe chlorosulfonyle peut être observée. En outre, une nouvelle bande apparaît à 830 cm^{-1} en raison de la formation de cycles aromatiques para-substitués.

Sur la figure **II. 8**, le changement du Spectre FTIR du PS chlorosulfonyle s'affiche lorsque il réagit avec la solution de l'amine (PEI) : la bande symétrique due aux O=S=O à 1370 cm^{-1} disparaît presque complètement et apparaît à 1315 cm^{-1} des groupes sulfonamide; la bande asymétrique O=S=O à 1170 cm^{-1} est légèrement décalé vers 1152 cm^{-1} .

En outre de nouvelles bandes apparaissent à 1094 cm^{-1} dues a la liaison de valence C-N et les bandes à 3368 et 3279 cm^{-1} qui dues à la liaison de valence N-H associés et non associés, respectivement.

Apparaît également une bande intense 'C2' entre 1100 et 950 cm^{-1} qui correspondent aux groupes SiO_2 principales du gel renfort affecté par la réaction de modification et les intensités des bandes à 1370 cm^{-1} , qui sont dues à la liaison de valence O=S=O des groupes SO_2Cl , sont observées.

II. 3. 2. Utilisation des Adsorbants préparés :

Fixation du cuivre

Afin d'observer l'effet du temps d'agitation sur la fixation du cuivre par chélation à la chaux, nos essais ont été réalisés sur une solution synthétique contenant initialement **10 mg** de Cu^{2+} par litre. Des doses constantes (5 à 100 mg/ml) sont introduites.

Le suivi de la variation de la concentration du cuivre résiduel en fonction du temps a abouti aux résultats présentés sur la figure. 1.

Cinétiques d'adsorption :

Nous avons suivi les cinétiques des réactions pour une teneur initiale constante en cuivre (**10 mg/ml**) et pour une masse constante de chacun des deux supports (200 mg/ml). Le suivi de la teneur résiduelle en cuivre a été effectué en fonction du temps d'agitation (de **10 minute à 50 mins**).

Les résultats présentés montrent que la cinétique de fixation du cuivre sur les supports est très rapide. Le temps d'équilibre peut être estimé à **20 minutes** d'agitation quelque soit le type de support. Ce temps correspond au maximum d'efficacité de l'adsorption du cuivre et donc au minimum des teneurs en cuivre résiduel. Au delà de ce laps de temps, nous **pouvons néanmoins observer une remontée des teneurs du cuivre en solution, caractéristique d'une désorption du Cu^{2+}** .

