

Université Paris 12

Ecole doctorale : Sciences et Ingénierie : Matériaux, Modélisation,
Environnement

Thèse

Polymères réactifs à base d'isocyanates bloqués : développement de méthodologies de synthèse pour la bioconjugaison

Pour obtenir le grade de docteur
Spécialité : Chimie et Sciences des Matériaux

Par
Julien Barruet

Soutenue le 14 décembre 2007 devant la Commission d'examen

Jury

Rapporteur	V. HEROGUEZ-SABAUT	Directeur de Recherche CNRS-Pessac
Rapporteur	A. LASCHEWSKY	Professeur Universität Postdam, Allemagne
Présidente du jury	D. PAPY	Professeur Université Paris 12
Examineur	V. LANGLOIS	Professeur Université Paris 12
Examineur	L. BOUTEILLER	Directeur de Recherche CNRS-Paris
Examineur	D. GRANDE	Chargé de Recherche CNRS-Thiais
Directeur de thèse	J. PENELLE	Directeur de Recherche CNRS-Thiais

Laboratoire de recherche : Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est
Equipe Systèmes Polymères Complexes

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur émérite Philippe Guérin, le Docteur Jacques Penelle ainsi que le Professeur Catherine Amiel qui se sont succédés à la direction du laboratoire Systèmes Polymères Complexes de m'avoir accueilli.

Je remercie mon directeur de thèse, le Docteur Jacques Penelle. Je lui suis reconnaissant de m'avoir guidé tout au long de ce travail. Son suivi m'a permis d'acquérir une rigueur de travail. Les discussions scientifiques partagées m'ont permis également d'élargir mes connaissances scientifiques et professionnelles. Je lui dois d'avoir acquis une expérience satisfaisante pour poursuivre ma carrière scientifique.

Je suis reconnaissant au Directeur de recherche Valérie Héroguez-Sabaut et au Professeur André Laschewsky d'avoir accepté de juger ce travail ainsi qu'à Dulce Papy d'avoir présidé le jury. Par ailleurs, je remercie Valérie Langlois, Laurent Bouteiller et Daniel Grande d'avoir participé à ce jury.

Je suis reconnaissant envers Philippe Guérin, Daniel Grande, Valérie Langlois et Estelle Renard de m'avoir encadré pour préparer l'admission en thèse, aussi et surtout pour avoir su trouver les mots justes pour que je mène ce travail à son terme. Rétrospectivement, ils avaient raison, le jeu en valait la chandelle.

Je remercie l'Ingénieur d'Etudes Julien Babinot et l'étudiant de Master 1^{ère} année Romain Molle d'avoir travaillé sur l'un de mes projets. Leur aide et leur bonne humeur ont été très appréciables et j'espère que le travail proposé les a intéressé.

Je remercie le Chargé de Recherche Cédric Lorthioir pour son aide lors de l'analyse de mes échantillons en RMN à l'état solide. De même, je remercie l'Ingénieur d'Etudes Christine Gaillet pour les analyses de mes hydrogels en RMN en solution. Enfin, je remercie l'Assistante Ingénieur Audrey Valette pour les analyses MEB de mes microparticules.

Je remercie la Doctorante Domitille Pitard d'avoir trouvé le temps durant sa propre rédaction pour retraiter et lisser mes données.

Je remercie Christine Gaillet, Blandine Brissault et Florent Dalmas pour leur relecture et pour leur aide précieuse lors de la mise en forme de mon manuscrit.

Je tiens à remercier le professeur Christel Barbaud et les Maîtres de Conférences Eric Léonel et Erwan Le Gall pour m'avoir permis d'effectuer mon service de monitorat à l'IUT de Chimie de Vitry sur Seine dans d'excellentes dispositions. Leur disponibilité ainsi que leur confiance ont permis une intégration parfaite. Mon goût de l'enseignement s'en est trouvé renforcé en espérant que je puisse à nouveau enseigner dans les années à venir.

Je remercie Christine Gaillet et Claire Negrell-Guirao pour leur amitié profonde. Leur aide et leur soutien tout au long de mon séjour au laboratoire m'ont été d'un grand secours. A titre personnel je n'oublierais jamais les moments passés avec vous dans et en dehors du laboratoire. Faisons en sorte de les perpétuer.

Je n'oublie pas l'ensemble des membres du laboratoire qui ont tous apporté une pierre à mon travail. L'ambiance et les relations que j'ai pu entretenir avec vous m'ont permis de travailler dans un contexte de partage et d'échange.

Je tiens à remercier l'ensemble des doctorants : Domitille, Céline, Anne-Caroline, Dior, Géraldine, Carole, Farah, Gwenaëlle, Laurianne, Amani, Vincent, Xavier et Nicolas ainsi que les postdocs : Anne, Marina, Nathalie, Blazej et Firat pour leur bonne humeur à tous. Ce fut un réel plaisir de tous vous connaître et merci pour les conseils professionnels et personnels que vous m'avez apporté. Un remerciement tout particulier à Virginie avec qui j'ai partagé le DEA et la thèse. Tu es un peu la sœur que je n'ai pas, ton soutien, ta confiance, ton énergie m'ont permis d'aller au bout. Merci de m'avoir poussé quand il fallait, de m'avoir remonté le moral et d'avoir toujours cru en moi. Merci à Hadrien, ton mari, de comprendre et de partager notre amitié.

Enfin je remercie mes parents sans qui rien n'aurait été possibles. Vous m'avez toujours poussé. Vous avez su me donner les moyens d'y arriver. Vous avez su m'entourer et me soutenir pour me permettre de mener à bien ce projet qui me tenait tellement à cœur. C'est un peu votre victoire à vous aussi.

"Quel que soit le nombre des éléments on démontrera peut-être un jour qu'ils consistent dans des corpuscules insaisissables, mais de forme et de grandeur déterminés, et que c'est de l'arrangement et de la combinaison de ces corpuscules que résulte une multitude de composés complexes." *Robert Boyle (1627 – 1691)*

Sommaire

Sommaire	3
Listes des figures	8
Liste des schémas	10
Liste des tableaux	12
Liste des abréviations	13
Introduction générale	15
A. Partie Bibliographique	18
I. Les matériaux réactifs pour la bioconjugaison	19
1. Introduction	19
2. Réactions de modification de la lysine et de la fonction amine α -N terminale	22
3. Réactions de modification de la cystéine	24
4. Réactions de modification de la tyrosine	25
5. Réactions de modification de la glutamine	27
6. Conclusions	27
II. Les composés isocyanate bloqué	29
1. Introduction	29
2. Synthèse des isocyanates bloqués	30
3. Les divers agents de blocage et leurs réactivités	31
4. Détermination des températures de déblocage	35
5. Utilisation d'isocyanate bloqué pour le couplage de biomolécules	37
6. Synthèse de monomères pour l'obtention de polymères porteurs de fonctions isocyanate bloqué pendantes	38
7. Conclusions	41
B. Partie Résultats et discussion	48
I. Synthèse aisée d'un hydrogel porteur de fonctions isocyanate bloqué	49
1. Introduction	49
2. Formation de l'hydrogel	49
a. Synthèse du n-butylcarbamoyle sulfonate de potassium	50
b. Caractérisations spectroscopiques de l'hydrogel	51
3. Analyse mécanistique de la formation de l'hydrogel	54
4. Caractérisations physico-chimiques de l'hydrogel	57
5. Conclusions	58

II. Synthèse d'un monomère méthacrylate porteur d'une fonction isocyanate bloqué soluble dans l'eau	60
1. Introduction	60
2. Validation d'une protection à partir de HBSNa en utilisant un composé modèle carbamoylbenzènesulfonate	61
a. Synthèse et caractérisation du 4-(butylcarbamoyl)benzènesulfonate de sodium (BuPhSO ₃ ⁻)	61
b. Réactivité du composé modèle synthétisé	64
3. Protection de l'IEM par HBSNa	66
a. Synthèse et caractérisation du 4((méthacryloyloxy)éthyl)carbamoyl-benzènesulfonate de sodium (IEMPhSO ₃ ⁻)	66
b. Stabilité de l'IEMPhSO ₃ ⁻	70
c. Variation des conditions de synthèse de l'IEMPhSO ₃ ⁻	73
d. Utilisation d'un autre agent potentiel de blocage	75
III. Polymérisation de l'IEMPhSO ₃ ⁻ et réactivité du polymère formé vis-à-vis d'une amine aliphatique	78
1. Polymérisation de l'IEMPhSO ₃ ⁻	78
2. Réactivité du poly(IEMPhSO ₃ ⁻) vis-à-vis d'une amine	80
3. Conclusions	82
IV. Microsphères réactives à base de divinylbenzène et de co-monomères isocyanate bloqué	83
1. Introduction	83
2. Synthèses de monomères isocyanate bloqué	85
3. Synthèse des microsphères à base de divinylbenzène et de monomères isocyanate bloqué	87
4. Conclusions et perspectives	92
C. Partie Expérimentale	96
I. Techniques de caractérisations	97
1. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire en solution	97
2. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire à l'état solide	97
3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	98
4. Analyse thermogravimétrique	98
5. Détermination de point de fusion	98
6. Analyse élémentaire	98
7. Microscopie électronique à balayage	98
II. Réactifs	99
III. Synthèses	100
Conclusions générales	110

Listes des figures

Figure 1 : Spectre RMN ^{13}C du n-butylcarbamoylsulfonate de potassium dans D_2O .	51
Figure 2 : Spectre RMN ^{13}C quantitatif de l'hydrogel dans D_2O .	52
Figure 3 : Spectres IR-TF d'un échantillon sec d'hydrogel, du n-butylcarbamoylsulfonate de potassium et de l'IEM.	53
Figure 4 : Thermogramme d'un échantillon sec d'hydrogel.	57
Figure 5 : Evolution cinétique de la masse d'eau piégée dans l'hydrogel.	58
Figure 6 : Spectre RMN ^1H du 4-(butylcarbamoyl)benzènesulfonate	62
Figure 7 : Spectre RMN ^{13}C du 4-(butylcarbamoyl)benzènesulfonate	62
Figure 8 : Spectre IR-TF du 4-(butylcarbamoyl)benzènesulfonate de sodium (contaminé par une faible quantité de HBSNa).	63
Figure 9 : Spectre RMN ^1H de la 1-butyl-3-héxylurée dans CDCl_3 .	65
Figure 10 : Spectre RMN ^{13}C de la 1-butyl-3-héxylurée dans CDCl_3 .	65
Figure 11 : Spectre IR-TF de la 1-butyl-3-héxylurée.	66
Figure 12 : Spectre RMN ^1H du 4-((méthacryloyloxy)éthyl)carbamoylbenzènesulfonate de sodium dans D_2O .	67
Figure 13 : Spectre RMN ^{13}C du 4-((méthacryloyloxy)éthyl)carbamoylbenzènesulfonate de sodium dans D_2O .	68
Figure 14 : Spectre RMN ^{13}C DEPT 135 du 4-((méthacryloyloxy)éthyl)carbamoylbenzènesulfonate de sodium dans D_2O .	69
Figure 15 : Spectre IR-TF du 4-((méthacryloyloxy)éthyl)carbamoylbenzènesulfonate	70
Figure 16 : Superposition de spectres RMN ^1H d'un échantillon de l'IEMPhSO $_3^-$ dans la zone des aromatiques.	71
Figure 17 : Evolution cinétique de l'apparition de HBSNa provenant de l'instabilité de l'IEMPhSO $_3^-$ dans D_2O .	73
Figure 18 : Spectre RMN ^1H du 2-hydroxyéthanesulfonate de sodium dans D_2O .	76
Figure 19 : Spectre RMN ^1H du composé bisméthacrylate urée dans CDCl_3 .	77
Figure 20 : Spectre RMN ^{13}C du composé bisméthacrylate urée dans CDCl_3 .	78
Figure 21 Spectre RMN ^{13}C à l'état solide du poly(IEMPhSO $_3^-$).	79

Figure 22 : Spectre RMN ^{13}C à l'état solide du poly(IEMPhSO $_3^-$) après réaction avec la n-butylamine. _____	81
Figure 23 : Spectre RMN ^{13}C de l'IEMPh dans CDCl $_3$. _____	86
Figure 24 : Spectre RMN ^{13}C de l'IEMAcOx dans CDCl $_3$. _____	86
Figure 25 : Clichés MEB : (i) expérience 1 (DVB sans co-monomère), (ii) expérience 2 (DVB/IEMPh), et (iii) expérience 3 (DVB/IEMAcOx). _____	89
Figure 26 : Clichés MEB: (i) expérience 4 (DVB sans co-monomère), (ii) expérience 5 (DVB/IEMPh) et (iii) expérience 6 (DVB/IEMAcOx). _____	90
Figure 27 : Clichés MEB : (i) expérience 8 du (DVB/IEMPh) _____	91
Figure 28 : Superposition des spectres IR-TF des microsphères expériences 4-6, 8 et 9. ____	91

Liste des schémas

Schéma 1 : Méthodes pour la fonctionnalisation spécifique de protéine : _____	21
Schéma 2 : Méthodes utilisées pour la fonctionnalisation spécifique directe de protéine ____	23
Schéma 3 : Méthodes utilisées pour la fonctionnalisation spécifique directe de protéine ____	25
Schéma 4 : Méthodes utilisées pour la fonctionnalisation spécifique directe de protéine ____	26
Schéma 5 : Méthodes utilisées pour la fonctionnalisation spécifique directe de protéine ____	27
Schéma 6 : Protection de la fonction isocyanate par un agent de blocage B-H. _____	29
Schéma 7 : Décarboxylation des isocyanates dans l'eau. _____	32
Schéma 8 : Réactions de cycloaddition à partir d'isocyanate. _____	34
Schéma 9 : Mécanismes proposés pour la réaction d'un isocyanate bloqué avec un nucléophile : (i) élimination-addition et (ii) addition-élimination. _____	35
Schéma 10 : Description schématique d'une surface modifiée par les réactifs de Vigano. ____	37
Schéma 11 : Représentation de polyIEMB (i) et de poly(IEMB- <i>stat</i> -DMA) (ii). _____	38
Schéma 12 : Structure des monomères IEM et TMI. _____	39
Schéma 13 : Réticulation de polymères portant des fonctions _____	40
Schéma 14 : Synthèse d'un monomère maléimide porteur d'une _____	40
Schéma 15 : Modification de fonctions pendantes pour l'obtention de groupements fonctionnels isocyanate bloqué en présence d'alcool. _____	41
Schéma 16 : Structures possibles à partir de la réaction de l'IEM et _____	50
Schéma 17 : Synthèse du n-butylcarbamoylsulfonate de potassium. _____	51
Schéma 18 : Structure de l'hydrogel. _____	53
Schéma 19 : Mécanisme de formation d'hydrogel. _____	56
Schéma 20 : Protection du xylylène diisocyanate à l'aide de 4-hydroxybenzènesulfonate de sodium. _____	60
Schéma 21 : Synthèse du 4-(butylcarbamoyl)benzènesulfonate de sodium. _____	61
Schéma 22 : Réaction entre BuPhSO ₃ ⁻ et la n-hexylamine. _____	64
Schéma 23 : Synthèse du 4-((méthacryloyloxy)éthyl)carbamoylbenzènesulfonate _____	67

Schéma 24 : Mécanisme d'hydrolyse de l'IEMPhSO ₃ ⁻ dans l'eau. _____	72
Schéma 25 : Réaction entre l'IEM et HESNa. _____	76
Schéma 26 : Polymérisation radicalaire de l'IEMPhSO ₃ ⁻ dans l'eau. _____	79
Schéma 27 : Réaction du poly(IEMPhSO ₃ ⁻) avec la n-butylamine _____	80
Schéma 28 : Réactions de protection de l'IEM par le phénol (i) et l'acétone oxime (ii). ____	85
Schéma 29 : Synthèse de microsphères à base de DVB et d'IEM protégé _____	87

Liste des tableaux

Tableau 1 : Familles d'agent de blocage. _____	34
Tableau 2 : Formation de gel à partir d'IEM et de métabisulfite de potassium _____	54
Tableau 3 : Protection de l'IEM : influence du temps de réaction et du solvant _____	74
Tableau 4 : Protection de l'IEM avec HBSNa : influence du rapport stœchiométrique des réactifs _____	75
Tableau 5 : Synthèses de microsphères _____	88

Liste des abréviations

Réactifs et produits

bis(méthacryloyl)-urée : urée *N,N'*-[2-(2-méthyl-2-acide propenoïque)éthyle ester]

n-Bu-NH(C=O)-SO₃⁻ : n-butylcarbamoylsulfonate de potassium

BuPhSO₃⁻ : 4-(butylcarbamoyl)benzènesulfonate de sodium

DBTDL : dilaurate de dibutylétain

DMA : *N,N*-diméthyl acrylamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

DSS : 3-(triméthylsilyl)propan-1-sulfonate de sodium

DTT : dithiothérite

DVB: divinylbenzène

NHS : *N*-hydroxysuccinimide

HBSNa : 4-hydroxybenzènesulfonate de sodium

HEMA : méthacrylate de 2-hydroxyéthyle

HESNa : 2-hydroxyéthanesulfonate de sodium

IEM : méthacrylate de 2-isocyanatoéthyle

IEMAcOx : méthacrylate d'acétone, O-[(2-hydroxyéthyl)carbamoyl]oxime

IEMB : méthacrylate de 2-isocyanatoéthyle bloqué par la 2-butanone oxime

IEMPh : 2-(méthacryloyloxy)éthylcarbamate de phényle

IEMPhSO₃⁻ : 4-((méthacryloyloxy)éthyl)carbamoylbenzènesulfonate de sodium

IEMSO₃⁻ : méthacrylate de 2-isocyanatoéthyle bloqué par le bisulfite de potassium

MMA : méthacrylate de méthyle

Poly(IEMPhSO₃⁻) : poly(4-((méthacryloyloxy)éthyl)carbamoylbenzènesulfonate de sodium)

THF : tétrahydrofuranne

TMI : 3-(1-isocyanato-1-méthyléthyl) α-méthylstyrène

TMS : tétraméthylsilane

TPPTS : triphénylphosphine tris(sulfonate)

Acides aminés

Cys : cystéine

Lys : lysine

Tyr : tyrosine

Gln : glutamine

Techniques de caractérisations

AE : analyse élémentaire

DMA : analyse mécanique dynamique

ATG : analyse thermogravimétrique

DEPT : amélioration de la non distorsion par transfert de polarisation

DSC : calorimétrie différentielle à balayage

IR-TF : infrarouge à transformée de Fourier

MEB : microscopie électronique à balayage

RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$: résonance magnétique nucléaire du proton/ du carbone 13

Constantes

T_d : température de déblocage

Introduction générale

L'attachement covalent de macromolécules biologiques (protéines, acides nucléiques, saccharides...) trouve des applications dans divers domaines tels que les laboratoires sur puces, la chromatographie d'affinité, la synthèse sur support solide... Dans le cas des protéines, la présence sur les acides aminés de fonctionnalités suffisamment réactives en positions latérales (fonction amine de la lysine, fonction thiol de la cystéine, fonction phénol de la tyrosine...) permet d'envisager de les coupler sur des substrats solides ou à des macromolécules biologiques ou synthétiques ; ce procédé est généralement appelé bioconjugaison.

Les techniques communément utilisées en bioconjugaison font appel à des composés contenant des fonctions chimiques incompatibles avec les conditions de polymérisation radicalaire : acide carboxylique activé sous la forme d'halogénure d'acide par exemple, thiol, phénol ou encore aldéhyde. Ces fonctions sont en effet connues pour induire des réactions de transfert d'hydrogène ou d'halogène au cours de processus radicalaires.

L'objectif de ce travail est de déterminer si cette limite peut être contournée par le développement de fonctionnalités capables à la fois de réagir dans des conditions simples avec des molécules biologiques et de ne pas interférer lors de polymérisation radicalaire.

Les composés de type isocyanate "bloqué" répondent en théorie aux conditions de polymérisation par voie radicalaire et sont connus pour être réactifs vis-à-vis de bons nucléophiles comme les amines, même sous la forme bloquée.

La stratégie développée au cours de ce travail a consisté à mettre au point des méthodes de synthèses simples, rapides et efficaces pour l'obtention d'architectures polymères fonctionnalisées par un isocyanate bloqué. Nous nous sommes particulièrement intéressés à polymériser par voie radicalaire le méthacrylate de 2-isocyanatoéthyle (IEM), dérivé commercial, sous sa forme bloquée ou libre.

La première partie de ce manuscrit est une étude bibliographique en deux chapitres. Le premier s'attachera à présenter les techniques usuelles pour la bioconjugaison de protéines. Le second chapitre développera le concept d'isocyanate bloqué sous différents aspects tels que la détermination de la stabilité de ces composés, leur réactivité, les premiers travaux de bioconjugaison d'oligonucléotides...

La deuxième partie, décomposée en trois chapitres, s'intéressera à présenter les principaux résultats obtenus dans le développement de méthodes de synthèse de systèmes polymères fonctionnalisés par un isocyanate bloqué :

- Le premier chapitre décrira la synthèse d'un hydrogel fonctionnalisé (-NH-C(=O)-SO₃⁻) obtenu à partir de la mise en présence du métabisulfite de potassium et du méthacrylate de 2-isocyanatoéthyle. La caractérisation fine de l'objet sera présentée ainsi que ses propriétés de stockage sous voie sèche et de gonflement dans l'eau. Enfin un mécanisme de formation de ce gel sera proposé.