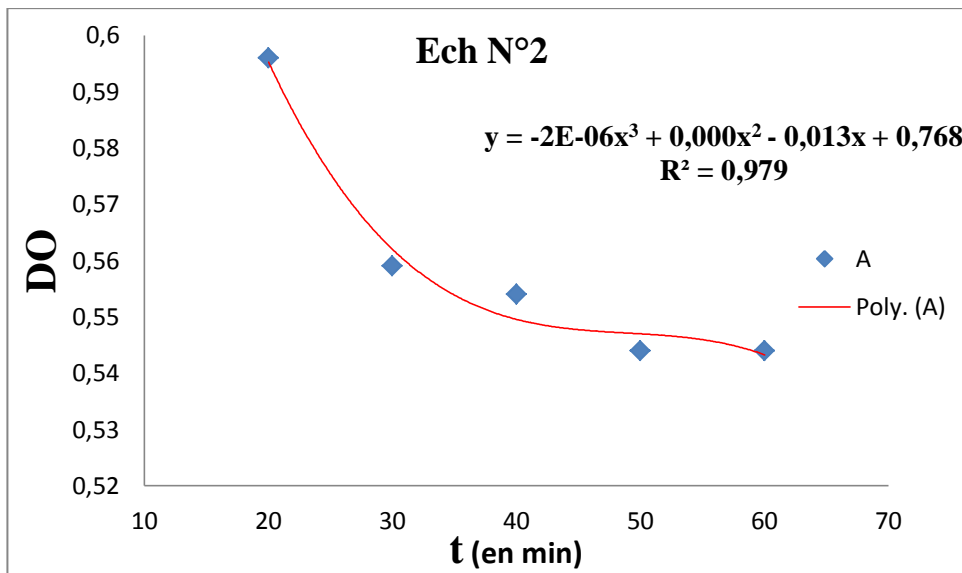
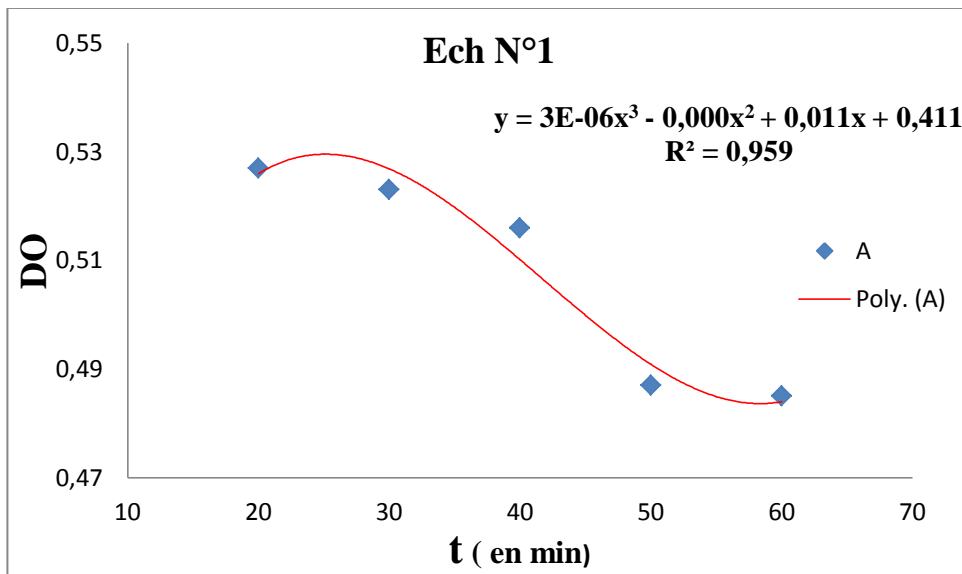
L'évolution des cinétiques de fixation du cuivre sur les supports démontre avant tout la réversibilité des échanges mis en jeu et la nature physique des interactions support-cuivre.

Ainsi le relargage des ions adsorbés peut se produire s'il y a un déplacement des équilibres entre les différentes formes ioniques de l'élément dans l'eau. Le pH pourrait jouer un rôle important dans le déplacement de l'équilibre. En effet, nous avons pu observer, tout au long de l'agitation, pour tous les essais de relargage, une augmentation entre 10 minutes et 50 min (figures) D'après les résultats présentés sous forme de modèles linéaires sur la figure....., nous pouvons constater que les rendements d'élimination du cuivre augmentent avec le temps d'une **manière polynomiale d'Ordre 3 ou 4**.

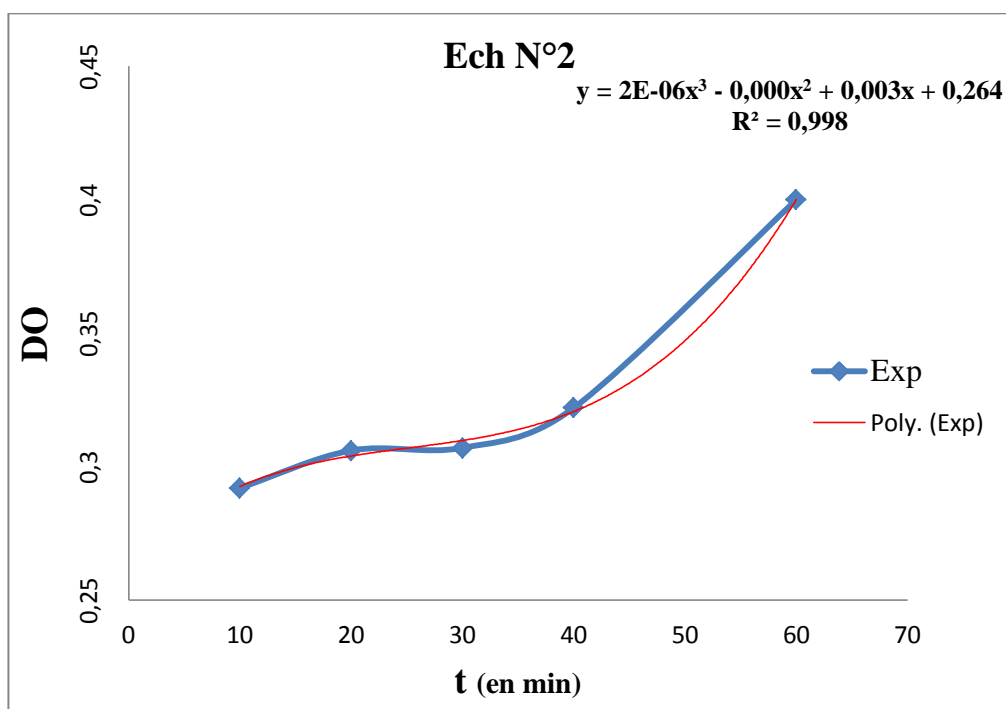
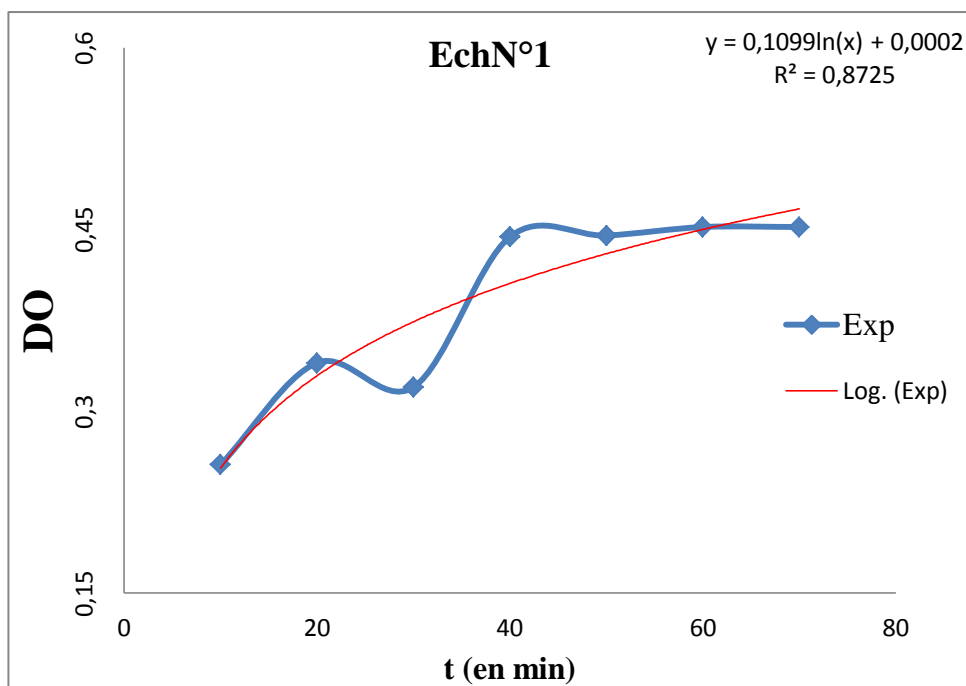
Désorption des ions Cu^{2+}

En parallèle, nous observons une amélioration d'élimination du cuivre, qui peut être liée à la

a-Adsorption



a-Adsorption des ions de Cu²⁺



Adsorption de la HSA :