- Le deuxième chapitre montrera l'utilisation du 4-hydroxybenzènesulfonate de sodium comme agent de blocage alternatif aux bisulfites pour l'obtention d'isocyanates bloqués hydrosolubles, tout d'abord dans le cadre de la synthèse d'un composé modèle dont la réactivité vis-à-vis d'une amine sera prouvée puis dans le cas du méthacrylate de 2-isocyanatoéthyle. Le monomère protégé sera par la suite polymérisé par voie radicalaire dans l'eau. Enfin la réactivité du polyélectrolyte obtenu vis-à-vis d'une amine aliphatique sera démontrée.

- Le troisième chapitre s'attachera à présenter un système lipophile constitué de microsphères à base de divinylbenzène et méthacrylate de 2-isocyanatoéthyle bloqué par le phénol ou l'acétone oxime. Les caractéristiques des microparticules obtenues en fonction des conditions de synthèse seront présentées.

La dernière partie résumera les techniques de caractérisations utilisées ainsi que les protocoles de synthèse des produits obtenus et leurs caractérisations.

A. Partie Bibliographique

I. Les matériaux réactifs pour la bioconjugaison

1. Introduction

Depuis plusieurs décennies, énormément d'efforts ont été consacrés à l'étude et à la mise au point de systèmes (macro)moléculaires permettant d'associer certaines des propriétés caractéristiques de protéines et d'enzymes avec celles de molécules et macromolécules synthétiques. Ces systèmes "conjugués" sont obtenus par couplage covalent d'une biomacromolécule sur un substrat synthétique selon des techniques regroupées sous l'appellation générale de bioconjugaison. L'utilisation de substrats synthétiques n'est pas exclusive ; d'autres biomacromolécules ou des oligosaccharides peuvent également être utilisés dans le cadre de la bioconjugaison.

Le but final de ces études multidisciplinaires est notamment de tirer parti des propriétés de composés naturels pour créer de nouveaux biomatériaux à l'échelle nanométrique. Les hybrides protéine-polymère sont alors conçus de manière à dépasser certaines des limites intrinsèques des partenaires pris isolément et permettre la synergie de certaines des propriétés.

Cette voie de bioconjugaison a également été étudiée dans le domaine pharmaceutique où l'un des enjeux actuels est le perfectionnement de thérapies fondées sur des peptides ou protéines.¹⁻⁶ Les conjugués protéine-polymère sont des systèmes bien définis et diffèrent des autres adduits biologiques, d'une part par le rapport polymère-protéine prédéfini et d'autre part par la position du site de conjugaison qui est précisément connue. Ces systèmes permettent entre autre d'augmenter la stabilité thermique et/ou hydrolytique des biopolymères naturels utilisés ; ils permettent dans certains cas d'éviter une reconnaissance par le système immunitaire et une activation par celui-ci de mécanismes d'élimination potentiellement dangereux pour le patient. Enfin, des essais sont en cours visant à cibler de manière très précise l'organe, le tissu, le type cellulaire "malade", tout en préservant les zones ou entités biologiques non affectées par la maladie.

Le terme "polymère thérapeutique"⁷ a été adopté pour englober plusieurs familles toutes fondées sur l'utilisation de polymères hydrosolubles : les polymères comme principe actif⁸, les conjugués polymère-principe actif^{7,9}, les conjugués polymère-protéine^{10,11}, les micelles polymères sur lesquelles un médicament est lié de manière covalente¹² ainsi que les

polyplexes multi-composés ayant été développés en tant que vecteurs non viraux.¹³ La bioconjugaison est impliquée dans plusieurs de ces familles de principes actifs macromoléculaires.

Les bioconjugués sur substrats solides sont aussi très utilisés dans des applications diverses liées aux techniques de diagnostic médical. Ils permettent la reconnaissance moléculaire par association de macromolécules spécifiques (brins d'ADN, récepteurs) avec des cibles moléculaires dont la concentration inhabituelle ou la présence permettent l'établissement d'un diagnostic. On notera en particulier les tests immunologiques ainsi que les puces à ADN.

En outre, ces systèmes se sont avérés particulièrement intéressants dans plusieurs techniques commercialisées en biotechnologie :

- les laboratoires sur puces,
- certains éléments de construction en microfluidique,
- la synthèse sur support solide,
- l'augmentation de la stabilité thermique et/ou hydrolytique d'enzymes dans certains bio-procédés,
- la chromatographie d'affinité.

La recherche en chimie de bioconjugaison s'intéresse au développement de méthodes efficaces pour la modification et le couplage de protéines et d'autres molécules biologiques avec un degré élevé de spécificité *in vivo* et *in vitro*. Il n'existe pas de technique idéale, adaptée à tous les cas. Cependant des progrès significatifs ont été effectués dans le développement de techniques standards qui répondent dans un nombre important de cas aux critères rigoureux de la bioconjugaison.

Les protéines peuvent être modifiées chimiquement en utilisant une palette de méthodes. Celles-ci peuvent être divisées en trois catégories majeures¹⁴ (cf. Schéma 1) :

- les méthodes de fonctionnalisation spécifique directe,
- les méthodes de fonctionnalisation spécifique indirecte,
- les méthodes de fonctionnalisation spécifique via cofacteurs/ligands.

La différence entre fonctionnalisation spécifique directe et indirecte consiste, dans le cas indirect, à utiliser un espaceur bifonctionnel préalablement lié à la protéine pour créer un hybride réactif qui sera dans un second temps attaché au polymère. Dans le cas direct, le polymère est attaché directement à la protéine. Toutes les méthodes qui vont être décrites pour

la fonctionnalisation spécifique directe de protéines (cf. Schéma 1 (i)) peuvent également être utilisées lors de fonctionnalisations spécifiques indirectes de protéines (cf. Schéma 1 (ii)). Les fonctionnalisations via cofacteurs/ligands ne seront pas détaillées ici.

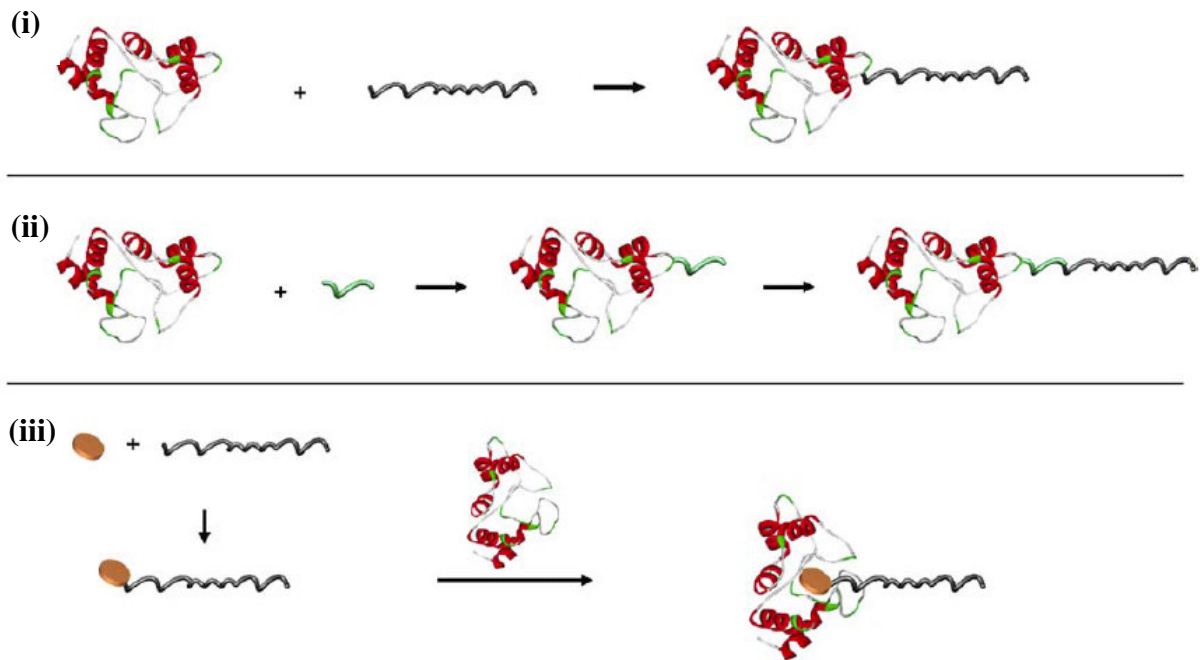


Schéma 1 : Méthodes pour la fonctionnalisation spécifique de protéine :

- (i) fonctionnalisation directe, (ii) fonctionnalisation indirecte et
(iii) fonctionnalisation via cofacteurs/ligands¹⁴.

Choisir la méthode appropriée pour fonctionnaliser une protéine n'est pas aisé. Les fonctionnalités des protéines les plus utilisées pour la modification chimique spécifique sont l'amine, disponible en position α -N terminale (α -N) du squelette, ainsi que les chaînes latérales d'acides aminés naturels tels que la cystéine (Cys, fonction thiol), la lysine (Lys, fonction amine), la tyrosine (Tyr, fonction phénol) et la glutamine (Gln, fonction amide). Les techniques directes pour l'introduction d'acides aminés non-naturels au sein de protéines utilisant des méthodes comme la synthèse de peptides non-ribosomal, ligature de protéines¹⁵ et les méthodes d'ingénierie tRNA^{15,16} ont légèrement élargi la gamme des fonctionnalités disponibles, bien que leurs utilisations soit actuellement relativement limitées.

Un autre point qui doit être pris en considération est la complémentarité des fonctions réactives de ces acides aminés naturels et non-naturels avec celles disponibles sur le polymère ou le bras espaceur. Généralement, c'est la disponibilité des fonctions ciblées sur la protéine qui détermine la voie à envisager. La cible doit notamment être raisonnablement exposée à la surface de la protéine. Dans le cas où plusieurs chaînes latérales d'acides aminés sont

exposées, il devient difficile de contrôler parfaitement la réaction de conjugaison, c'est-à-dire d'arriver à ce qu'une seule liaison entre la protéine et la cible soit créée. Finalement, la modification doit n'avoir qu'un infime - voire aucun - effet sur la conformation et la fonction de la protéine (par exemple activité catalytique et spécificité). Idéalement, une fonctionnalisation sélective nécessite d'avoir des informations détaillées sur la surface des protéines visées. En pratique, les informations sur la structure tridimensionnelle sont obtenues à l'aide de la diffraction des rayons X et/ou de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN). Dans un certain nombre de cas très limités, le séquençage des protéines peut fournir une information suffisante.

Dans les sections suivantes (paragraphe 2 à 5), quelques réactions classiques de chimie organique ciblant les fonctions amine, thiol, phénol et amide de ces acides aminés seront détaillées, en privilégiant dans la présentation les réactions les plus traditionnellement utilisées en bioconjugaison de protéines. Les techniques d'attachement de brin d'ADN ciblent toujours la fonction terminale du brin.¹⁷⁻¹⁹ Elles ne seront pas exposées en détail ici.

2. Réactions de modification de la lysine et de la fonction amine α -N terminale

La fonction ϵ -amine de la lysine et la fonction amine α -N terminale sont d'excellents nucléophiles. Ces fonctions peuvent réagir efficacement avec bon nombre de groupes fonctionnels électrophiles tels que les aldéhydes et les acides carboxyliques activés (cf. Schéma 2).

La réaction entre la lysine et/ou la fonction amine α -N terminale d'une part et les aldéhydes d'autre part conduit à la formation réversible dans l'eau d'une base de Schiff qui peut être réduite en présence de cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN) pour former un lien amine secondaire. Plusieurs méthodes sont disponibles afin d'activer les acides carboxyliques en vue de réagir avec la lysine ou une fonction amine α -N terminale ; l'activation à l'aide de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) est la méthode habituellement choisie.²⁰ Ces deux méthodes ont des avantages et des inconvénients : l'utilisation de polymère ou d'espaceur terminé par un acide carboxylique activé-NHS est simple et directe, cependant la sélectivité de la réaction est faible. Ce problème est d'autant plus important que beaucoup de protéines possèdent quelques lysines à leur surface en plus du groupement amine α -N terminal. La fonction ϵ -amine de la lysine et la fonction amine α -N terminale n'ont pas le

même pK_a (respectivement de l'ordre de 10,0 et 7,8),²¹ d'où une concentration différente d'amines libres (par rapport aux ammoniums $-NH_3^+$ non réactifs). Il en résulte également une différence de réactivité vis-à-vis d'acides carboxyliques activés, ce qui peut théoriquement être utilisé pour la fonctionnalisation sélective d'un groupement amine α -N terminal. En pratique, cela s'avère difficile.^{22,23}

Cette différence de réactivité/disponibilité est plus utile dans les réactions mettant en jeu des polymères fonctionnalisés par des aldéhydes (cf. Schéma 2) et un espaceur hétérofonctionnel vis-à-vis duquel seule la fonction amine α -N terminale réagira à $pH = 5$.^{20,21,24} Un autre avantage lié à cette méthode est le maintien de la charge totale de la protéine, alors que le recours aux acides carboxyliques activés (NHS) résulte en la perte d'une charge positive après formation de la nouvelle liaison amide.²⁰ Les principaux inconvénients de la méthode avec les aldéhydes sont d'une part la nécessité de passer par une procédure en deux étapes et d'autre part la complexité résultant de l'utilisation d'un aldéhyde, la synthèse de ce dérivé étant souvent plus compliquée. Récemment, une variation de cette méthode a été développée utilisant un catalyseur iridium pour effectuer la réduction *in situ* et le formate de sodium en tant que source d'hydrure.²⁵

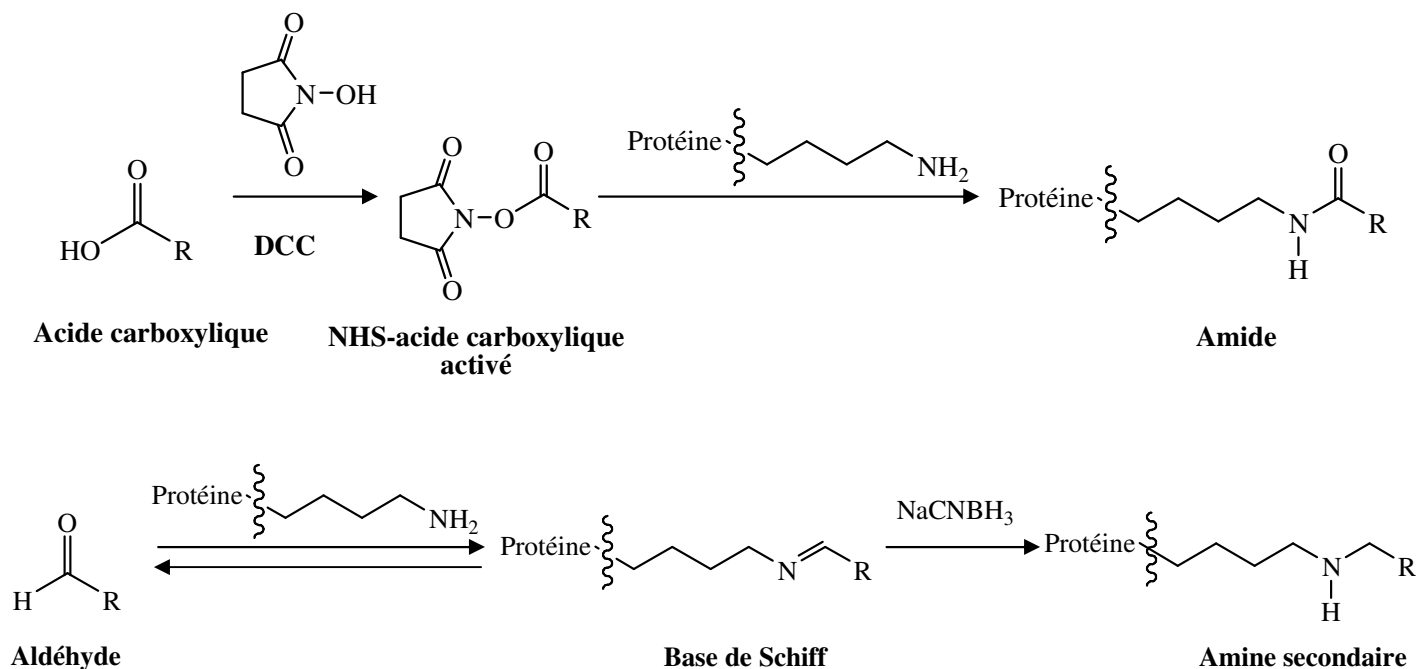


Schéma 2 : Méthodes utilisées pour la fonctionnalisation spécifique directe de protéine à partir de résidus lysines (Lys) et amine α -N terminale.

3. Réactions de modification de la cystéine

La fonction thiol des chaînons pendants de la cystéine possède une nucléophilie faible, mais peut être également utilisée dans des réactions de couplage redox. Cette réactivité a été intensément utilisée pour la modification spécifique de protéines. Sous des conditions appropriées, la cystéine peut être modifiée sélectivement, rapidement et de manière quantitative. Un autre avantage du ciblage de résidus cystéines est qu'il est rare que des protéines possèdent plus d'une cystéine accessible. La modification de cystéine est principalement divisée en deux types : l'alkylation et la formation de disulfure. Dans tous les cas, la charge globale de la protéine est maintenue ce qui est un avantage secondaire de l'utilisation de la cystéine.

L'alkylation de la cystéine peut être effectuée en utilisant aussi bien des composés α -halocarbonylé (généralement iodé) ou des composés maléimide (cf. Schéma 3). La déprotonation partielle de la fonction thiol, à pH basiques supérieurs à 9, permet la formation de thioéthers en utilisant des composés α -halocarbonylé. La cystéine peut également être modifiée à pH neutre (entre 6,8 et 7,0) en utilisant un composé fonctionnalisé maléimide en tant qu'accepteur dans le cadre d'une réaction d'addition de Michael.¹⁵ De ces deux méthodes, la dernière prévaut pour la modification de protéines avec des polymères²⁰ à cause de conditions plus douces, d'une meilleure spécificité (les deux méthodes peuvent entraîner des réactions parasites avec d'autres acides aminés ; cependant les maléimides ne réagiront avec les amines qu'à partir d'un pH supérieur à 8) et de la meilleure réactivité des maléimides. La cystéine étant plutôt hydrophobe et souvent partiellement ou complètement insérée dans la protéine, son accessibilité pose parfois problème.

La formation de pont disulfure (cf. Schéma 3), en particulier avec les polymères et les espaceurs bifonctionnels terminés par un groupe *o*-pyridyldisulfure, est la méthode la plus spécifique pour la fonctionnalisation de cystéines. C'est une réaction entièrement réversible en présence de réducteurs tels que le dithiotheritol (DTT), ce qui peut être un avantage ou un inconvénient en fonction de l'application visée. Le DTT peut également être utilisé afin de créer de nouveaux résidus thiols par clivage de ponts disulfures existants ; cependant, la structure et l'intégrité fonctionnelle des protéines peuvent être perturbées par ce type de traitement, étant donné le rôle important que jouent les ponts disulfures dans la structuration des protéines.^{26,27}

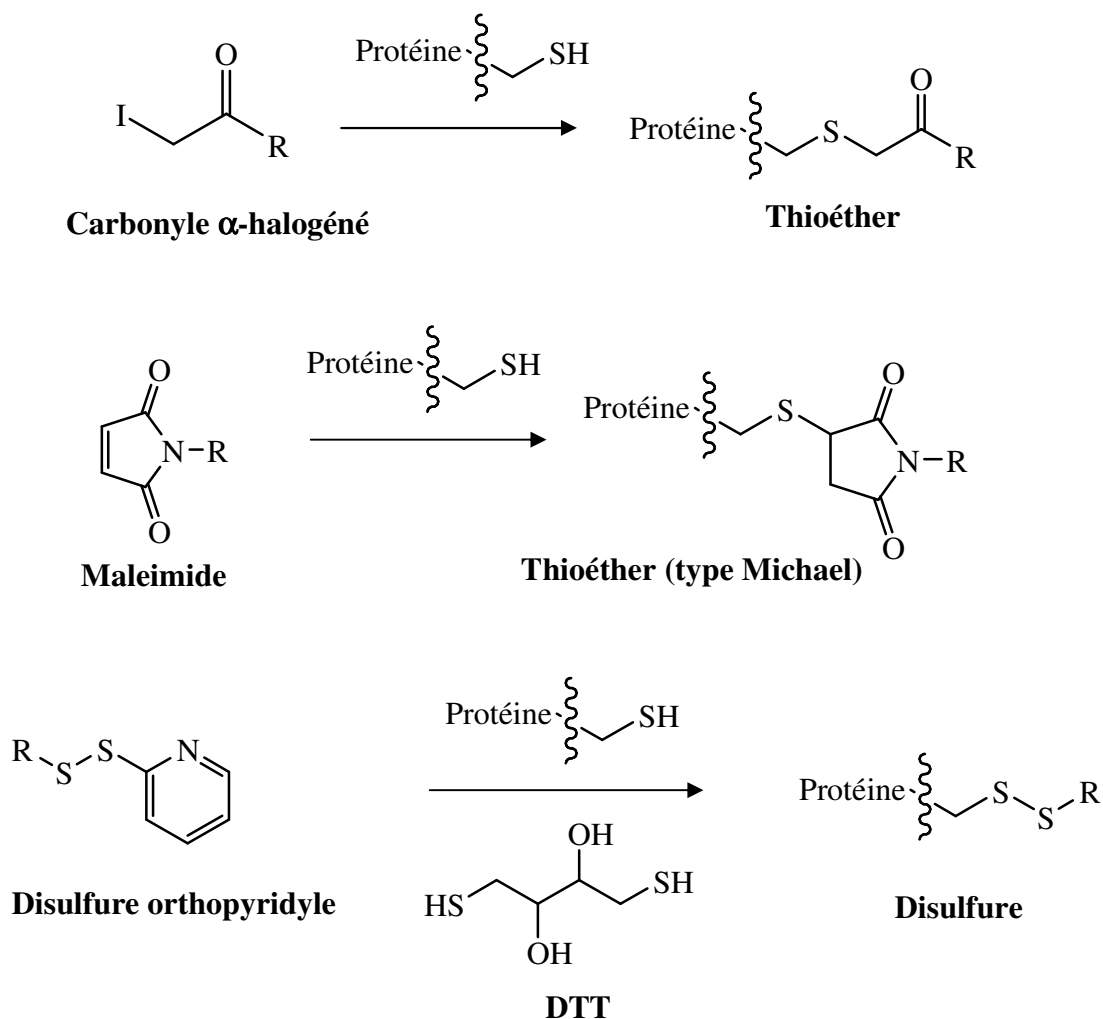


Schéma 3 : Méthodes utilisées pour la fonctionnalisation spécifique directe de protéine à partir de cystéines (Cys).