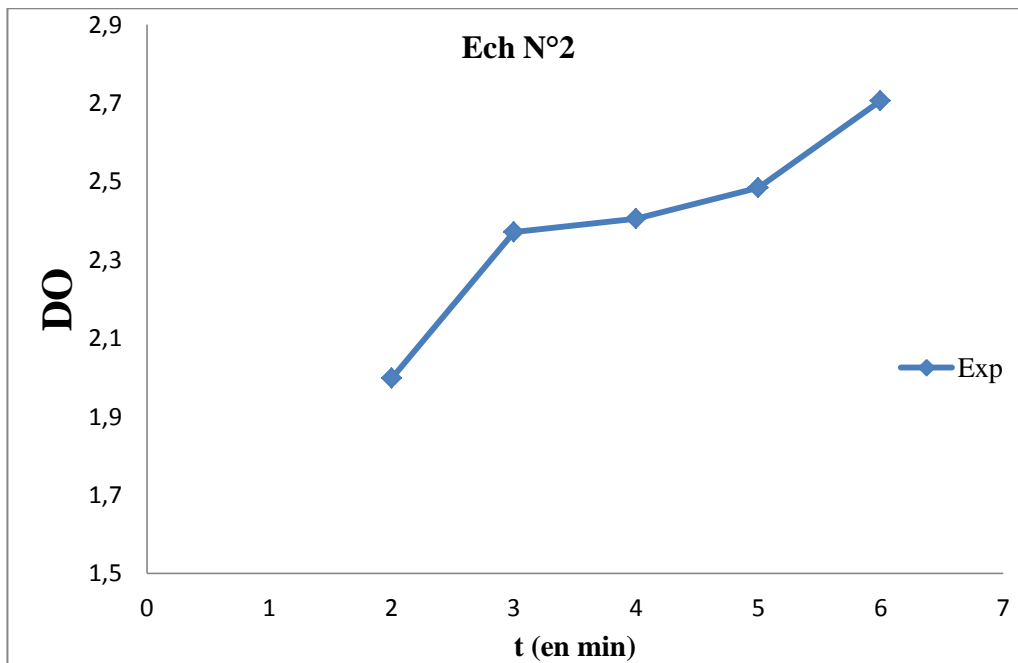
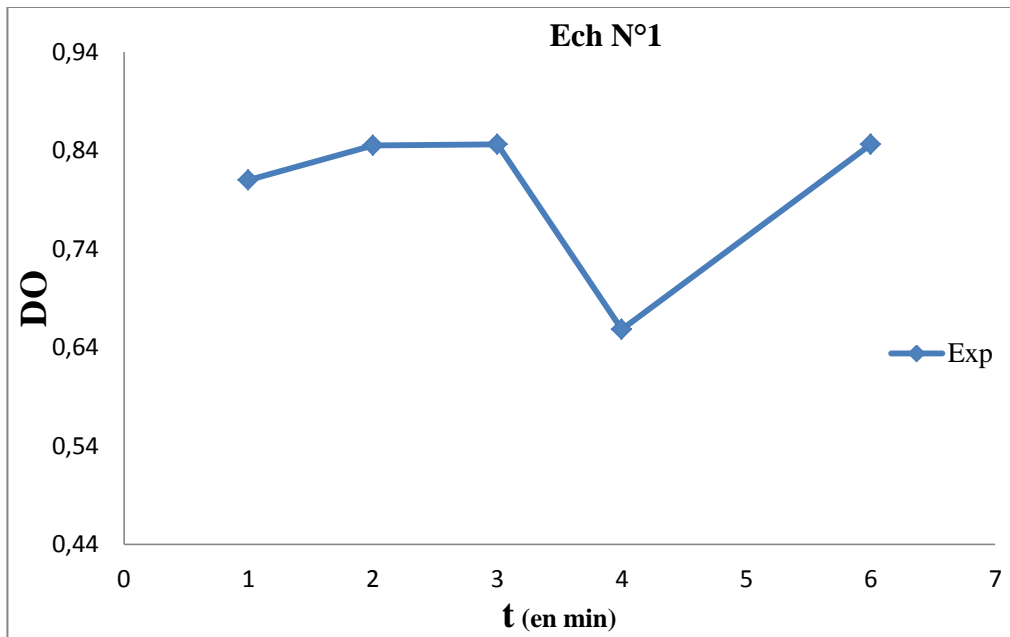


Figure II.8 : Isothermes d'adsorption à 25°C, de l'albumine sur **PS-NH**: variation de Q_{ads} , Concentration interfaciale, en fonction de C , concentration de la solution d'albumine.

III. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre approche actuelle, utilisant la chélation des ions du cuivre, semble assez efficace vis-à-vis de la protéine ciblée. Voilà pourquoi nous proposons d'élaborer de nouveaux chélateurs qui soient sélectifs du cuivre(II). Après un premier chapitre introductif sur, l'élaboration des deux supports chélateurs à bases de PS modifié sera présentée ainsi que l'étude des complexations de ces deux types de ligands pour le cuivre(II). Enfin, la fonctionnalisation de ces deux familles de chélateurs c'est proposée ainsi que les premiers tests sur des l'adsorption de la HSA.

Dans le sang, le cuivre est à nouveau au degré d'oxydation +II. Il est principalement pris en charge par l'albumine (180 µg de Cu associé par litre de plasma [34]), jusqu'au foie.

La plupart des études ont été faites en utilisant les techniques spectroscopiques telles que la spectroscopie UV-visible, la luminescence, la spectroscopie EXAFS, la diffraction des rayons X, la RMN. Cette dernière technique est un outil très utilisé pour déterminer la coordination du métal dans les sites de liaisons des protéines [35].

Au sein des métallochaperonnes, le cuivre(I) est coordonné par deux cystéines du site de fixation dans un arrangement S-Cu-S. Ces protéines possèdent une affinité élevée pour le cuivre mais qui leur permet néanmoins de pouvoir transférer Cu^+ à leur protéine cible. Au sein des metallothioneines, l'environnement du cuivre est différent. Le rôle de ces protéines est de séquestrer le cuivre et elles possèdent donc une meilleure affinité que les metallochaperonnes. En effet, le cuivre est complexé par trois cystéines dans un environnement CuS_3 , ce qui lui confère une affinité plus forte. Si on s'en réfère aux protéines du vivant, augmenter le nombre de cystéines afin de complexer plus fort le cuivre semble donc intéressant. De nouveaux chélateurs contenant plus de cystéines pour augmenter l'affinité pour le cuivre(I) ont donc été élaborés. Si nous augmentons le nombre de cystéines, nous augmentons l'effet chélate. Rappelons que de nombreux ligands présentant plusieurs atomes donneurs susceptibles de former des liaisons avec un cation métallique, sont des ligands polydents ou charlatans.

Dans la synthèse de cet intermédiaire, le polymère du type PS- SO_2Cl contient de du chlore en quantité importante. Dans ce cas, les dosages des groupes amines ont été effectués par la méthode spectroscopique. Il apparaît ainsi que le taux de substitution du polystyrène par les groupements amines peut ainsi atteindre 60 % des noyaux aromatiques.

Il apparaît également, que nous avons pu synthétiser par des réactions effectuées en phase hétérogène, des résines porteuses de groupements fonctionnels, COOH et NH_2 et avec des taux de substitution acceptables.

Les différentes méthodes de caractérisation ont permis d'établir, dans les différentes étapes de synthèse, par des résultats concordants, l'obtention des fonctions désirées :

-SO₂Cl, -NH₂, --NH-CO et -SO₃H sur les molécules de polystyrène réticulé. Les groupements sont majoritairement greffés en position para sur les noyaux aromatiques et sont uniformément répartis à travers toute la masse du copolymère.

L'étape intermédiaire d'hydrolyse qui suit l'étape de nitration a permis l'obtention de taux de substitution en groupements amine élevés. Ce qui conduit à des taux améliorés en groupements. Il est à noter cependant que ces taux sont surestimés en raison de la présence parasite de groupements formés durant les étapes antérieures. Nous obtenons en fin de réaction des résines mixtes.