4. Réactions de modification de la tyrosine

Le troisième acide aminé le plus important pour la fonctionnalisation spécifique de protéines est la tyrosine. Le caractère nucléophile de la tyrosine peut être considérablement amélioré dans des conditions légèrement basiques ($\text{pH} > 8,5$) par déprotonation du groupement phénol pendant de la tyrosine et formation d'un phénolate plus nucléophile. La méthode la plus utilisée pour modifier la tyrosine est basée sur l'utilisation de sels de diazonium (cf. Schéma 4).²⁸ Un certain nombre de réactions d'alkylation et d'acylation peuvent également être effectuées (cf. Schéma 4). Cependant, des conditions drastiques doivent être utilisées afin d'éviter la modification de lysines et/ou de cystéines. Récemment, les travaux de Francis et coll. ont conduit à des avancées significatives dans ce domaine.²⁹⁻³¹ Cette équipe a développé

plusieurs méthodes très sélectives et douces pour la modification de la tyrosine. L'une d'entre elles implique la réaction entre trois composés : la tyrosine, un aldéhyde aliphatique et un dérivé de l'aniline (cf. Schéma 4).²⁹ Cette réaction s'effectue dans des conditions douces à pH quasi neutre (6,5), en présence de très larges excès d'aldéhyde et d'aniline (1000 équivalents). Par ailleurs, une méthode alternative ne requiert qu'un excès modéré (5 équivalents) des réactifs lorsqu'un catalyseur au palladium en présence de triphénylphosphine tris(sulfonate) (TPPTS) est utilisé, permettant ainsi de coupler une espèce π -allyle avec la tyrosine en conditions légèrement basiques (cf. Schéma 4).³¹

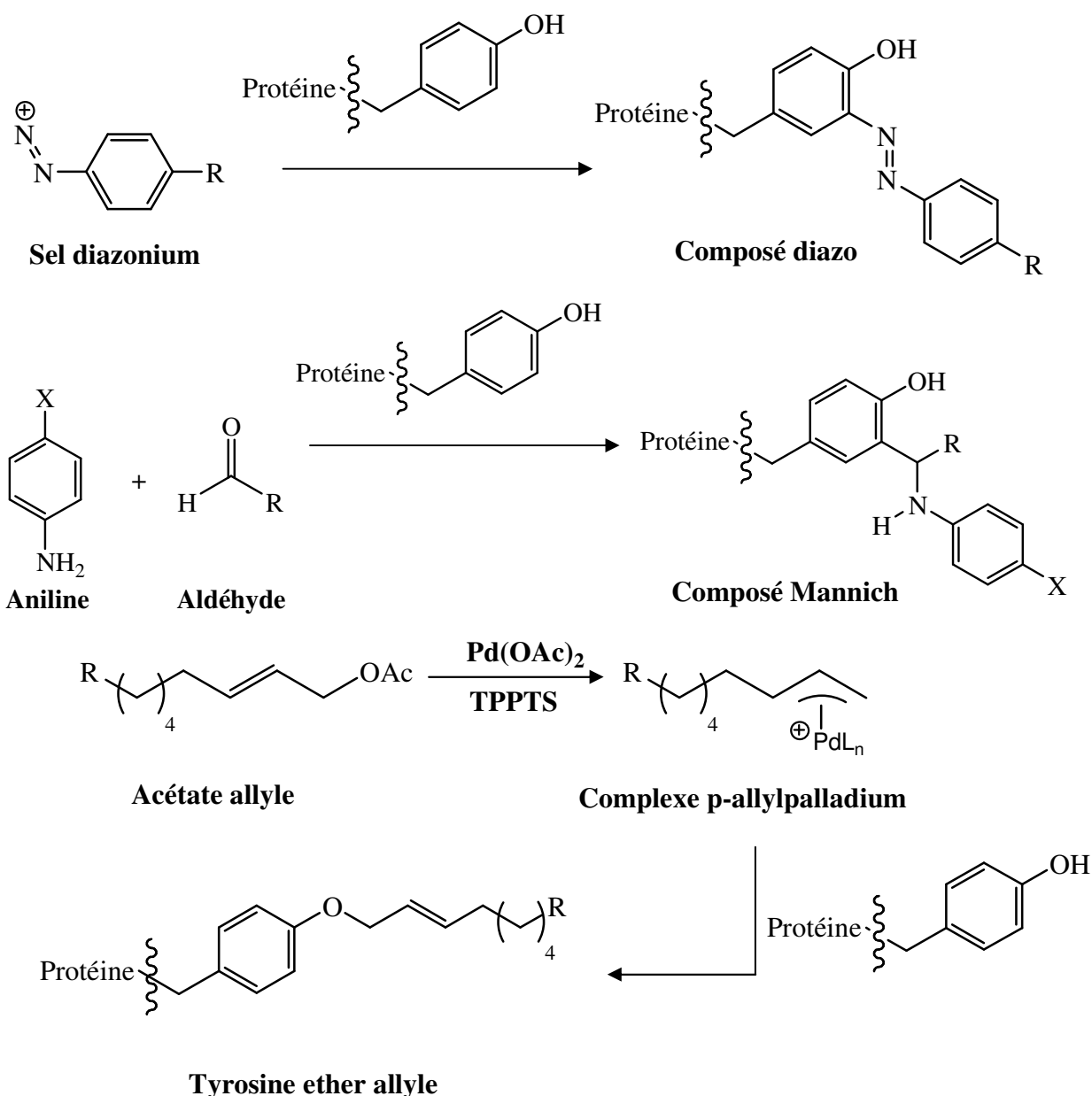


Schéma 4 : Méthodes utilisées pour la fonctionnalisation spécifique directe de protéine à partir de tyrosines (Tyr).

5. Réactions de modification de la glutamine

La glutamine est également une cible courante pour la modification sélective de protéines, via l'utilisation d'une enzyme transglutaminase (TGase) (cf. Schéma 5). Cette enzyme catalyse l'amidation entre la glutamine et différentes amines primaires, incluant les chaînons latéraux de la lysine.³² Les enzymes TGases sont extrêmement sélectives vis-à-vis de la lysine ciblée et ne vont catalyser que cette réaction si l'amine primaire est très accessible. Cette approche biosynthétique peut être utilisée pour introduire du poly(éthylène glycol) et d'autres cibles synthétiques, dès l'instant qu'elles possèdent une amine primaire aliphatique exposée comme la fonctionnalité aminobutyle.

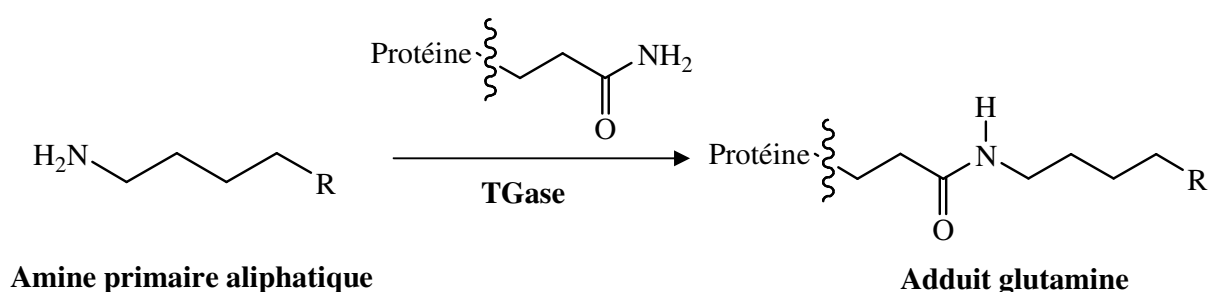


Schéma 5 : Méthodes utilisées pour la fonctionnalisation spécifique directe de protéine à partir de glutamines (Gln).

6. Conclusions

Les méthodes présentées dans ce résumé sont indéniablement très utilisées en bioconjugaison et font partie d'un arsenal d'outils standards. Un défaut de ces techniques, pour le polymériste, est que celles-ci font appel à des groupements fonctionnels connus pour induire des réactions parasites lors de polymérisations radicalaires. En effet, les fonctions telles que les acides carboxyliques activés (sous forme d'halogénures d'acide par exemple), les thiols, les amines, les phénols et les aldéhydes sont connues dans la littérature pour induire des réactions de transfert d'hydrogène ou d'halogène lors de processus radicalaires. La fonction maléimide est, quant à elle, un monomère vinylique copolymérisable par voie radicalaire qui peut agir comme agent de réticulation de part la présence de la liaison $\text{C}=\text{C}$. Il est donc difficile, voire impossible, de concevoir un monomère polymérisable par voie radicalaire qui contienne également une de ces fonctions.

Une solution à ce problème pourrait passer par l'utilisation de fonctions "nouvelles", réactives vis-à-vis des amines dans l'eau à température proche de l'ambiante, mais peu ou pas réactives en présence de radicaux. Une analyse de la littérature suggère que la fonctionnalité isocyanate bloqué pourrait répondre à ces deux conditions : compatibilité avec les polymérisations radicalaires et réactivité électrophile élevée même sous sa forme bloquée. La suite de cette étude bibliographique s'attachera à présenter le concept d'isocyanates bloqués, leur réactivité ainsi que les domaines actuels d'utilisation de ces fonctions réactives.

II. Les composés de type isocyanate bloqué

1. Introduction

Les composés isocyanate ($-N=C=O$) sont des fonctions électrophiles très réactives et relativement aisées à obtenir. Elles présentent donc un très grand intérêt industriel et constituent une ressource très utile dans divers domaines tels que les recouvrements, les adhésifs, les élastomères... La famille des isocyanates est en effet à la base de la production des polyuréthanes utilisés entre autres comme mousse isolante.

Certaines applications requièrent l'utilisation du réactif isocyanate dans des conditions qui ne sont pas entièrement contrôlées par le fabricant. Un exemple typique est l'utilisation d'isocyanates pour améliorer l'isolation thermique en fabriquant *in situ* une mousse polyuréthane. Dans certains cas, la très grande réactivité de la fonction isocyanate doit donc être diminuée pour permettre un stockage efficace. Pour moduler cette réactivité, les isocyanates peuvent être "bloqués" par addition d'un composé possédant un hydrogène labile, appelé agent de blocage et généralement noté B-H. Cette réaction de blocage mène à la

formation de composés dits "isocyanate bloqué" ou "isocyanate protégé" qui sont notés R-NH-C(=O)-B. Le Schéma 6 illustre la réaction générale. Pour être utile, cette addition doit être réversible thermiquement et est donc caractérisée par une zone de température de déblocage notée T_d . Celle-ci est caractéristique de la nature de l'agent de blocage.

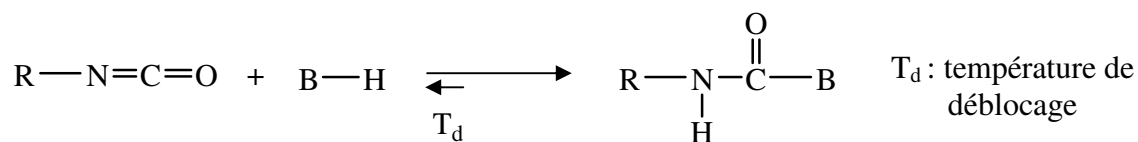


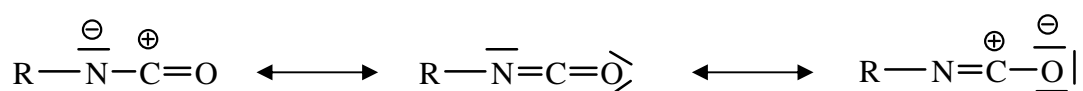
Schéma 6 : Protection de la fonction isocyanate par un agent de blocage B-H.

La fonction isocyanate ainsi stabilisée conserve une certaine réactivité même sous sa forme bloquée. Un composé isocyanate bloqué R-NH-C(=O)-B, en présence d'un meilleur nucléophile Nu-H que l'agent de blocage B-H et sous certaines conditions de température, conduit à la formation d'un nouveau dérivé carbonyle R-NH-C(=O)-Nu et à la régénération de B-H. Deux mécanismes qui seront exposés plus en détail au paragraphe 3 de ce chapitre sont possibles pour cette réaction : addition-élimination ou élimination-addition.

Généralement, les isocyanates sont protégés pour être utilisés par la suite avec des amines qui sont de très bons nucléophiles. La chimie des isocyanates bloqués et les applications sont largement couvertes dans la littérature et ont fait l'objet de revues.^{33,34}

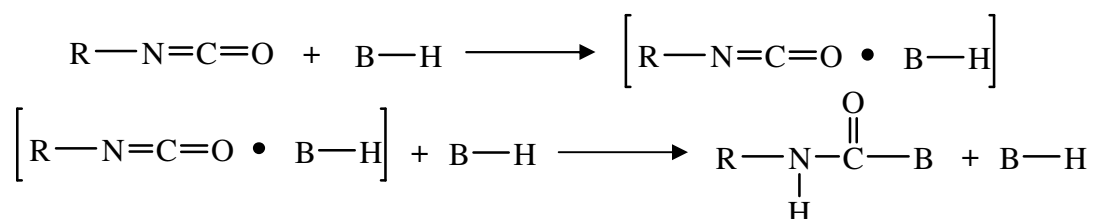
2. Synthèse des isocyanates bloqués

Les isocyanates bloqués sont toujours obtenus par addition de l'agent de blocage B-H sur un isocyanate R-N=C=O. La réactivité des isocyanates est déterminée par la structure de l'isocyanate et la distribution de la densité électronique sur le groupe azométhine. Le groupe -N=C=O possède une structure linéaire, l'angle défini par les liens R-N et N-C variant avec la nature du groupement R.³⁵ La structure du groupe isocyanate peut être écrite selon les formes limites de résonance suivantes :



La nature du groupement R joue donc un rôle important sur la réactivité de l'isocyanate. Ainsi les isocyanates bloqués aliphatiques sont plus stables que leurs homologues aromatiques ; d'autre part la réactivité sera d'autant plus faible que le groupement R est encombrant.³⁶

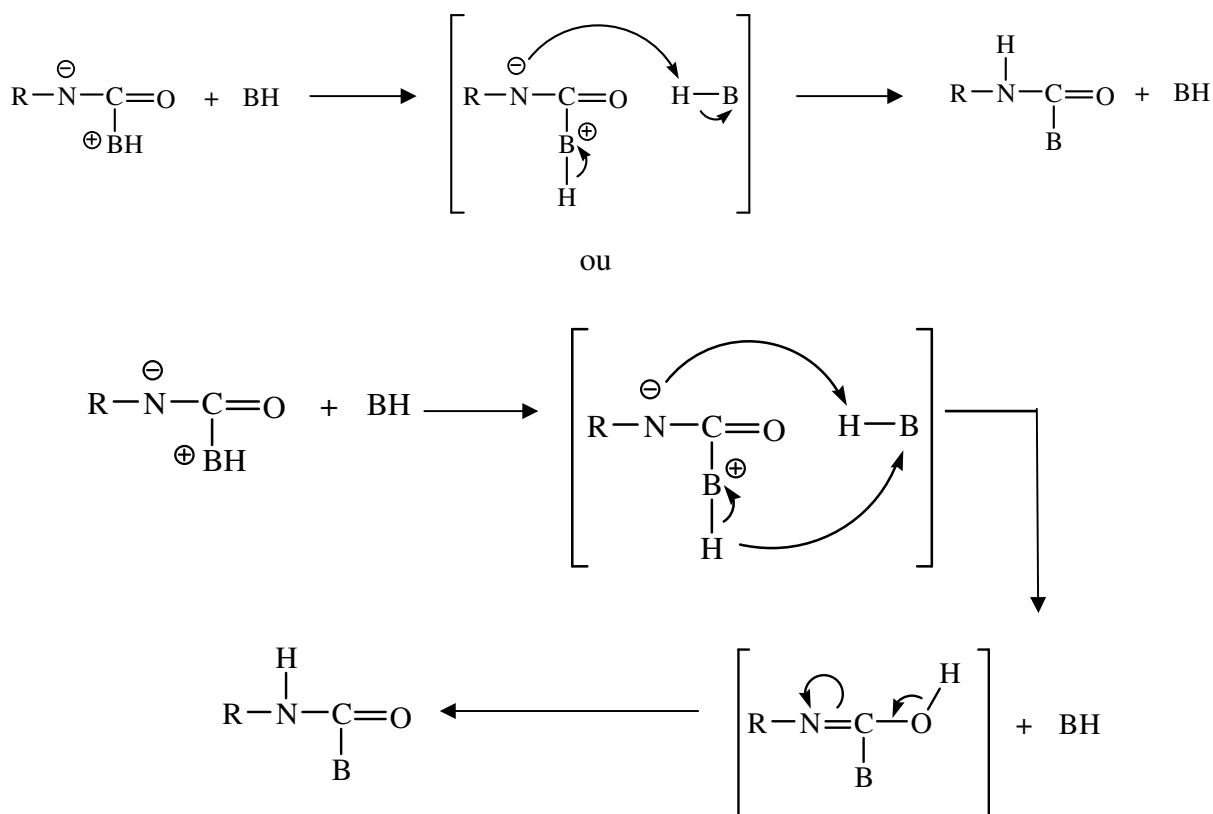
La réaction d'addition d'un composé à hydrogène labile sur un isocyanate, en absence de catalyseur, peut, selon la littérature,³³ être décrite par les équations suivantes :



où l'espèce R-N=C=O•B-H représente un complexe intermédiaire.

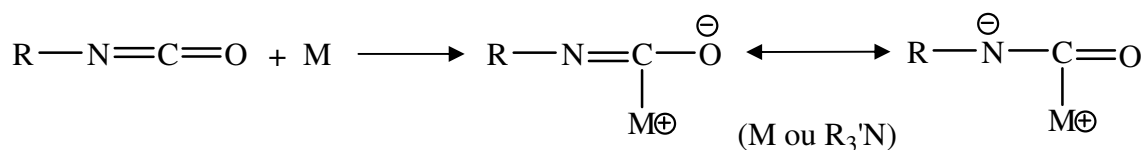
La réaction globale est d'ordre 1 par rapport au composé isocyanate et d'ordre 2 par rapport au composé B-H. En effet, au cours de la deuxième étape, une autre molécule de B-H vient attaquer l'atome d'oxygène (ou celui d'azote) :

- 1^{ère} étape : formation du complexe R-N=C=O•B-H et addition sur la liaison C=N
- 2^{ème} étape : transfert intramoléculaire de H⁺ catalysé par B-H (en 1 ou 2 sous étapes représentées ci-dessous)



Des bases plus fortes que B-H peuvent être utilisées comme catalyseur, la base accélérant la seconde étape de la réaction (réarrangement intramoléculaire). Les alcools réagissent avec les isocyanates même en absence de catalyseur basique, le rôle de base étant joué par l'alcool lui-même.³⁷

En présence de certains catalyseurs nucléophiles, le mécanisme implique une attaque du catalyseur avec la fonction isocyanate pour former une espèce intermédiaire :



3. Les divers agents de blocage et leurs réactivités

La littérature des isocyanates bloqués recense diverses familles d'agent de blocage. Le Tableau 1 présente une liste non exhaustive de familles d'agent de blocage, ainsi que les températures de déblocage associées à ces composés.

L'utilisation d'alcools comme agents de blocage peut paraître paradoxale, l'adduit formé, un uréthane, étant généralement très stable thermiquement. La protection de la fonction isocyanate n'est donc envisageable qu'en ayant recours au phénol, à ses dérivés ou à

des alcools substitués par des groupements électrocapteurs qui affaiblissent la stabilité de l'uréthane formé et facilitent la réaction en retour (déblocage).