Ainsi nous avons obtenu à la fin par synthèse deux supports comportant à leur surfaces des groupements chélateur de métaux. Ce modèle permet ainsi l'obtention d'une plate-forme possédant une partie ciblant et une partie active sur deux différentes compositions du matériau préparé. Ces systèmes sont plus. Cette fonctionnalisation influence la complexation vis-à-vis des ions du Cu. La création de complexes entre la protéine et l'ion métallique est globalement plus ou moins importante avec P1 qu'avec le PC (Fig)

La présence d'acides carboxyliques dans la séquence P2 entraîne des répulsions de charges qui peuvent déformer le squelette peptidique et donc moins bien positionner les thiols pour la complexation. Cela peut expliquer une baisse de l'affinité pour les métaux d'10 et favoriser essentiellement la formation de complexe de type MS₂ pour tous les métaux d'10. Le cas de P1 est différent, il forme aussi bien des complexes 1:1 bicoordinés (pour Cu(I), Hg(II), Zn(II), Pb(II)) que des complexes de stœchiométrie 1:2 (pour Cd(II) et Pb(II)).

Malgré des constantes d'affinité plus faibles que celles observées avec le peptide PC, nous avons tout de même maintenu une sélectivité pour le cuivre(I) par rapport au zinc(II) de dix ordres de grandeur. L'affinité vis-à-vis du cuivre(I) est bonne si on la compare à celle du glutathion, compétiteur éventuel intracellulaire (complexant de cuivre dans les cellules). Ces cyclodécapeptides sont donc intéressants pour obtenir des complexants intracellulaires du Cu, et leur fonctionnalisation afin de pouvoir cibler **la protéine**.

Annexes

1-Solution mère de cuivre :

Nous avons préparé une solution mère de 1000 mg Cu²⁺ /l dans l'eau distillée en utilisant le sulfate de cuivre (CuSO₄ , 5H₂ O) de masse molaire 249,69 g/mole.

L'eau distillée que nous avons utilisée au cours de nos essais et pour la préparation des réactifs est caractérisée par un pH variant entre 5,5 et 6,8 et une conductivité comprise dans la gamme 3 et 5 µs/cm.

2- Courbe d'étalonnage

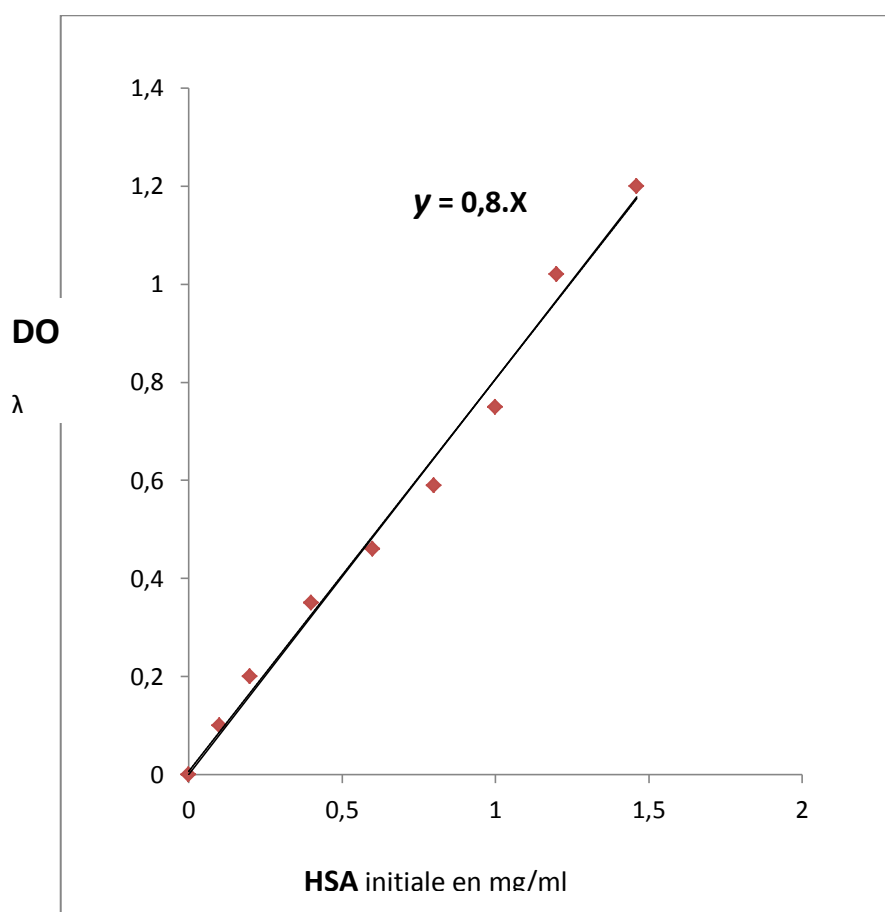


Figure II.9 : Courbe d'étalonnage permettant de déterminer la concentration de l'albumine en solution.