Les oximes et les lactames sont souvent utilisés comme agents de blocage car leurs températures de déblocage sont relativement faibles. Les composés β -dicarboxylé, les triazoles et les imidazoles ont été également proposés, mais ne font l'objet que de peu d'études et d'applications.

Les bisulfites présentent quant à eux un intérêt particulier, surtout dans le cadre des objectifs de cette thèse, dans la mesure où leur utilisation constitue quasiment la seule technique permettant d'obtenir des composés isocyanate bloqué hydrosolubles.³⁸⁻⁴³ L'utilisation de bisulfite nécessite d'effectuer la réaction de blocage en phase aqueuse, ce qui, *a priori*, n'est pas trop souhaitable étant donné l'hydrolyse-décarboxylation rapide des isocyanates dans l'eau (cf. Schéma 7). Le bisulfite, généré *in situ* à partir de métabisulfite, est cependant meilleur nucléophile que l'eau et s'additionne rapidement sur l'isocyanate, ce qui permet d'obtenir de très bons rendements. Les isocyanates protégés de cette manière ont montré une excellente réactivité à température ambiante dans l'eau avec des amines.

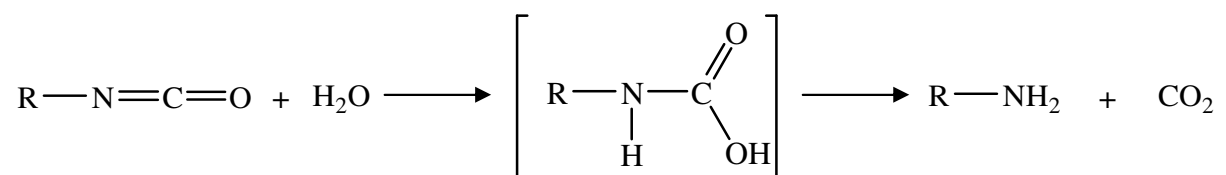
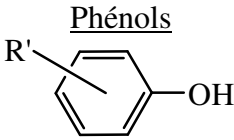
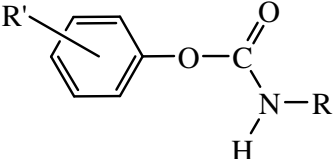
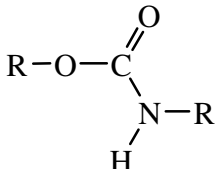
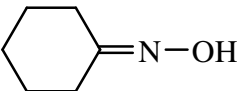
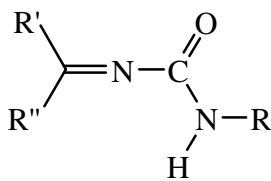
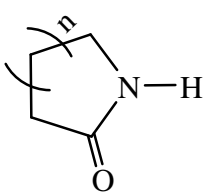
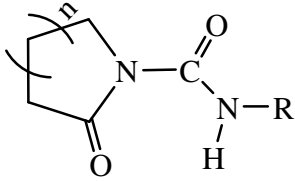
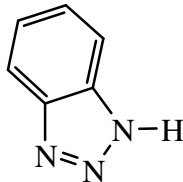
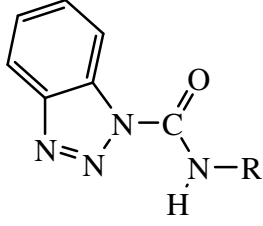
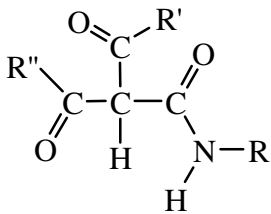
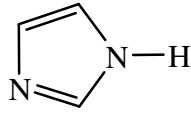
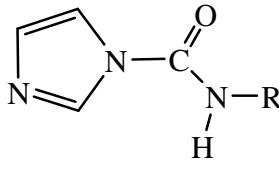


Schéma 7 : Décarboxylation des isocyanates dans l'eau.

Les amines, quant à elles, sont de très bons nucléophiles réagissant aisément avec les isocyanates, mais ne sont pas utilisables pour protéger un isocyanate, la très grande stabilité thermique des urées formées empêchant toute réaction de substitution ultérieure.

Familles d'agent de blocage	Isocyanate bloqué formé	T _d (°C)	Références
<u>Phénols</u>  R' = H, CH ₃ O, Cl, CH ₃ , NO ₂ ...		180	33,34,36,44-49
<u>Alcools</u> CCl ₃ -CH ₂ -OH, (CF ₃) ₂ -CH-OH, t-BuOH		180	33,34,36,49,50
<u>Oximes</u> (C ₆ H ₅) ₂ C=N-OH, C ₂ H ₅ -C(CH ₃)=N-OH, (CH ₃) ₂ C=N-OH, 		130	33,34,44,51-53
<u>Lactames</u> 		150	33,34,44,53-56
<u>Triazoles</u> 		180	55,56
<u>Composés β-dicarboxylé</u> CH ₂ (COOEt) ₂ , CH ₂ (COOEt)COOCH ₃ , CH ₂ (COOEt)C(=O)CH ₃		130	33,34,44
<u>Imidazoles</u> 		160	57

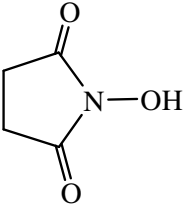
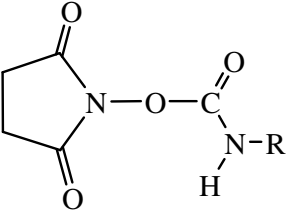
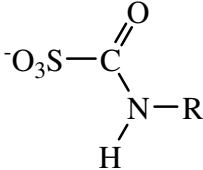
<p><u>Hydrosuccinimide</u></p> 		-	33,34
<p><u>Bisulfites</u></p> <p>HSO_3^-</p>		-	38,39,58

Tableau 1 : Familles d'agent de blocage.

Dans un certain nombre de cas, des réactions d'auto-cycloaddition peuvent également être utilisées pour la protection d'isocyanates. Les doubles liaisons C=O et C=N des isocyanates donnent lieu à des réactions de cycloaddition polaire avec des composés du type A=B, mais en général seuls les produits impliquant la double liaison C=N sont isolés. Les principales réactions de cycloaddition sont représentées au Schéma 8. Par cycloaddition [2+2], les isocyanates aromatiques peuvent réagir entre eux pour former des dimères appelés urétidione. Cette réaction est fortement accélérée à l'aide de catalyseurs de type trialkylphosphine, plus faiblement par la pyridine et la N,N,N',N'-tétraméthyl-N''-phénylguanidine.⁵⁹ Le diisocyanato-4,4'-diphénylméthane⁵⁹ et le diisocyanato-2,4-toluène dimérisent lentement à température ambiante même en absence de catalyseur. Les isocyanates aromatiques aussi bien qu'aliphatiques forment des trimères isocyanurates. La réaction de trimérisation est catalysée en particulier par les trialkylphosphines (tributylphosphine, triéthylphosphine...^{60,61}).

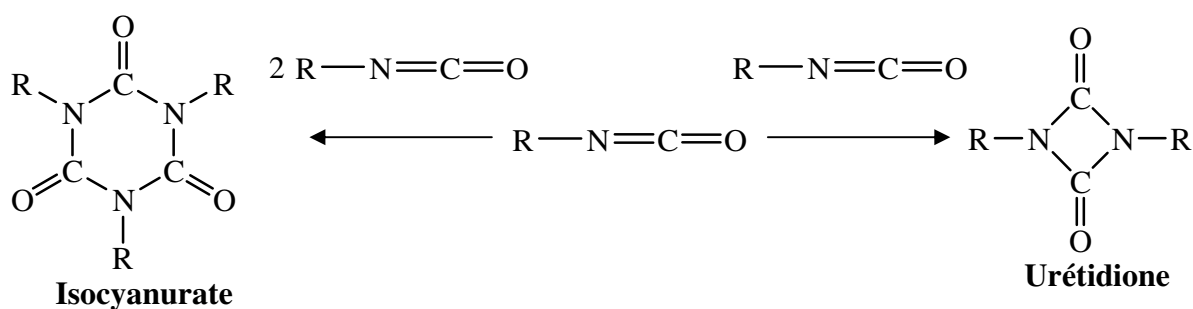


Schéma 8 : Réactions de cycloaddition à partir d'isocyanate.

Il existe deux mécanismes réactionnels par lesquels un isocyanate bloqué peut réagir avec un nucléophile (Nu-H). Dans un mécanisme d'élimination-addition (cf. Schéma 9 (i)), l'isocyanate bloqué se décompose pour régénérer l'isocyanate de départ et l'agent de blocage (B-H). Dans une seconde étape, l'isocyanate réagit avec le nucléophile pour former le produit final. Dans un mécanisme d'addition-élimination (cf. Schéma 9 (ii))⁶², le nucléophile réagit directement avec l'isocyanate bloqué pour former un intermédiaire tétraédrique qui élimine ensuite l'agent de blocage.

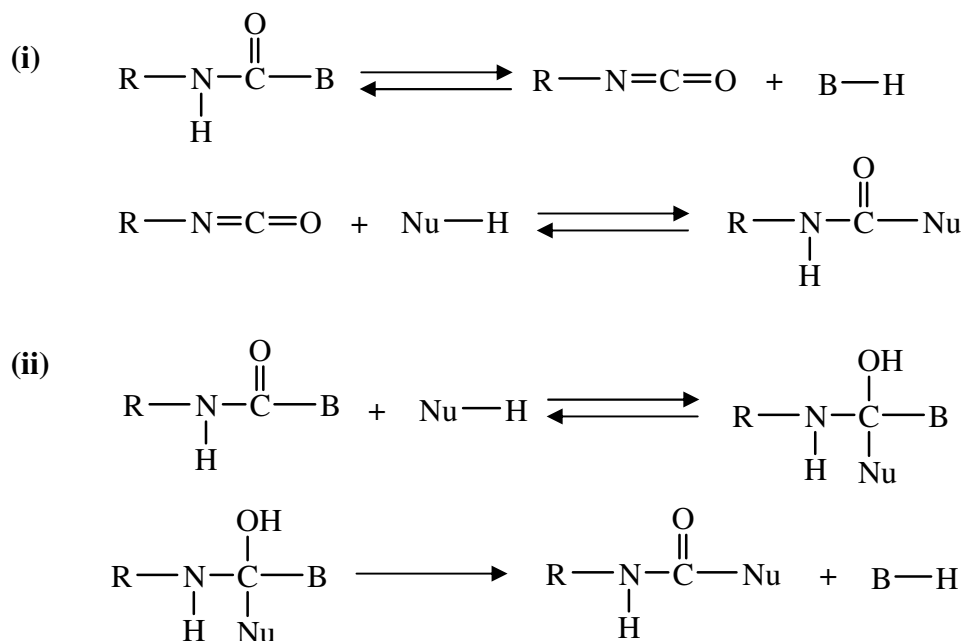


Schéma 9 : Mécanismes proposés pour la réaction d'un isocyanate bloqué avec un nucléophile : (i) élimination-addition et (ii) addition-élimination.

4. Détermination des températures de déblocage

Une des caractéristiques essentielles des isocyanates bloqués est leur température de déblocage, mais la définition de cette propriété garde un caractère relativement arbitraire dans la mesure où il s'agit d'une gamme de températures plutôt que d'une transition brutale. Les températures de déblocage rapportées dans la littérature, y compris pour un même échantillon, dépendent donc de divers facteurs comme la méthode d'analyse, le gradient de température...

De nombreuses techniques ont été utilisées afin de déterminer la température de déblocage :

- La méthode la plus commune consiste à suivre l'évolution de propriétés physiques en fonction de la température. Par exemple, la température à partir de laquelle, en gradient de température, le système réticule en présence d'un agent de réticulation.⁶³ Le démarrage de la réticulation est généralement déterminé à l'aide d'un viscosimètre (plat ou conique).⁶⁴

- Les spectres infrarouges des isocyanates présentent une bande caractéristique intense d'absorption vers $2\ 250\ \text{cm}^{-1}$; des températures de déblocage ont donc été déterminées en établissant la température à partir de laquelle l'absorption est détectée lorsqu'un échantillon est chauffé.⁶⁵ Les résultats dépendent de la vitesse de chauffe : une vitesse importante donne une température de déblocage plus élevée. L'utilisation de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) combinée avec l'analyse mécanique dynamique (AMD) est particulièrement efficace en permettant l'observation individuelle des réactions de déblocage et de réticulation durant le processus de traitement.⁶⁶ La spectroscopie IR-TF a également été utilisée pour déterminer l'évolution de la composition et la vitesse des dégagements gazeux durant le traitement ; les données propres à l'évolution de l'agent de blocage peuvent être utilisées pour déterminer des constantes cinétiques.⁶⁷

- L'analyse thermogravimétrique (ATG) a été utilisée pour déterminer les paramètres cinétiques de réaction de déblocage.⁶⁸ La réaction est suivie en observant la perte de masse correspondant à la vaporisation de l'agent de blocage régénéré.

- Le flux thermique associé au déblocage (réaction endothermique) tel que mesuré par calorimétrie différentielle à balayage (differential scanning calorimetry DSC) a également été utilisé pour étudier les cinétiques de réactions de déblocage.⁵³

- Enfin, les espèces chimiques (réactifs et produits) peuvent être observées directement en utilisant la spectroscopie RMN du carbone 13 (^{13}C) à l'état solide. Par exemple, l'apparition de signaux pour les carbones de l'agent de blocage a été utilisée comme critère cinétique.⁶⁹ Les constantes de vitesse de réaction de déblocage peuvent être déterminées en suivant la vitesse de réaction avec des amines.⁷⁰ Des températures de déblocage ont également été déterminées à partir d'isocyanates bloqués chauffés en présence de tamis moléculaire saturés en eau. La température la plus basse à partir de laquelle du dioxyde de carbone est détecté est rapportée comme température de déblocage.⁷¹

5. Utilisation d'isocyanate bloqué pour le couplage de biomolécules

Les isocyanates bloqués sont très utilisés dans l'industrie. Les applications traditionnelles sont le papier, le textile, l'isolation, les adhésifs...³⁴ Par contre, leur utilisation en bioconjugaison, via le couplage amine-isocyanate, n'a jusqu'à présent pas fait l'objet de beaucoup d'études.

Très récemment, Vigano⁷² a démontré la réactivité de surfaces modifiées par l'isocyanate de 3-(triméthoxysilyl)propyle protégé à l'aide de 2-butanone oxime ou de métabisulfite de sodium (cf. Schéma 10) vis-à-vis d'un oligonucléotide synthétique (23-mère) modifié sur la position 5'-amine. Une lame de verre, préalablement décapée, est recouverte par un isocyanate protégé qui réagit en surface par silanisation ; elle est ensuite plongée dans une solution aqueuse contenant l'oligonucléotide. Après hybridation avec un oligonucléotide complémentaire fluorescent, des clichés de fluorescence montrent l'attachement de l'oligonucléotide à la surface. La comparaison de ces deux agents de blocage montre une fluorescence plus importante dans le cas de l'oxime ; cependant, les conditions opératoires diffèrent légèrement entre ces deux essais puisque la surface recouverte avec l'isocyanate bloqué par l'oxime est traitée à 180°C sous vide pour débloquer les fonctions isocyanates avant d'être mis au contact de la solution d'oligonucléotides. Il est donc délicat d'attribuer la différence d'efficacité à une réactivité plus grande de l'isocyanate bloqué par l'oxime par rapport à l'isocyanate bloqué par le bisulfite.

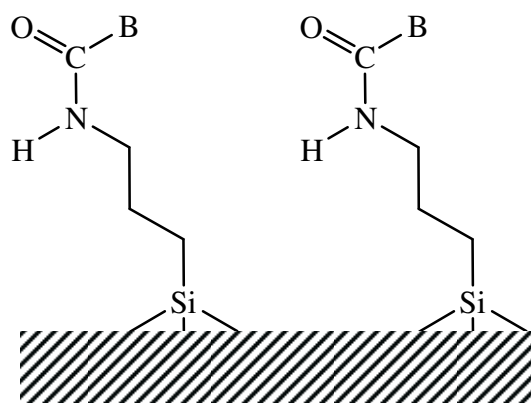


Schéma 10 : Description schématique d'une surface modifiée par les réactifs de Vigano.

A la suite de ces résultats, la même équipe s'est intéressée à l'homopolymère du méthacrylate de 2-isocyanatoéthyle bloqué par la 2-butanone oxime (IEMB) ainsi qu'au copolymère statistique de ce monomère et du *N,N*-diméthyl acrylamide (DMA) (cf. Schéma 11).⁷³ Après fixation sur lame de verre et mise en présence de l'oligonucléotide, les clichés de fluorescence ont montré des résultats sans différence significative entre l'homopolymère et un copolymère 50-50. En comparant ces résultats avec ceux provenant de l'isocyanate de silyle, il s'avère que l'utilisation de polymère est plus intéressante. Les auteurs attribuent cet effet à une meilleure accessibilité des sites fonctionnels dans le cas des polymères.

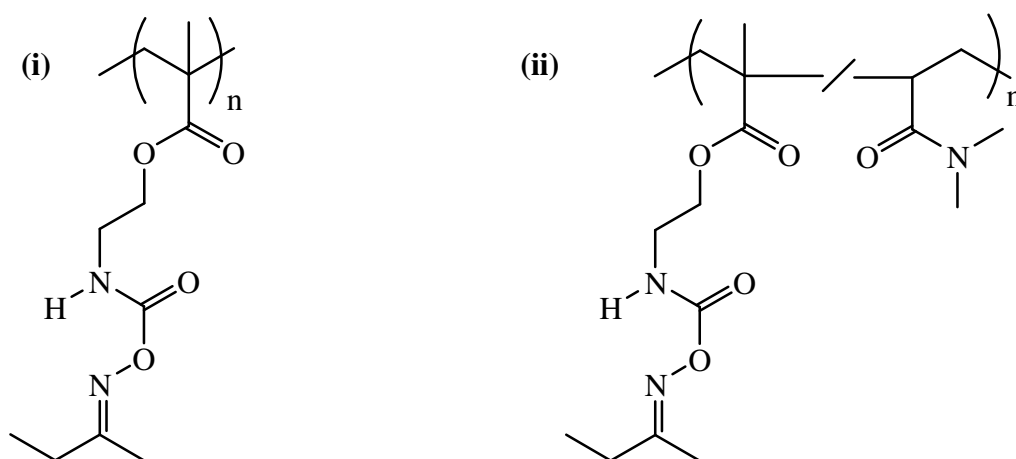


Schéma 11 : Représentation de polyIEMB (i) et de poly(IEMB-*stat*-DMA) (ii).

6. Synthèse de monomères pour l'obtention de polymères porteurs de fonctions isocyanate bloqué pendantes

Comme mentionné dans la section précédente, des monomères vinyliques porteurs de fonctions isocyanate sont disponibles commercialement. La plupart des monomères vinyliques porteurs de fonctions isocyanate bloqué sont issus de la protection, à l'aide de différents types d'agent de blocage, de deux de ces monomères commerciaux : le méthacrylate de 2-isocyanatoéthyle et le 3-(1-isocyanato-1-méthyléthyl) α -méthylstyrène (TMI) (cf. Schéma 12).

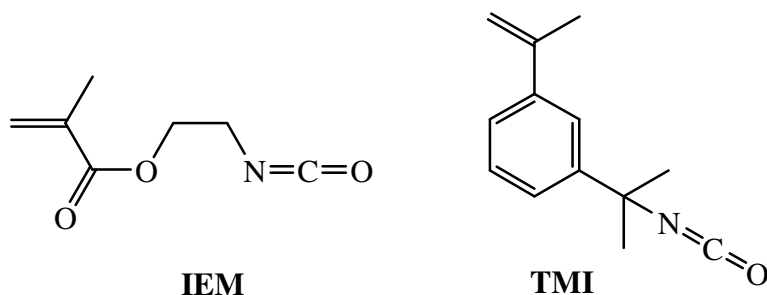


Schéma 12 : Structure des monomères IEM et TMI.

La variété des monomères tient à la large disponibilité de molécules utilisables en tant qu'agent de blocage. La plupart de ceux-ci sont lipophiles. L'obtention de monomères solubles dans l'eau est assez rare et fait appel à l'utilisation de bisulfite comme agent de blocage, formant des monomères chargés négativement et hydrosolubles. Zheng et Bennett⁵⁸ suggèrent cette stratégie pour la synthèse d'un monomère hydrosoluble à partir de l'IEM. McLauchlin⁷⁴ utilise cette même stratégie dans le cas du TMI.

De manière générale, la littérature décrivant la protection de ces monomères est plus étoffée dans le cas de l'IEM. Deux groupes ont notamment décrit la synthèse de plusieurs monomères qui diffèrent seulement par l'agent de blocage utilisé pour protéger la fonction isocyanate. Sadoun et coll⁷⁵ ont décrit la protection de l'IEM à l'aide de sept agents de blocage alors que Fravel et coll⁷⁶ en ont utilisé dix-huit. Le phénol, l'acétone oxime, la butan-2-one oxime et l' ϵ -caprolactame ont été utilisés par ces deux groupes. Dans les deux cas, la protection est effectuée en utilisant un catalyseur à base d'étain. Les monomères méthacryliques ainsi synthétisés sont ensuite polymérisés par voie radicalaire pour obtenir des homopolymères, caractérisés par différentes techniques afin de déterminer leurs propriétés physiques telle que la température de transition vitreuse par exemple. Des copolymérisations ont également été menées ; Fravel⁷⁶ a utilisé quelques-uns de ces monomères protégés comme co-monomère avec du méthacrylate de méthyle (MMA) et de l'acrylate d'éthyle alors que Sadoun a lui copolymérisé l'IEM, protégé par le phénol, avec du MMA ou du styrène.⁷⁷ Afin de vérifier le caractère réactif des fonctions isocyanate bloqué, Sadoun a mis ces copolymères, ainsi que l'homopolymère issu de l'IEM protégé par le phénol, en présence de 1,2-diaminoéthane afin d'observer une réticulation du système. Le Schéma 13 illustre le cas de l'homopolymère.