Références :

[1] : R.PERRIN ET J.P.SCHARFF chimie industrielle préface de P.FILLET 2^e tirage MASSON PARIS MILAN barcelone 1995.

[2] :stéphaneBACHA.François BUET et GISÈle VOLET CAPES DE Sciences physique. TOME2- chimie cours et exercices .3^eédition .

[4] :les polymère cours polymères PDF. Christinvautrin –UI-DUT orléans- S₄

[5]: W.H.Carothers , « », dans journal of American chemical Society, vol.51,1929,P.2548 [lien DOI]

[6]: Paul J.Flory ,”principles of polymer chemistry “, cornell university Press , 1953, P.39.ISBN 0801401348

[7]:SusanE.M.Selke , john D. Culter, Ruben J.Hernandez , “plastics packaging: properties , processing , applications , and regulation “, Hanser, 2004 , P.29. ISBN 1569903727.

[8]: Xavier DVAL, “ADSORPTION “, Encyclopaediauniversalis [en ligne] , consulté le 14 Juin 2022. URL : <https://www.universalis.fr/encyclopedie/adsorption>.

[9] : culture sciences. Chimie. ens.fr/ thematiques / chimie- physique / thermodynamique-chimie / l-adsorption- et-l-environnement.

[10] :Cosman NP, Roscoe SG: Electrochemical Quartz Crystal Nanobalance (EQCN) Studies of Protein Interfacial Behavior at Pt.Langmuir 2004, 20: 1711-1720.

[11]:Brosseau CL, Roscoe SG: Electrochemical Quartz Crystal Nanobalance and Chronocoulometry Studies of Phenylalanine Adsorption on Au.ElectrochimicaActa 2006, 51: 2145-2152.

[12]:C. Aharoni, M. Ungarish, Kinetics of activated chemisorption. Part 2. Theoretical models, J. Chem. Soc. Faraday Trans. 73 (1977) 456–464.

[13]:A. Gunay, E. Arslankaya, I. Tosun, Lead removal from aqueous solution by natural and pretreated clinoptilolite: adsorption equilibrium and kinetics, J.Hazard. Mater, 146 (2007) 362-371.

[14]:The Constitution And Fundamental Properties Of Solids And Liquids. Part I: Solids. Irving Langmuir, J. Am. Chem. Soc., 1916, 38 (11), pp 2221–2295.

[15]:Fukuzaki S, Urano H, Nagata K: Adsorption of Protein Onto Stainless-Steel Surfaces. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1995, 80: 6-11