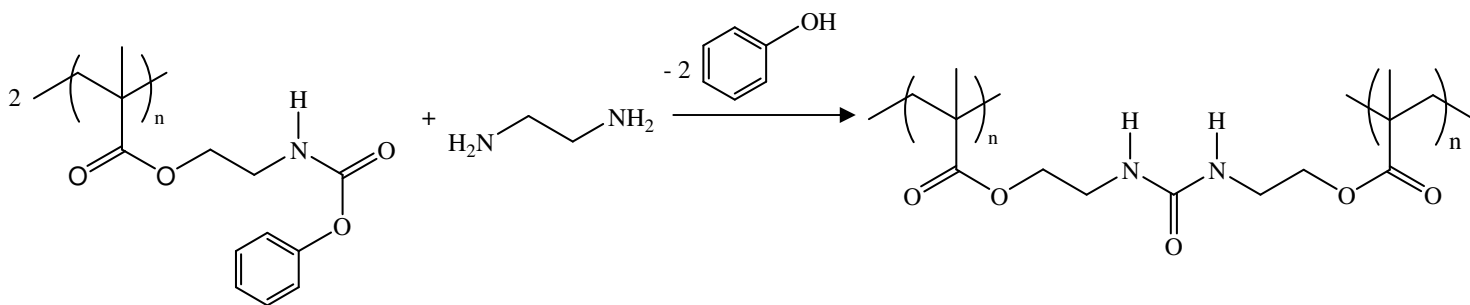


Schéma 13 : Réticulation de polymères portant des fonctions isocyanate bloqué par le phénol.

La réticulation est observée de manière instantanée à température ambiante dans le tétrahydrofurane (THF) avec la formation d'un gel. Une comparaison des spectres IR-TF du polymère avant et après réticulation montre la disparition de la bande d'absorption à 1740 cm^{-1} , caractéristique de la fonction carbonyle de la fonction uréthane, et l'apparition d'une bande d'absorption à 1650 cm^{-1} , caractéristique de la fonction carbonyle de la fonction urée.

La protection des fonctions isocyanate de l'IEM et du TMI permet donc la synthèse de monomères méthacrylique et styrénique de manière simple, rapide et surtout à partir de réactifs commerciaux. Une autre méthode a été développée pour obtenir des polymères porteurs de fonctions isocyanate bloqué ; elle se base sur un réarrangement de Curtius à partir d'azotures d'acyles. Deux exemples vont décrire ce procédé.

Chang et al.⁷⁸ ont décrit la synthèse d'un monomère maléimide porteur d'une fonction isocyanate bloqué, obtenue après traitement thermique et mise en présence de phénol et d'un précurseur de type azoture d'acyle (cf. Schéma 14). Ce monomère a été copolymérisé par voie radicalaire avec du MMA ou de l'acide acrylique. Dans les deux cas, une réticulation est observée après traitement thermique des copolymères.

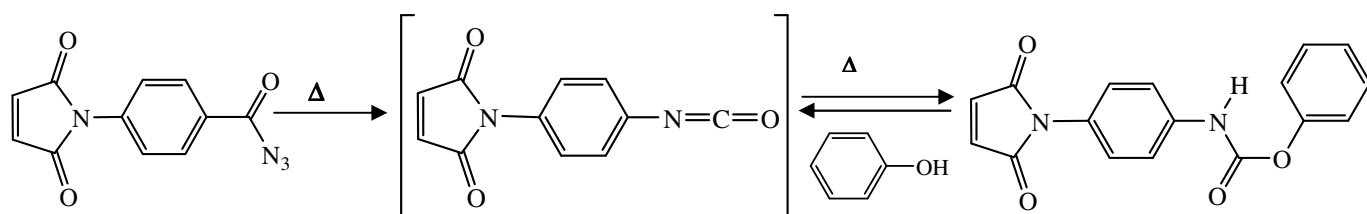


Schéma 14 : Synthèse d'un monomère maléimide porteur d'une fonction isocyanate bloqué.

Toujours suite à un réarrangement de Curtius, les fonctions azoture d'acyle en para d'un polystyrène ont été modifiées en fonction isocyanate bloqué après traitement thermique et en présence de divers alcools (cf. Schéma 15).⁷⁹ La réactivité de la fonction isocyanate bloqué, générée *in situ*, a été vérifiée en observant, par spectroscopie IR-TF, la disparition de la bande isocyanate lors de la formation de fonctions urées en présence d'amines.

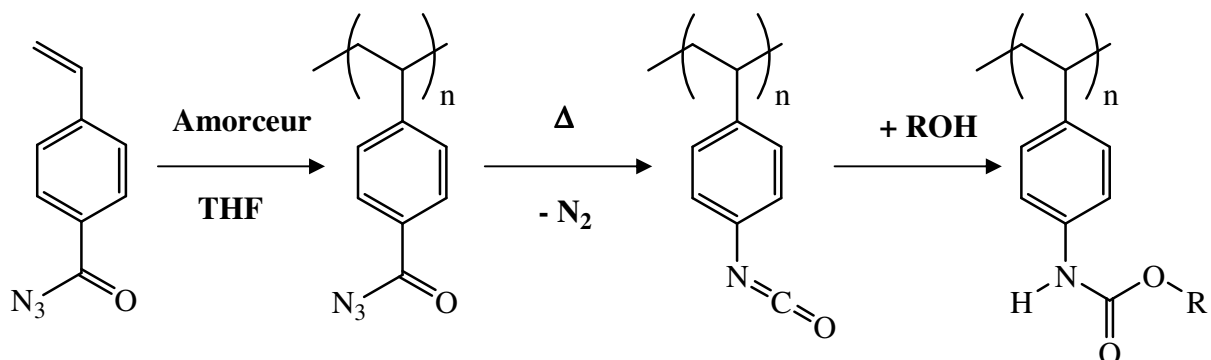


Schéma 15 : Modification de fonctions pendantes pour l'obtention de groupements fonctionnels isocyanate bloqué en présence d'alcool.

La synthèse de monomères ou de polymères porteurs de fonctions isocyanate bloqué après réarrangement de Curtius est nettement moins intéressante que la protection de l'IEM ou du TMI. En effet, cette voie est plus fastidieuse puisqu'elle nécessite plusieurs étapes et surtout demande une attention particulière quant à la manipulation des azotures d'acyles.

7. Conclusions

La fonction isocyanate est connue pour être l'une des fonctions de la chimie organique parmi les plus réactives avec les nucléophiles. Etant donné son grand intérêt dans de nombreux domaines d'applications, on trouve souvent les isocyanates sous une forme bloquée. Ce procédé, couramment utilisé dans l'industrie pour leur stockage, est rapide et simple à mettre en œuvre. Les isocyanates, même sous cette forme, réagissent rapidement et efficacement en présence de bons nucléophiles comme les amines. La plupart des agents de blocage mènent à l'obtention de composés lipophiles ; cependant, la synthèse d'isocyanates bloqués hydrosolubles, en utilisant la famille des bisulfites, est largement décrite.

L'utilisation récente d'isocyanates bloqués dans le cadre de bioconjugaison d'oligonucléotides, alliée à la disponibilité commerciale de monomères porteurs de fonctions

isocyanate, dont l'IEM, permet d'envisager le développement de divers systèmes fonctionnalisés isocyanate bloqué pour la bioconjugaison de protéines.

La suite de ce manuscrit présentera la synthèse de trois architectures polymères fonctionnalisés isocyanate bloqué. Les deux premières utilisent des fonctions isocyanate bloqué chargées négativement permettant d'introduire un caractère hydrophile élevé dans le polymère ; le dernier système est quant à lui neutre et lipophile.

1. Ulbrich, K.; Strohalm, J.; Subr, V.; Plocova, D.; Duncan, R.; Rihova, B. *Macromolecular Symposia* **1996**, 103, 177-192.
2. Omelyanenko, V.; Kopeckova, P.; Gentry, C.; Shiah, J. G.; Kopecek, J. *Journal of Drug Targeting* **1996**, 3, (5), 357-373.
3. Maeda, H., The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. In *Advances in Enzyme Regulation, Vol 41*, Pergamon-Elsevier Science Ltd: Oxford, **2001**; Vol. 41, pp 189-207.
4. Maeda, H. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 46, (1-3), 169-185.
5. Youngster, S.; Wang, Y. S.; Grace, M.; Bausch, J.; Borden, R.; Wyss, D. F. *Current Pharmaceutical Design* **2002**, 8, (24), 2139-2157.
6. Caliceti, P.; Veronese, F. M. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, 55, (10), 1261-1277.
7. Duncan, R. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, 2, (5), 347-360.
8. Dhal, P. K.; Holmes-Farley, S. R.; Mandeville, W. H.; Neenan, T. X., *Polymeric drugs*. 3rd ed.; Wiley: New York, **2002**; p 555-580.
9. Ringsdorf, H. *Journal of Polymer Science Part C-Polymer Symposium* **1975**, (51), 135-153.
10. Harris, J. M.; Chess, R. B. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, 2, (3), 214-221.
11. Davis, F. F. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, (4), 457-458.
12. Kakizawa, Y.; Kataoka, K. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, (2), 203-222.
13. Wagner, E. *Pharmaceutical Research* **2004**, 21, (1), 8-14.
14. Thordarson, P.; Le Droumaguet, B.; Velonia, K. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, 73, (2), 243-254.
15. Hodgson, D. R. W.; Sanderson, J. M. *Chemical Society Reviews* **2004**, 33, (7), 422-430.
16. Budisa, N. *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, 43, (47), 6426-6463.
17. Niemeyer, C. M. *Nano Today* **2007**, 2, (2), 42-52.
18. Heise, C.; Bier, F. F., Immobilization of DNA on microarrays. In *Immobilisation of DNA on Chips II*, Springer-Verlag Berlin: Berlin, **2005**; Vol. 261, pp 1-25.
19. Niemeyer, C. M., *Bioconjugations Protocols Strategies and Methods*. Humana Press: Totowa, **2004**.
20. Veronese, F. M.; Pasut, G. *Drug Discovery Today* **2005**, 10, (21), 1451-1458.

21. Klok, H. A. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2005**, 43, (1), 1-17.
22. Wetzell, R.; Halualani, R.; Stults, J. T.; Quan, C. *Bioconjug. Chem.* **1990**, 1, (2), 114-122.
23. Gaertner, H. F.; Offord, R. E. *Bioconjug. Chem.* **1996**, 7, (1), 38-44.
24. Kinstler, O. B.; Brems, D. N.; Lauren, S. L.; Paige, A. G.; Hamburger, J. B.; Treuheit, M. J. *Pharmaceutical Research* **1996**, 13, (7), 996-1002.
25. McFarland, J. M.; Francis, M. B. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (39), 13490-13491.
26. Velonia, K.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (16), 4224-4225.
27. Heredia, K. L.; Bontempo, D.; Ly, T.; Byers, J. T.; Halstenberg, S.; Maynard, H. D. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (48), 16955-16960.
28. Hermanson, G. T., *Bioconjugate techniques*. San Diego CA, **1996**.
29. Joshi, N. S.; Whitaker, L. R.; Francis, M. B. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (49), 15942-15943.
30. Schlick, T. L.; Ding, Z. B.; Kovacs, E. W.; Francis, M. B. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (11), 3718-3723.
31. Tilley, S. D.; Francis, M. B. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, (4), 1080-1081.
32. Sato, H. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, (4), 487-504.
33. Wicks, D. A.; Wicks, Z. W. *Progress in Organic Coatings* **1999**, 36, (3), 148-172.
34. Wicks, D. A.; Wicks, Z. W. *Progress in Organic Coatings* **2001**, 41, (1-3), 1-83.
35. Entelis, S. G.; Nesterov, O. V. *Russ. Chem. Rev.* **1966**, 35, (12).
36. de Aguirre, I.; Collot, J. *Bulletin Des Societes Chimiques Belges* **1989**, 98, (1), 19-30.
37. Oberth, A. E.; Bruenner, R. S. *J. Phys. Chem.* **1968**, 72, (3), 845-855.
38. Guise, G. B.; Jackson, M. B.; McLaren, J. A. *Aust. J. Chem.* **1972**, 25, (12), 2583-2595.
39. Kirkpatrick, A.; Maclaren, J. A. *Australian Journal of Chemistry* **1977**, 30, (4), 897-901.
40. Welsh, E. R.; Schauer, C. L.; Qadri, S. B.; Price, R. R. *Biomacromolecules* **2002**, 3, (6), 1370-1374.
41. Reddie, R. N.; Peters, D. E. *Talanta* **1979**, 26, (5), 389-393.

42. Lienert, H.-J.; Schuster, H.; Schäffer, K.; Reich, F., US 3984365, **1976**.
43. Dalton, J. R.; Kirkpatrick, A.; Maclaren, J. A. *Australian Journal of Chemistry* **1976**, 29, (10), 2201-2205.
44. Lethiphai; Viollaz, F.; Camberlin, Y.; Lam, T. M.; Pascault, J. P. *Macromolecular Chemistry and Physics* **1984**, 185, (2), 281-295.
45. Williams, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1972**, (6), 808-812.
46. Rand, L.; Lateef, A. B.; Reeder, J. A. *J. Org. Chem.* **1971**, 36, (16), 2295-2298.
47. Furuya, Y.; Goto, S.; Itoho, K.; Urasaki, I.; Morita, A. *Tetrahedron* **1968**, 24, (5), 2367-2375.
48. Nakao, M.; Nyudo, T.; Sato, H., JP 55017357, **1980**.
49. de Aguirre, I.; Collot, J. *Bulletin Des Societes Chimiques Belges* **1989**, 98, (1), 19-30.
50. Abbate, F. W.; Farrissey, W. J. J.; Sayigh, A. A. R. *J. Appl. Polymer. Sci.* **1972**, 16, (5), 1213-1234.
51. Levine, A. W.; Fech, J. J. *J. Org. Chem.* **1972**, 37, (10), 1500-1503.
52. Guise, G. B.; Freeland, G. N.; Smith, G. C. *Journal of Applied Polym Science* **1979**, 23, (2), 353-365.
53. Anagnostou, T.; Jaul, E. *Journal of Coatings Technology* **1981**, 53, (673), 35-45.
54. Griffin, G. R.; Willwerth, L. J. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop.* **1962**, 1, (4), 265-268.
55. Wong, S. W.; Damusis, A.; Frisch, K. C.; Jacobs, R. L.; Long, J. W. *Journal of Elastomers and Plastics* **1979**, 11, (1), 15-36.
56. Papadopoulos, E. P. *Journal of Organic Chemistry* **1979**, 44, (22), 3858-3861.
57. Gras, R.; Obendorf, J.; Wolf, E., DE 2 744 782, **1979**.
58. Zheng, S.; Bennett, G. A., US 0064324, **2005**.
59. Ozaki, S. *Chem. Rev.* **1972**, 72, (5), 457-496.
60. Kashiwagi, T.; Hidai, M.; Uchida, Y.; Misono, A. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters* **1970**, 8, (3), 173-175.
61. Tang, J. S.; Verkade, J. G. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1993**, 32, (6), 896-898.

62. Collot, J. Etude Cinétique et Thermodynamique du Déblochage d'Isocyanates. Louvain, **1991**.
63. Katsamberis, D.; Pappas, S. P. *Journal of Applied Polymer Science* **1990**, 41, (9-10), 2059-2065.
64. McBride, R. J. *Oil Colour Chem. Assoc.* **1982**, 65, 257.
65. Kothandaraman, H.; Thangavel, R. *Angewandte Makromolekulare Chemie* **1993**, 207, 93-99.
66. Carlson, G. M.; Neag, C. M.; Kuo, C.; Provder, T. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **1984**, 188, (AUG), 115-POLY.
67. Kuo, C.; Provder, T. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **1988**, 196, 101-PMSE.
68. Kordomenos, P. I.; Dervan, A. H.; Kresta, J. *Journal of Coatings Technology* **1982**, 54, (687), 43-51.
69. Cholli, A.; Koenig, J.; Sun, T.; Zhou, H. *Journal of Applied Polymer Science* **1983**, 28, (11), 3497-3502.
70. Witzeman, J. S. *Progress in Organic Coatings* **1996**, 27, (1-4), 269-276.
71. Mohanty, S.; Krishnamurti, N. *European Polymer Journal* **1998**, 34, (1), 77-83.
72. Vigano, M.; Suriano, R.; Levi, M.; Turri, S.; Chiari, M.; Damin, F. *Surface Science* **2007**, 601, (5), 1365-1370.
73. Vigano, M.; Levi, M.; Turri, S.; Chiari, M.; Damin, F. *Polymer* **2007**, 48, (14), 4055-4062.
74. McLauchlin, A., WO 14425, **1998**.
75. Sadoun, T.; Clouet, G.; Brossas, J. *Makromolekulare Chemie* **1987**, 188, (6), 1367-1373.
76. Fravel, H. G.; Reguiski, T. W.; Thomas, M. R. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development* **1984**, 23, (4), 586-590.
77. Clouet, G.; Sadoun, T. *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry* **1992**, 29, (10), 939-952.
78. Chang, J. Y.; Kim, T. J.; Han, M. J.; Chae, K. H. *Polymer* **1999**, 40, (14), 4049-4054.
79. Klinger, D.; Chang, J. Y.; Theato, P. *Macromolecular Rapid Communications* **2007**, 28, (6), 718-724.

B. Partie Résultats et discussion

I. Synthèse aisée d'un hydrogel porteur de fonctions isocyanate bloqué

1. Introduction

Comme expliqué dans la partie bibliographique (cf partie A), notre stratégie visait d'abord à définir des techniques simples pour l'introduction d'isocyanates bloqués, en privilégiant les monomères pouvant être obtenus aisément à partir de molécules commerciales. La protection du méthacrylate de 2-isocyanatoéthyle (IEM), monomère disponible commercialement, est décrite dans la littérature dans le cas d'agents de blocages menant à des isocyanates bloqués lipophiles: phénol, oxime, lactame... (cf. paragraphe A.II.6).^{1,2} Cependant, l'obtention de monomère isocyanate bloqué hydrosoluble n'est, à l'exception d'un cas décrit un peu plus loin (méthode de Zheng-Bennett), pas rapportée dans la littérature. Dans un premier temps, nous nous sommes donc intéressés à cette technique afin d'obtenir un polymère possédant des groupements pendants isocyanates bloqués soluble dans l'eau.

2. Formation de l'hydrogel

Comme présenté dans la partie bibliographique, Zheng et Bennett³ ont déposé un brevet publié au cours de l'année 2005, décrivant la protection de l'IEM à l'aide de bisulfites et donc l'obtention d'un monomère porteur d'une fonction isocyanate bloqué et soluble dans l'eau. L'adduit sulfonate IEMSO_3^- est formé comme illustré par le Schéma 16 (équation (i)). Aucune description complète n'est cependant fournie par les auteurs quant à la synthèse du monomère protégé : un protocole expérimental et une caractérisation par spectroscopie RMN du proton ^1H sont présentés dans le cas de l'adduit isocyanate de n-butyle-sulfonate³, mais ces informations ne sont pas fournies explicitement dans le cas de l'IEM. Les auteurs affirment que les conditions expérimentales décrites pour l'isocyanate de n-butyle, ont été utilisées dans le cas de l'IEM.

Dans le but de reproduire cette expérience, nous avons dans un premier temps suivi strictement les conditions expérimentales décrites dans le mode opératoire original (0,02 mol d'isocyanate dissous dans 2 mL de 1,4-dioxane et addition de cette solution à une solution de 0,01 mol de métabisulfite de sodium dans 10 mL d'eau). Ce protocole conduit, dans notre cas, la formation d'un gel insoluble, suggérant un processus de réticulation et non pas la formation du monomère protégé, ou d'un polymère hydrosoluble (cf. Schéma 16 équations (i) – (iii)). La formation du gel s'est montrée parfaitement reproductible, avec une faible variabilité vis-à-vis des conditions expérimentales décrites plus haut.

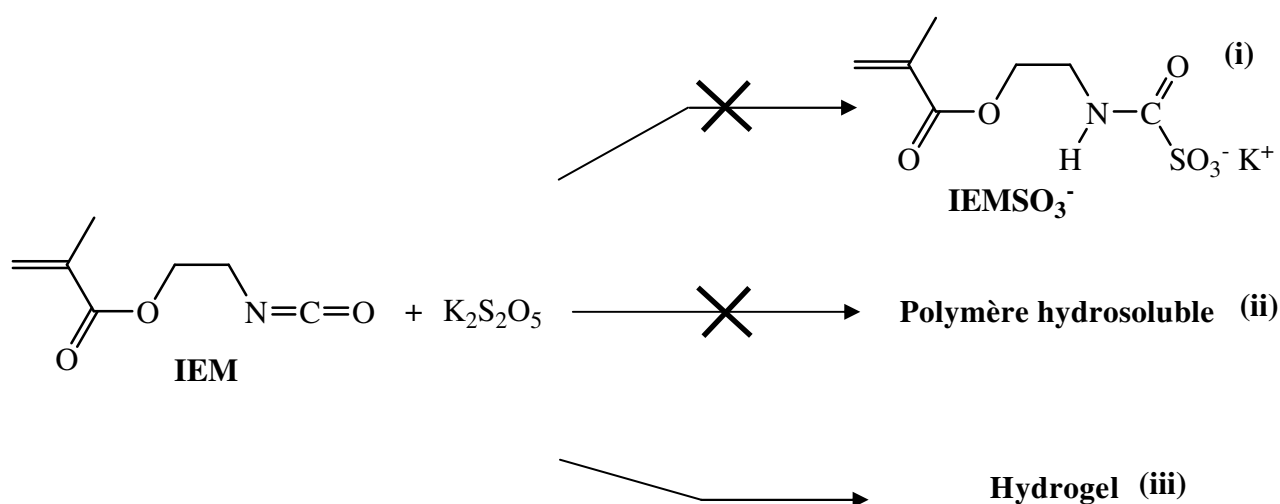


Schéma 16 : Structures possibles à partir de la réaction de l'IEM et du métabisulfite de potassium.

a. Synthèse du *n*-butylcarbamoylsulfonate de potassium

Afin de déterminer la nature chimique de l'hydrogel par spectroscopie RMN ^{13}C , la synthèse de l'adduit butylisocyanate-sulfonate comme molécule modèle et sa caractérisation se sont avérées fort utiles. En effet, l'absence dans la littérature de valeur pour le déplacement chimique associé au carbone de la fonction isocyanate bloqué sulfonate ($-NH-C(=O)-SO_3^- K^+$) a pu être comblée grâce au spectre RMN ^{13}C du *n*-butylcarbamoylsulfonate de potassium ($n-Bu-NH(C=O)-SO_3^-$).

Le protocole décrit par Zheng et Bennett³ a été utilisé afin de reproduire la synthèse du *n*-butylcarbamoylsulfonate de potassium (cf. Schéma 17). Le rendement de la synthèse (non mentionné dans le brevet) est de 55%.

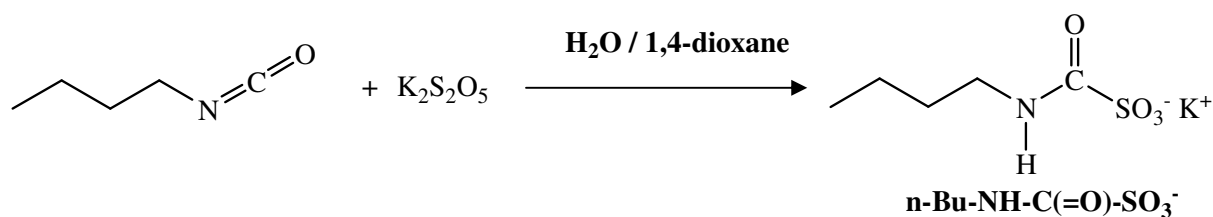


Schéma 17 : Synthèse du n-butylcarbamoylsulfonate de potassium.

Le produit ainsi synthétisé a été caractérisé par spectroscopie RMN ¹³C. La Figure 1 présente l'attribution des différents signaux du composé. Le déplacement chimique du carbone du groupe fonctionnel sulfonato-carbamate (-NH-C(=O)-SO₃⁻ K⁺) est observé à 168,1 ppm.

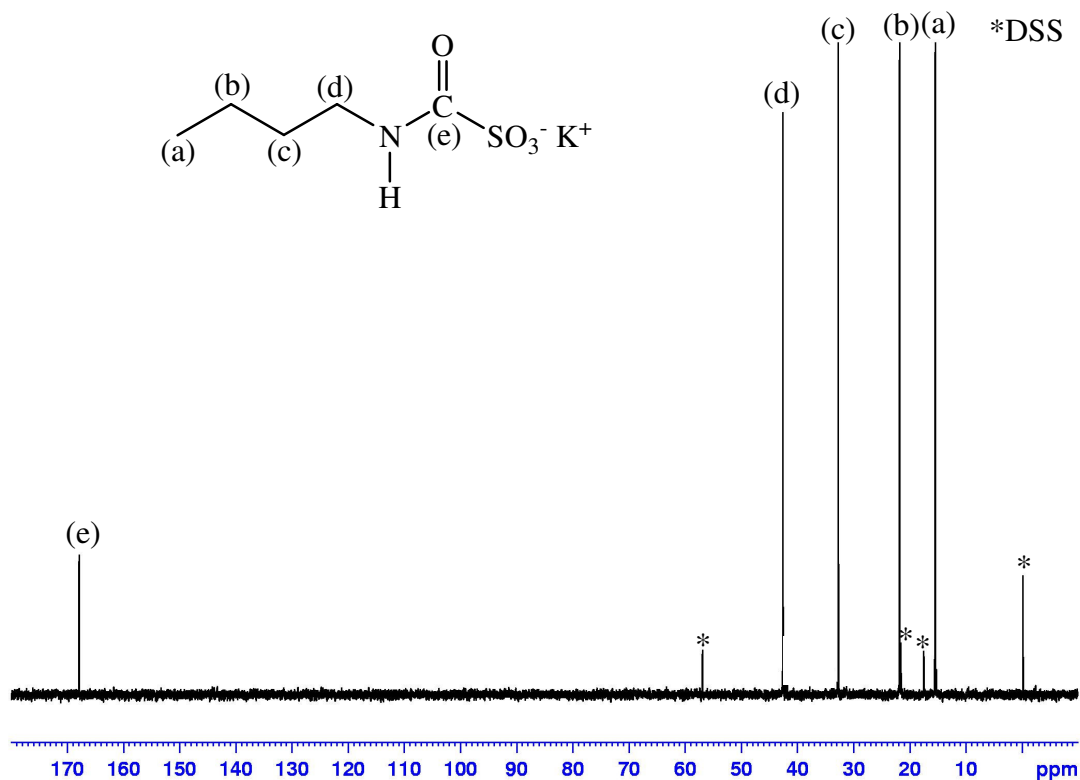


Figure 1 : Spectre RMN ¹³C du n-butylcarbamoylsulfonate de potassium dans D₂O.

b. Caractérisations spectroscopiques de l'hydrogel

Le spectre RMN ¹³C quantitatif du gel (cf. Figure 2), réalisé en solution, contient l'ensemble des déplacements chimiques attendus pour l'homopolymère hydrosoluble. Une attribution plus complète est présentée sur la figure ci-dessous. La région des carbonyles

montre un déplacement chimique supplémentaire à 160 ppm qui peut être attribué à une fonction urée (h). Il est à noter que le déplacement chimique propre à une liaison C=O propre à une fonction de type méthacrylate doit apparaître entre 167-168 ppm et pourrait être masqué par le groupe carbonyle de la fonction aminocarboxysulfonate indiqué par (g) sur le spectre. Cependant, l'absence de signal correspondant au CH₂ de la fonction méthacrylate à 126 ppm semble indiquer qu'il ne reste aucune fonction méthacrylate.

Afin de pouvoir estimer la proportion relative des fonctions (d), (g) et (h), une analyse RMN ¹³C quantitative a été menée. Cette analyse a révélé que le nombre de carbones correspondant à la fonction isocyanate bloqué sulfonate est environ 9 fois plus important que ceux propres à la fonction urée.

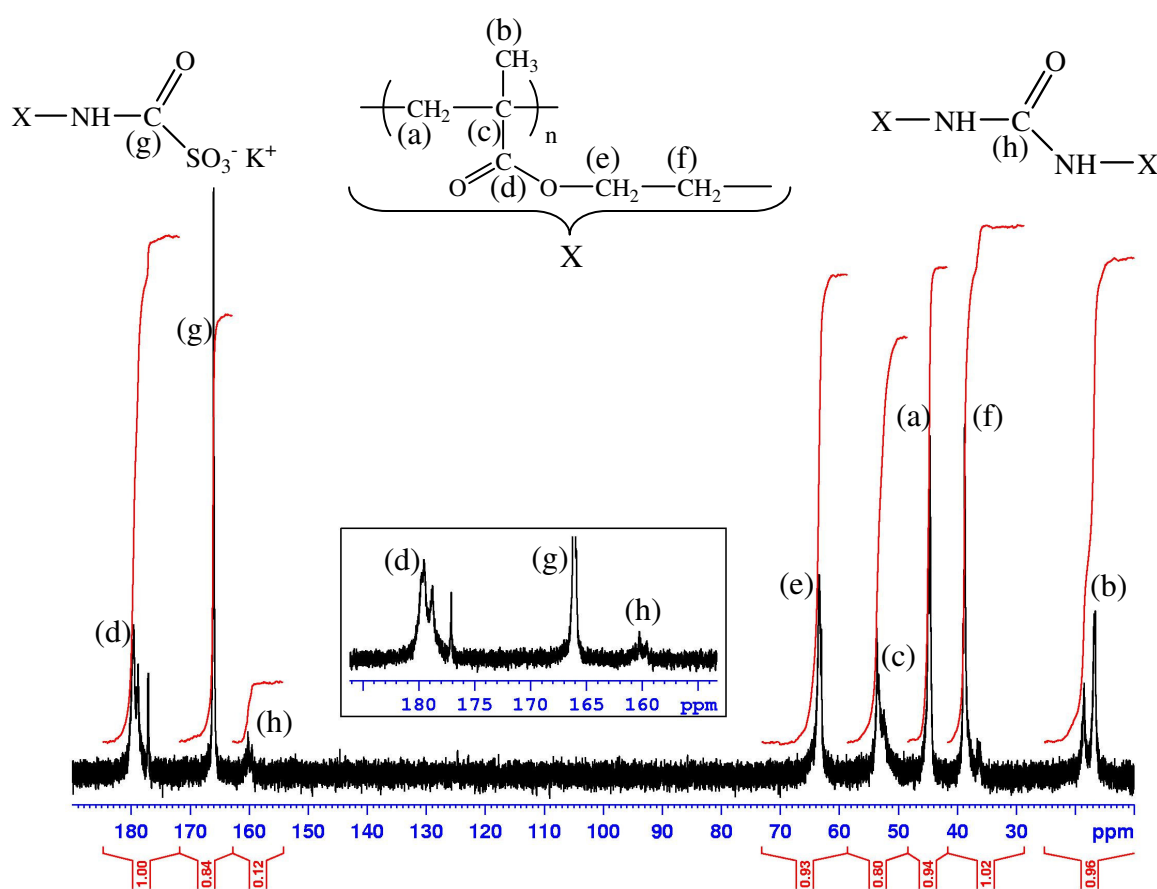


Figure 2 : Spectre RMN ¹³C quantitatif de l'hydrogel dans D₂O.

Le spectre IR-TF d'un échantillon de gel sec (cf. Figure 3) ne présente pas la bande de vibration typique des isocyanates (-N=C=O) entre 2 260 et 2 280 cm⁻¹.² Une comparaison avec le spectre IR-TF de l'IEM, du poly(méthacrylate de méthyle) et du n-butylcarbamoylsulfonate de potassium indique que le gel possède une structure compatible avec le poly(IEMSO₃⁻). La large bande entre 1 650 et 1 750 cm⁻¹ correspond aux trois

fonctions carbonyles (ester, uréthane et urée) qui ne peuvent être distinguées. Sur la base de ces éléments spectroscopiques, on peut donc proposer une structure réticulée portant des fonctions isocyanate bloqué (-NH-C(=O)-SO₃⁻ K⁺) et illustrée par le schéma 18 .

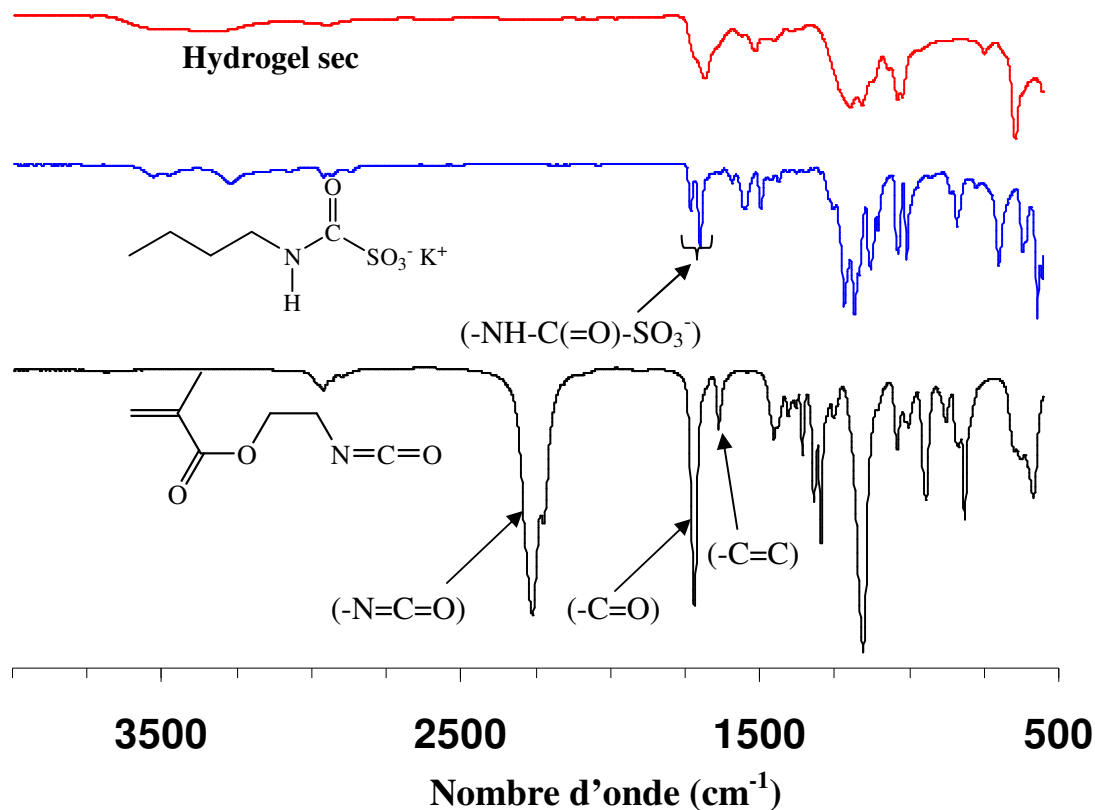


Figure 3 : Spectres IR-TF d'un échantillon sec d'hydrogel, du n-butylcarbamoylsulfonate de potassium et de l'IEM.

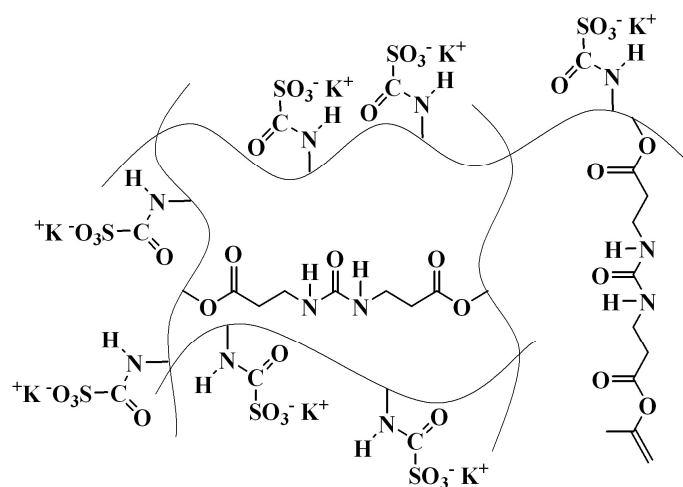


Schéma 18 : Structure de l'hydrogel.

3. Analyse mécanistique de la formation de l'hydrogel

L'absence de fonction isocyanate, comme le montre le spectre IR-TF et le spectre RMN ^{13}C , et par conséquent la conversion importante en fonction NH-C(=O)-SO_3^- , indique que la réaction entre isocyanate et bisulfite est rapide et efficace. Cette observation est compatible avec la quantité d'adduit $\text{n-Bu-NH-C(=O)-SO}_3^-$ obtenue dans des conditions expérimentales quasi identiques à celles utilisées avec l'IEM.

La formation de gel implique cependant qu'une polymérisation ait lieu simultanément à la protection de la fonction isocyanate. La littérature décrit la polymérisation radicalaire de monomères vinyliques amorcée à l'aide de bisulfite en présence d'un oxydant. Cependant nous n'avons pu trouver de protocole décrivant la polymérisation radicalaire d'un monomère vinylique à l'aide d'un bisulfite inorganique seul (c'est-à-dire sans co-amorceur redox). Afin de déterminer si une telle polymérisation pouvait être possible, une expérience test, dans les conditions de formation de gel, a été menée en substituant l'IEM par le méthacrylate de 2-hydroxyéthyle (HEMA) comme monomère vinylique. Une conversion de 17 % a été obtenue après 17 heures, ce qui indique qu'une polymérisation radicalaire est possible en dépit d'une faible efficacité d'amorçage ou d'une très lente vitesse d'amorçage.

D'autre part, le rapport stœchiométrique entre l'IEM et le bisulfite de potassium a été modifié afin d'observer l'influence de ce facteur sur le processus de formation du gel. Le Tableau 2 résume les expériences effectuées. Une diminution de moitié de la quantité de bisulfite implique une formation plus lente du gel passant de 1 h (H3) à 3 h (H1).

#	$[\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5]$ (mol.L $^{-1}$)	t (h) ^a
H 1	0,18	3
H 2 ^b	0,35	pas de formation de gel
H 3	0,35	1

Tableau 2 : Formation de gel à partir d'IEM et de métabisulfite de potassium

([I] = 0,6 mol.L $^{-1}$; ^a temps nécessaire pour observer la gélification ;

^b oxygène utilisé à la place de l'argon).

Afin d'empêcher potentiellement un amorçage radicalaire et donc d'éviter la polymérisation, un bullage d'oxygène (inhibiteur de radicaux) a été effectué à la place du bullage d'argon. Les conditions aérobies (H2) ont conduit à des résultats ambigus : aucune formation de gel n'a été observée. Cependant, un solide blanc insoluble dans l'eau a été récupéré. Ce solide n'a pu être dissous dans des solvants classiques (eau, chloroforme, acétone, éthanol, tétrahydrofurane, hexane, *N,N*-diméthylformamide, diméthylsulfoxyde et acétonitrile). Ce résultat indique que le produit formé ne peut être l'urée symétrique qui résulterait de l'addition de l'amine provenant de la décarboxylation de l'IEM (réaction (ii) Schéma 19) sur le monomère protégé ou non (réaction (iv)) ; cette urée symétrique a en effet été synthétisée et est soluble dans le chloroforme, comme détaillé au paragraphe B.II.3.d.

Afin d'expliquer la formation d'un gel, un mécanisme de réticulation selon une réaction compétitive à la polymérisation radicalaire est également nécessaire. Nous proposons que l'urée symétrique R-NH-C(=O)-NH-R formé *in situ* puisse, via une copolymérisation radicalaire, se comporter comme un agent de réticulation (réaction (iv)). La présence d'un signal qui correspond au carbonyle urée sur le spectre RMN ¹³C est parfaitement compatible avec ce mécanisme. Par ailleurs les réactions (v) et (vi) peuvent aussi être considérées dans la formation d'urée et donc dans le phénomène de réticulation.

Un mécanisme incluant ces trois réactions, (1) addition de HSO₃⁻ sur -N=C=O (réaction (iii)), (2) amorçage radicalaire direct par HSO₃⁻ et (3) formation de pont urée par décarboxylation, est donc proposé et résumé sur le Schéma 19.