- [16]:Gettens RTT, Bai ZJ, Gilbert JL: Quantification of the Kinetics and Thermodynamics of Protein Adsorption Using Atomic Force Microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2005, 72A: 246-257.
- [17]:Klinger A, Steinberg D, Kohavi D, Sela MN: Mechanism of Adsorption of Human Albumin to Titanium in Vitro. *Journal of Biomedical Materials Research* 1997, 36: 387-392
- [18]:Sakiyama T, Tanino K, Urakawa M, Imamura K, Takahashi T, Nagai T et al.: Adsorption Characteristics of Tryptic Fragments of Bovine Beta-Lactoglobulin on a Stainless Steel Surface. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 1999, 88: 536-541.
- [19]: Batch Sorption Experiments: Langmuir and Freundlich Isotherm Studies for the Adsorption of Textile Metal Ions onto Teff Straw (Eragrostis tef) Agricultural Waste; MuluBerhe Desta ; *Journal of Thermodynamics*, Volume 2013 (2013), p6 .
- [20]:M.I. Tempkin, V. Pyzhev, Kinetics of ammonia synthesis on promoted iron catalyst, *Acta Phys. Chim. USSR* 12 (1940), 327–356.
- [21]: Lee Rg, Kim, S. W., *J. Biomed. Mater., Res*, 8, 251 – 259, (1974).
- [22]:Boffa, G.A, Lucien, N.Y., Faure, A., Boffa, M.C, Jozefonvicz, J. Szubarga, A., Mandon P. Larrieu, M.J., *J. Biomed. Mater.Res.*, 11, 317-337, (1977).
- [23]: Brash, J.L, Uniyal, S, Samak, Q., *Trans. Amer. Soc, Artif, Int. Org.*, 20, 69-76, 1974
- [24]:Brash, J.L., Uniyal, S., *J. Polym. Sci., C*. 66, 377-389, (1979).
- [25]:D. C. Carter and J. X. Ho, "Structure of serum albumin". In *Advance in Protein chem.*, V. N. Schumaker, Ed. Academic Press, New York, Vol. 45, pp. 153-203, (1994).
- [26]: T. Peters, "Serum albumin". Jr. In *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 37, pp. 161-245, C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, and F. Richards, Ed. Academic Press, New York, (1985).
- [27]:S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda and K. Kobayashi, Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein engineering*, Vol. 12, pp. 439-446, (1999).
- [28]:Wolters FL, Russel MG, Stockbrugger RW. Systematic review: has disease outcome in Crohn's disease changed during the last four decades? *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 483-96.
- [29]: T. Peters, "Serum albumin". Jr. In *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 37, pp. 161-245, C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, and F. Richards, Ed. Academic Press, New York, (1985).
- [30]: J. R. Simard, P. A. Zunszain, J. A. Hamilton, and S. Curry, "Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis". Vol. 361, pp. 336-351, (2006).

[31]: Adsorption of human serum albumin on to synthesized dye-like polystyrene gel beads, N.,Belattar, T., Mekhalif, Materials Science and Engineering: C, Volume 24, Issue 4, 1 June 2004, Pages 507–511

[32]:Copper patterned polystyrene panels by reducing of surface bound Cu (II)-sulfonylhydrazide complex, NiyaziBicak, BunyaminKaragoz. Surface & Coatings Technology 202 (2008) 1581–1587

[33]:Adsorption of human serum albumin on to synthesized dye-like polystyrene gel beads, N.,Belattar, T., Mekhalif, Materials Science and Engineering: C, Volume 24, Issue 4, 1 June 2004, Pages 507–511

[34]:Linder,M.C. ; Hazegh-Azam, M. Copper Biochemistry ans Molecular Biology. Am. J. Cli. Nutr., 63 :797S–811S, 1996

[35]:Utschig,L.M. ; Wright,J.G ; ; Dieckmann,G. ; Pecoraro,V. ; O'Halloran,T.V. The 199Hg Chemical Shift as a Probe of Coordination Environments in Blue Copper Proteins. Inorg. Chem., 34 :2497–2498, 1995.

^"Site Web d'Albion Ferrochel" . Albion Laboratories, Inc . Récupéré le 12 juillet 2011 .

1. ^Ashmead HD (1993). *Les rôles des chélates d'acides aminés dans la nutrition animale* .Westwood: Noyes Publications.^[page nécessaire]
2. ^Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB (septembre 1999). "Chélates de gadolinium (III) comme agents de contraste d'IRM: structure, dynamique et applications". *Examens chimiques* .99 (9): 2293–352. doi : 10.1021 / cr980440x . PMID 11749483 .
3. ^Pan D, Schmieder AH, Wickline SA, Lanza GM (novembre 2011). "Agents de contraste IRM à base de manganèse: passé, présent et futur" .*Tétraèdre* .67 (44): 8431–8444. doi : 10.1016 / j.tet.2011.07.076 . PMC 3203535 . PMID 22043109 .
4. ^Vosjan MJ, Perk LR, Visser GW, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, van Dongen GA (avril 2010). "Conjugaison et radiomarquage d'anticorps monoclonaux avec du zirconium-89 pour l'imagerie TEP en utilisant le chelatebifonctionnel p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine". *Protocoles de la nature* .5 (4): 739–43. doi : 10.1038 / nprot.2010.13 . PMID 20360768 .