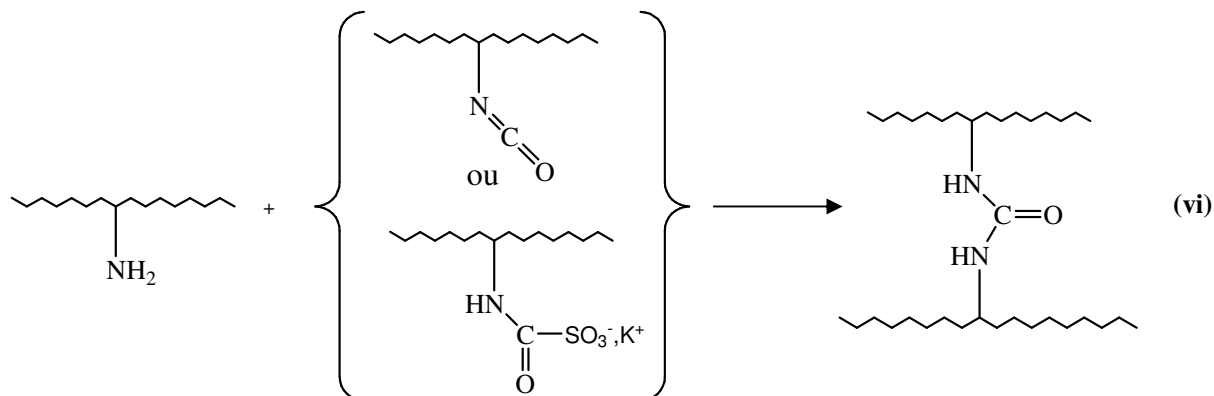
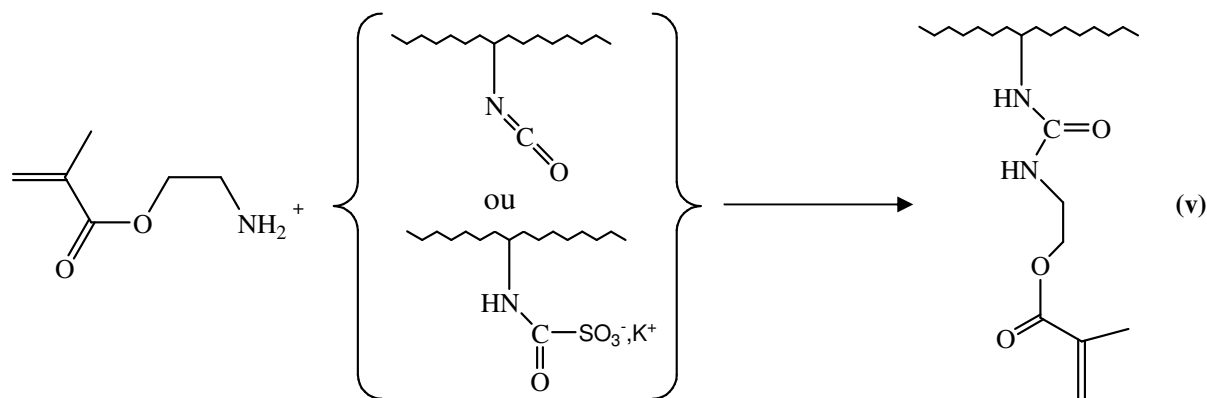
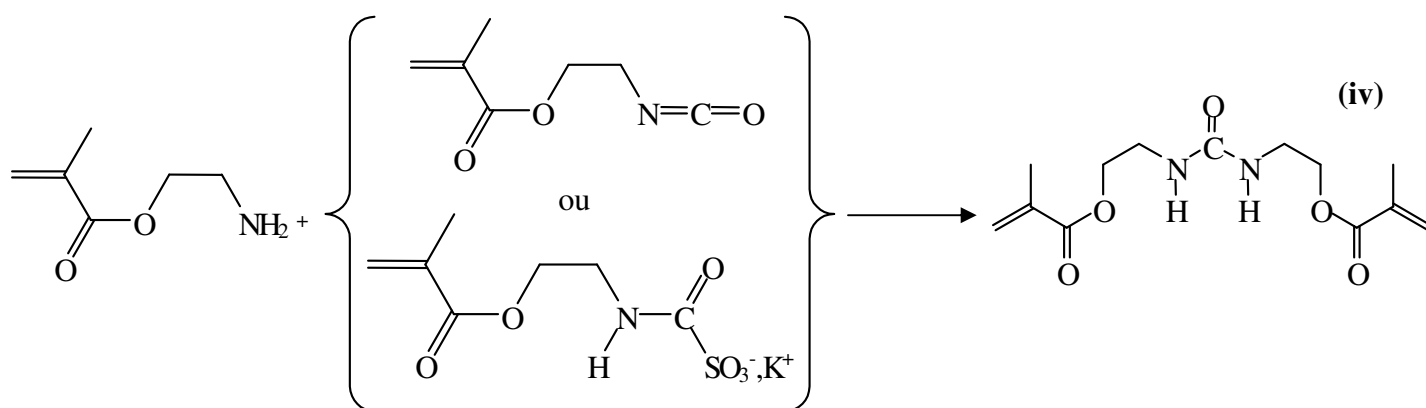
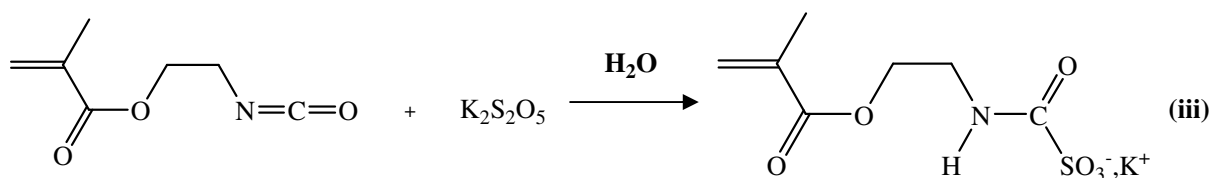
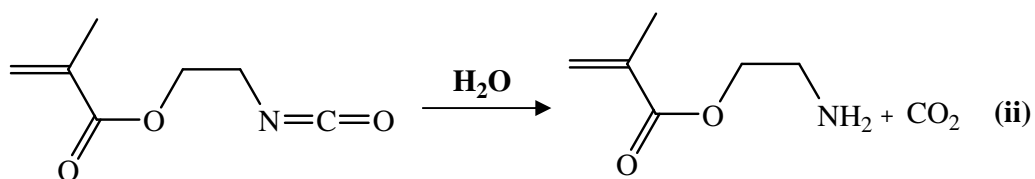
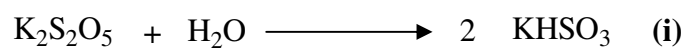


Schéma 19 : Mécanisme de formation d'hydrogel.

4. Caractérisations physico-chimiques de l'hydrogel

L'hydrogel est compact, mou, sans couleur et légèrement opaque. Le séchage pendant une nuit à température ambiante sous vide conduit à l'obtention d'un solide blanc dont le comportement thermique a été caractérisé par ATG (cf. Figure 4). Une perte de masse lente et modérée (5% en masse) entre la température ambiante et une température de l'ordre de 160°C suggère la présence d'eau résiduelle maintenue dans le matériau après le séchage ou bien une prise rapide d'eau durant la préparation de l'échantillon. La seconde hypothèse semble en accord avec le caractère de gonflement très intense observé quand l'échantillon est mis au contact de l'eau. Par exemple, l'addition d'une fraction sèche d'hydrogel de 28 mg dans un large excès d'eau conduit à un gel gonflé de 4,45 g d'eau, ce qui représente environ 160 fois la masse de gel sec. Une étude cinétique (cf. Figure 5) du comportement de gonflement montre que 90 % de la quantité d'eau totale piégée dans le matériau est obtenue après 8 heures ; la moitié de la quantité d'eau piégée est atteinte après 45 minutes.

La poursuite de l'analyse du thermogramme montre une stabilité thermique relativement bonne sans formation d'autres composés volatiles en-dessous de 160°C ; cela indique qu'une forme sèche peut être facilement obtenue pour le stockage.

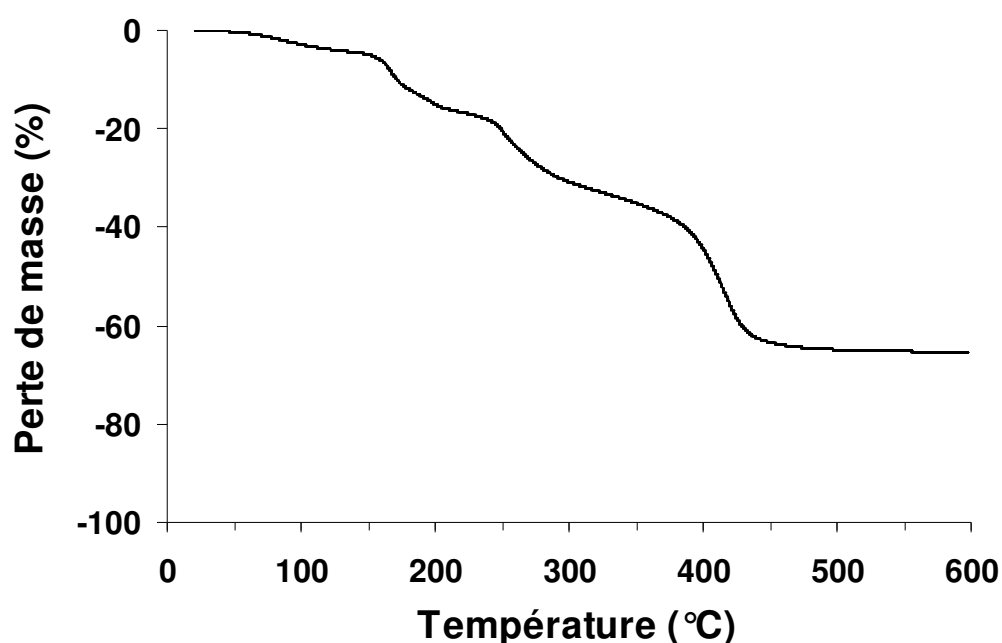


Figure 4 : Thermogramme d'un échantillon sec d'hydrogel.

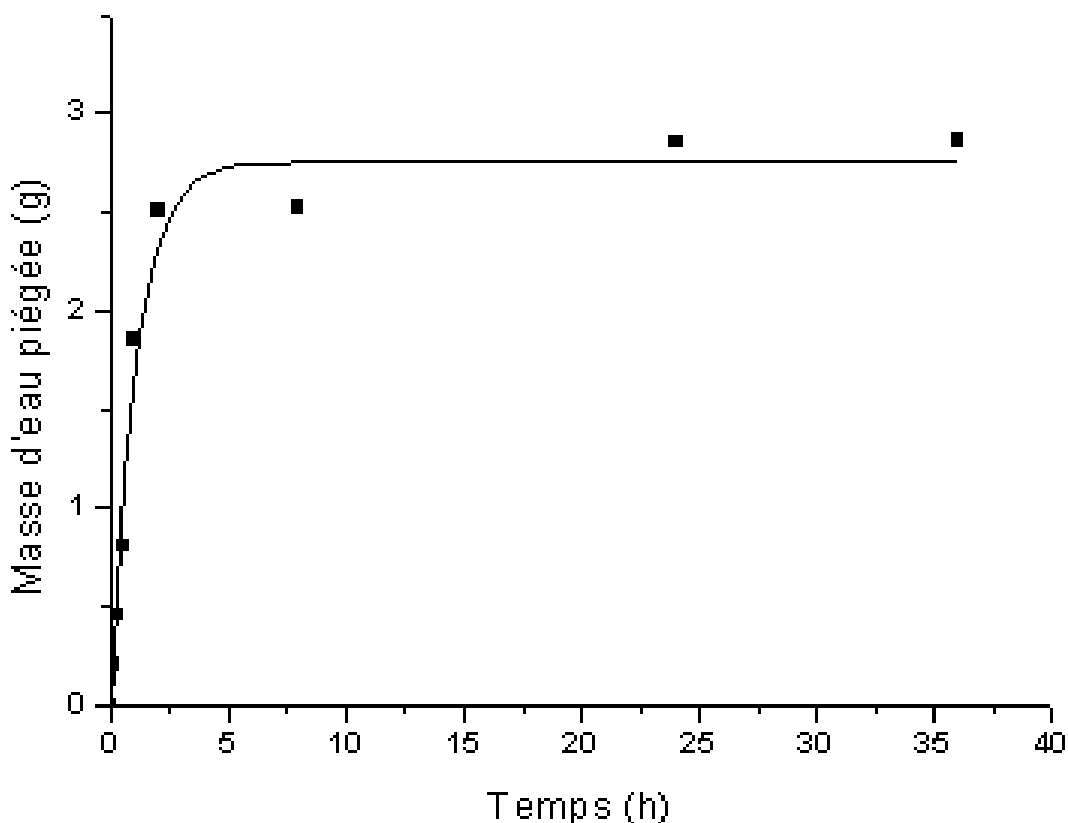


Figure 5 : Evolution cinétique de la masse d'eau piégée dans l'hydrogel.

5. Conclusions

Une tentative d'exploiter un mode opératoire de la littérature pour la synthèse d'un monomère méthacrylique hydrosoluble porteur d'une fonction isocyanate bloqué a été envisagée par addition de bisulfite sur l'IEM dans l'eau. Cette approche a mené systématiquement à l'obtention d'un hydrogel et non pas à la formation du monomère espéré. La synthèse à partir de réactifs commerciaux s'avère rapide, simple à mettre en œuvre et parfaitement reproductible. Une analyse spectroscopique par RMN ^{13}C a permis de prouver la présence importante de fonctions $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{SO}_3^-$ provenant de la protection de fonctions isocyanate par le bisulfite de potassium.

Le gel, pouvant être stocké sous forme sèche, présente une très bonne propension au gonflement dans l'eau, l'hydratation s'effectuant rapidement. Un mécanisme réactionnel se basant de manière simultanée sur une polymérisation radicalaire et une réticulation via la formation de ponts urée est proposé pour expliquer la formation de cet hydrogel.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une communication dans *Macromolecular Rapid Communications* (2007, 28(11), 2007-2011).

II. Synthèse d'un monomère méthacrylate porteur d'une fonction isocyanate bloqué soluble dans l'eau

1. Introduction

Devant l'impossibilité d'utiliser, dans le cas de l'IEM, le bisulfite, agent de blocage usuel pour l'obtention de composé isocyanate bloqué hydrosoluble (cf chapitre B.I), nous avons envisagé le recours à un agent de blocage alternatif. Comme présenté dans l'étude bibliographique (cf paragraphe A.II.3), peu de publications décrivent la synthèse de monomères porteurs de fonctions isocyanate bloqué solubles dans l'eau.^{3,4} Dans ses travaux, Nakao⁵ a cependant suggéré un système intéressant permettant la protection du xylylène de diisocyanate à l'aide du 4-hydroxybenzènesulfonate de sodium (HBSNa) (cf. Schéma 20).

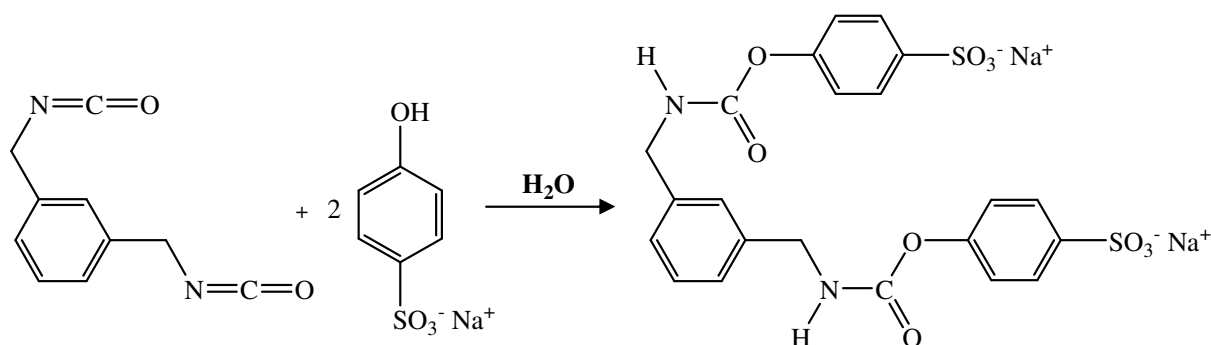


Schéma 20 : Protection du xylylène diisocyanate à l'aide de 4-hydroxybenzènesulfonate de sodium.

En nous inspirant de ces travaux, nous nous sommes donc intéressés, dans un premier temps, à valider la protection d'un isocyanate simple, l'isocyanate de n-butyle, par l'agent de blocage HBSNa, et à étudier la réactivité du composé formé vis-à-vis d'une amine avant d'appliquer, dans un second temps, le concept au cas de l'IEM.

L'utilisation de HBSNa en tant qu'agent de blocage présente deux caractéristiques intéressantes. D'une part ce composé est un dérivé du phénol, dont l'efficacité des agents de blocage phénol a été démontrée lors de diverses réactions de protection d'isocyanates. Dans le cas de HBSNa cependant, la fonction sulfonate par son caractère électroattracteur devrait tendre à diminuer le caractère nucléophile de la fonction phénol. D'autre part, la fonction sulfonate confère à HBSNa un caractère hydrophile important par l'introduction de charges négatives sur le polymère (polyélectrolytes chargés négativement).

2. Validation d'une protection à partir de HBSNa en utilisant un composé modèle carbamoylbenzènesulfonate

a. Synthèse et caractérisation du 4-(butylcarbamoyl)benzènesulfonate de sodium ($BuPhSO_3^-$)

L'isocyanate de n-butyle a été choisi pour appliquer la protection à partir de HBSNa et obtenir le composé modèle carbamoylbenzènesulfonate (cf. Schéma 21) bien caractérisé dont la réactivité vis-à-vis des amines dans l'eau a été investiguée. Cette réaction a été adaptée du protocole décrit par Nakao⁵. Un léger excès d'isocyanate de n-butyle (1,43 équivalents) a été utilisé par rapport à la quantité de HBSNa et le pH n'a pas été tamponné. La synthèse ne nécessite aucun catalyseur comme c'est généralement le cas lors de la protection des isocyanates par des phénols.^{1,2}

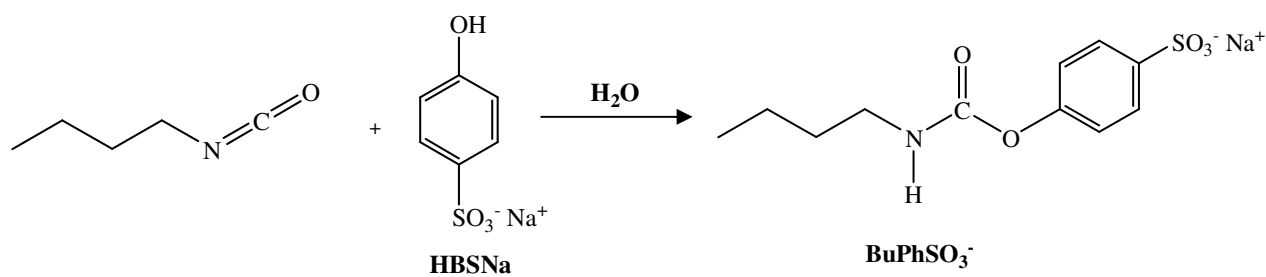


Schéma 21 : Synthèse du 4-(butylcarbamoyl)benzènesulfonate de sodium.

Après une heure de réaction, précipitation dans l'acétone et séchage, le produit se présente sous la forme d'une poudre brunâtre caractérisée par spectroscopie RMN ¹H et ¹³C (cf. Figure 6 et Figure 7).

La spectroscopie RMN ¹H permet de retrouver les signaux de la chaîne aliphatique (a à d) du groupement n-butyle. La zone des protons aromatiques présente quatre signaux, deux, à 7,25 et 7,85 ppm, correspondant aux protons aromatiques du produit formé butylcarbamoylbenzènesulfonate et deux autres, à 6,95 et 7,71 ppm correspondant aux protons aromatiques de HBSNa n'ayant pas réagi. La présence de ces derniers montre que le produit n'est pas pur. Une pureté de 77 % peut être déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\text{Pureté} = \frac{I_{7,25}}{I_{7,25} + I_{6,95}} \times 100 \quad (\text{Eq1})$$

où $I_{6,95}$ et $I_{7,25}$ représentent respectivement les intégrations des protons en position méta de la fonction sulfonate de $BuPhSO_3^-$ et HBSNa.

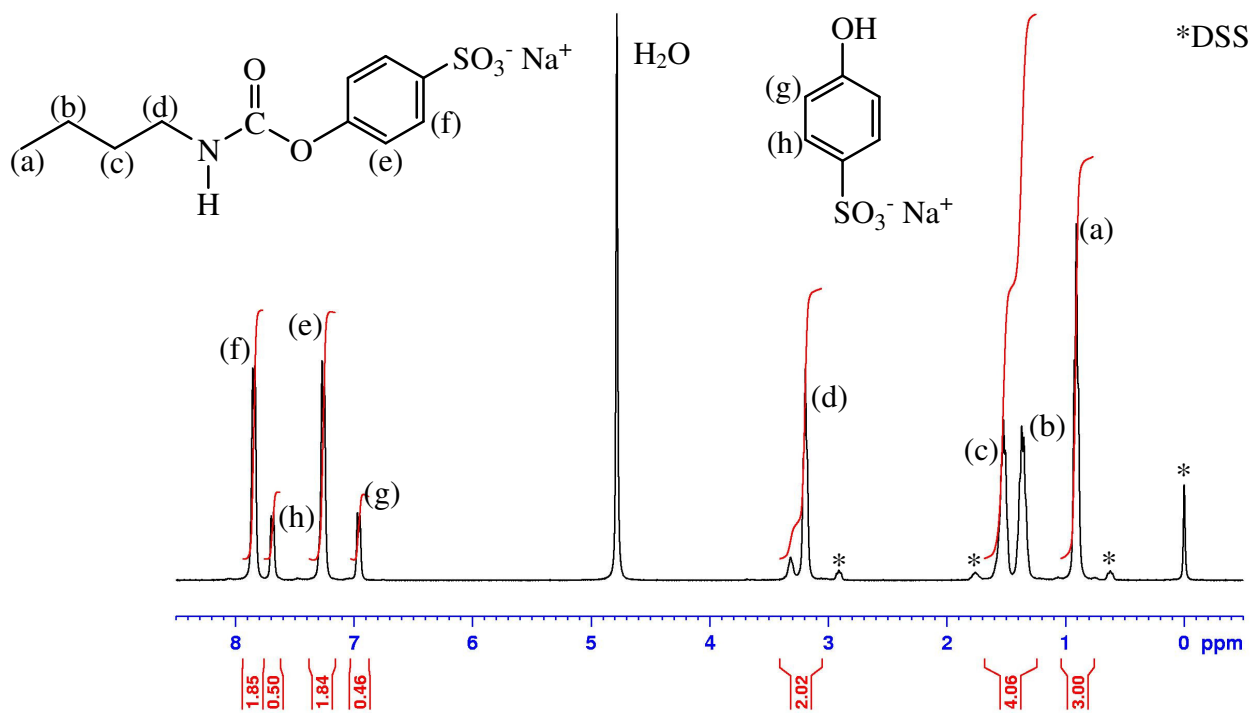


Figure 6 : Spectre RMN ¹H du 4-(butylcarbamoyl)benzènesulfonate de sodium dans D₂O.

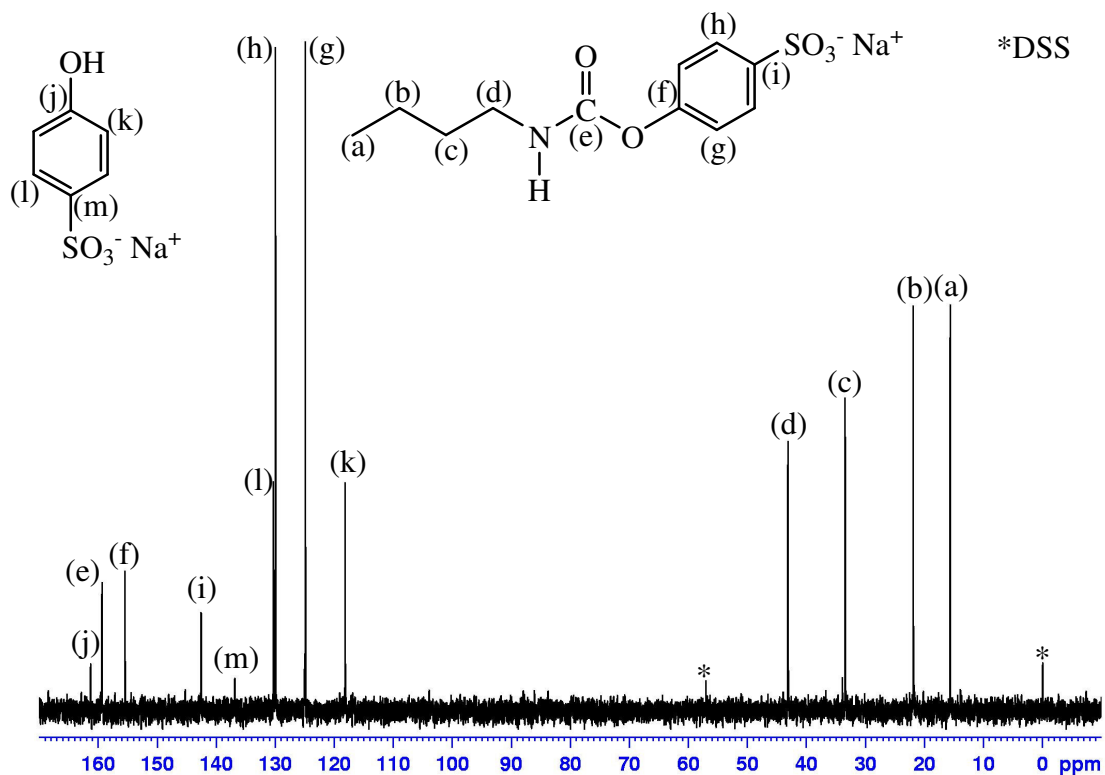


Figure 7 : Spectre RMN ¹³C du 4-(butylcarbamoyl)benzènesulfonate de sodium dans D₂O.

La réaction, effectuée en présence d'un excès d'isocyanate, n'est donc pas totale et HBSNa, insoluble dans l'acétone, ne peut être séparé de BuPhSO₃⁻ lors de l'étape de précipitation dans l'acétone. La réaction ayant été arrêtée après une heure, un temps de réaction plus long pourrait permettre d'augmenter à la fois le rendement et la pureté. L'optimisation de cette réaction ne constituant pas un objectif crucial, une étude plus poussée de cette synthèse n'a cependant pas été menée.

Néanmoins, la présence majoritaire du produit recherché a pu être démontrée, avec notamment la présence du signal correspondant à la fonction (-NH-C(=O)-O-) à 159,3 ppm (confirmé par une analyse RMN 2D ¹H/¹³C) sur le spectre RMN ¹³C. L'absence de signal correspondant à la fonction isocyanate à 125 ppm indique qu'il n'y a pas d'isocyanate de n-butyle résiduel. Ceci est confirmé par l'absence de la bande caractéristique des isocyanates à 2 250 cm⁻¹ sur le spectre IR-TF de BuPhSO₃⁻ (cf. Figure 8). Ce spectre permet par ailleurs d'identifier les bandes correspondant à la fonction carbonyle de la fonction uréthane (-NH-C(=O)-O-) à 1 700 et 1 730 cm⁻¹.

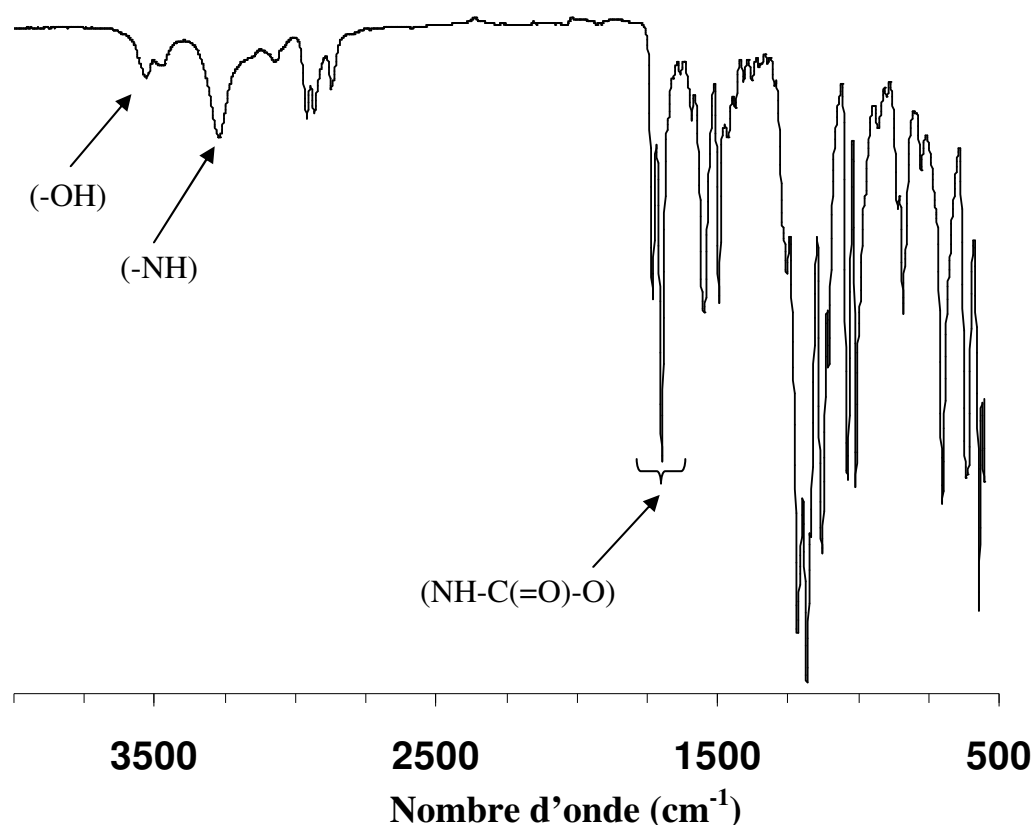


Figure 8 : Spectre IR-TF du 4-(butylcarbamoyl)benzènesulfonate de sodium (contaminé par une faible quantité de HBSNa).

La présence d'une seule impureté permet donc de calculer un rendement corrigé, à partir de la masse totale d'adduit récupéré d'une part et du rapport molaire $\text{BuPhSO}_3^- / \text{HBSNa}$; ce rendement corrigé est égal à 34 %.

b. Réactivité du composé modèle synthétisé

L'isocyanate de n-butyle ayant été protégé, sa réactivité vis-à-vis d'amine a été étudiée en suivant le protocole décrit par Guise.⁶ A une solution de BuPhSO_3^- dans l'eau est ajouté un excès de n-hexylamine (3 équivalents) (cf. Schéma 22). La réaction est effectuée à température ambiante sous agitation magnétique.

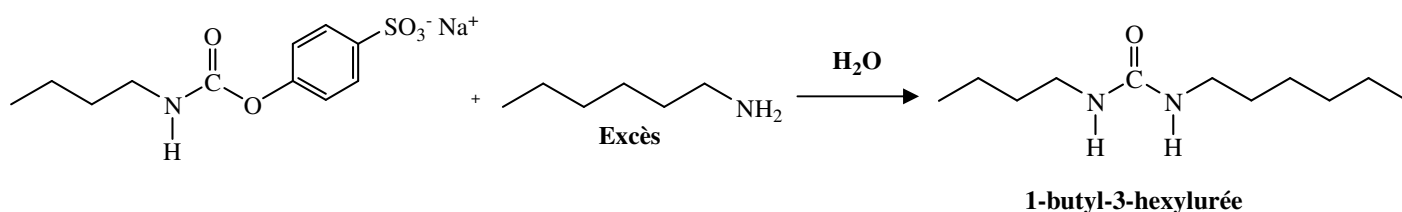


Schéma 22 : Réaction entre BuPhSO_3^- et la n-hexylamine.

Après une nuit, l'excès d'amine est traité par une solution d'acide chlorhydrique, afin de solubiliser cet excès résiduel. Après filtration et séchage, le produit se présente sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 70 %. Un point de fusion de 46°C a été déterminé, qui est resté constant après recristallisation dans l'éthanol. L'analyse élémentaire correspond bien au produit attendu (cf. paragraphe C.III).

L'urée synthétisée a été caractérisée par spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C (cf. Figure 9 et Figure 10). Les spectres RMN ^1H et ^{13}C montrent l'absence des signaux propres aux protons aromatiques. La formation de l'urée a en effet entraîné la régénération de HBSNa soluble dans l'eau qui a été éliminé lors de l'étape de filtration. Le spectre RMN ^{13}C montre également un déplacement chimique, à 159,4 ppm, caractéristique de la fonction urée ($-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$). La fonction urée est également observée sur le spectre IR-TF (cf. Figure 11) avec deux bandes à 1 570 et 1 615 cm^{-1} .

L'obtention d'un bon rendement de cette urée montre que, même sous sa forme protégée par HBSNa, l'isocyanate réagit efficacement avec une amine aliphatique dans des conditions douces, c'est-à-dire en phase aqueuse et à température ambiante.

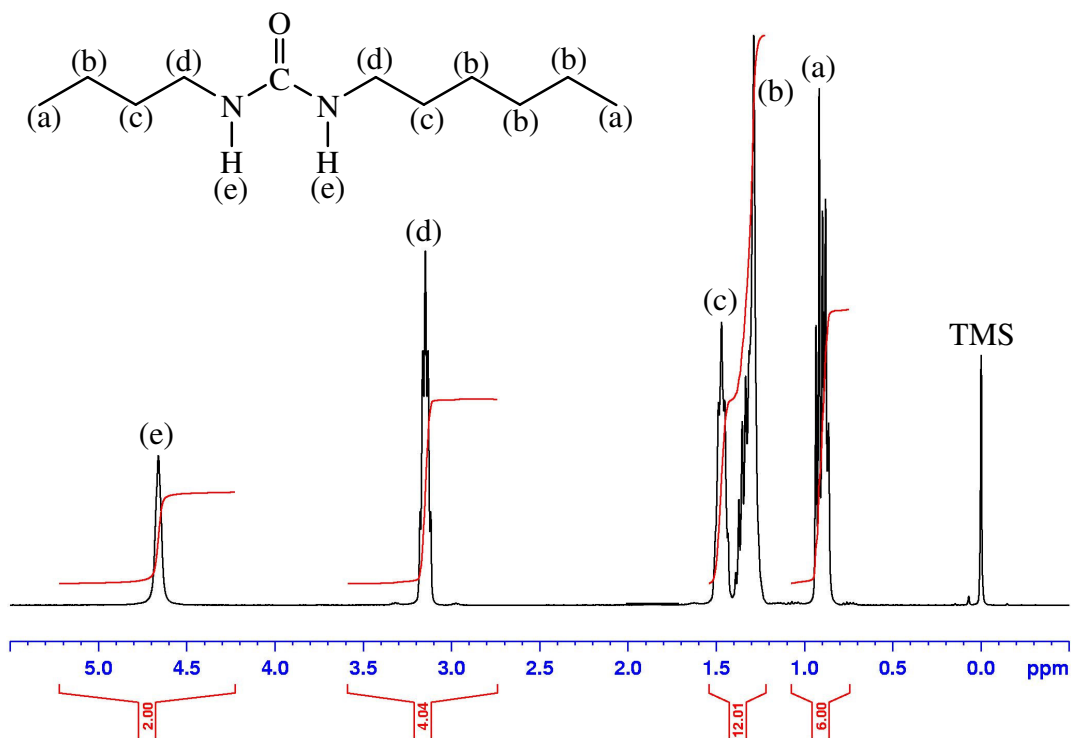


Figure 9 : Spectre RMN ^1H de la 1-butyl-3-héxylurée dans CDCl_3 .

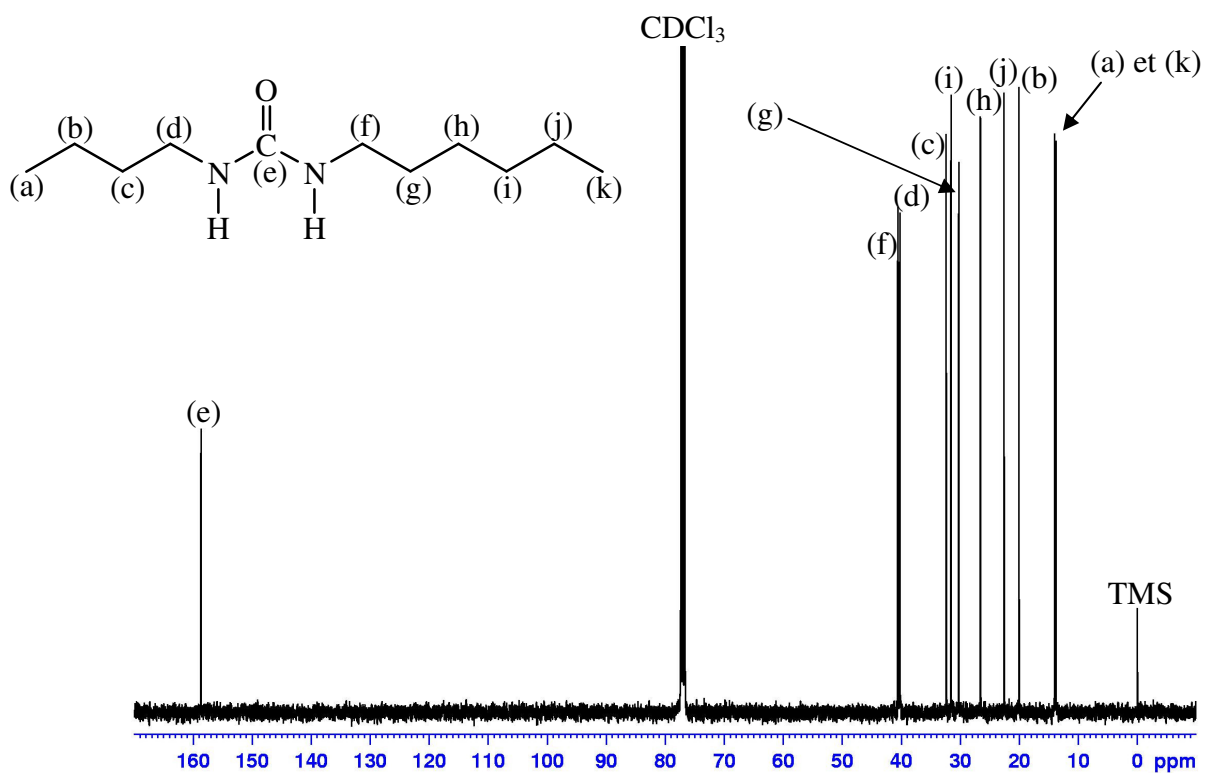


Figure 10 : Spectre RMN ^{13}C de la 1-butyl-3-héxylurée dans CDCl_3 .

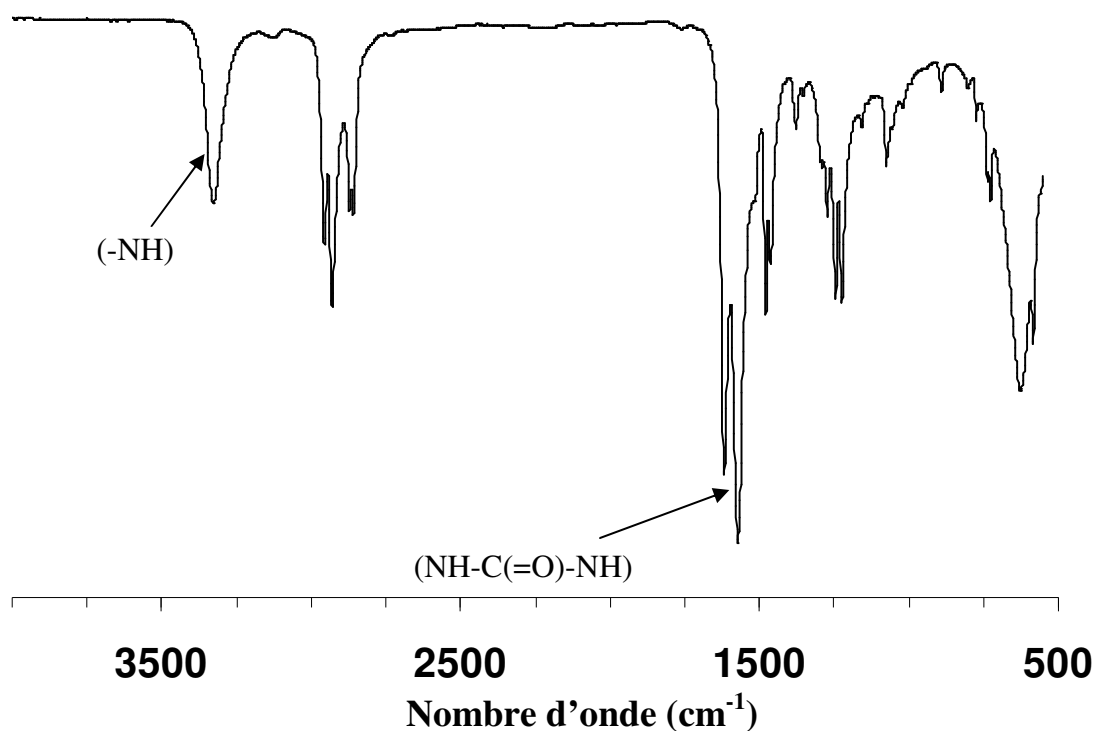


Figure 11 : Spectre IR-TF de la 1-butyl-3-hexylurée.

3. Protection de l'IEM par HBSNa

La protection de l'isocyanate de n-butyle par HBSNa ayant été démontrée ainsi que sa réactivité avec une amine, l'adaptation de cette protection a été menée pour l'IEM.

a. Synthèse et caractérisation du 4((méthacryloyloxy)éthyl)carbamoyl-benzènesulfonate de sodium (IEMPhSO₃⁻)

La synthèse de l'IEMPhSO₃⁻ (cf. Schéma 23) a été effectuée en suivant le protocole utilisé précédemment pour le BuPhSO₃⁻. Le produit, après purification et séchage, se présente sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 78 % (en admettant, ce qui s'avèrera correct, que l'adduit est parfaitement pur). Pour rappel, dans les mêmes conditions, le rendement de la protection dans le cas de l'isocyanate de n-butyle est de 34 %, avec une contamination importante en HBSNa.

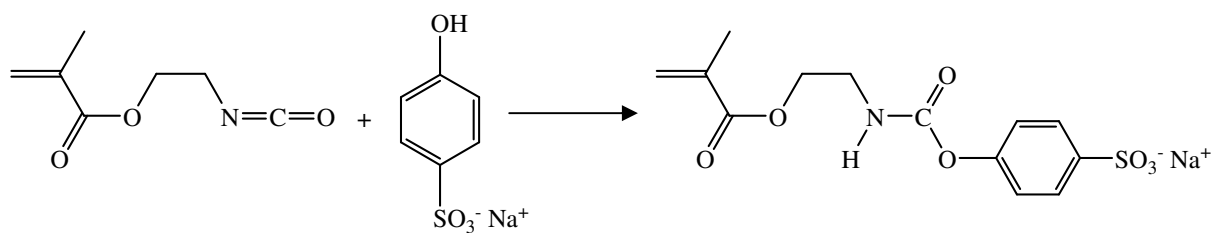


Schéma 23 : Synthèse du 4-((méthacryloyloxy)éthyl)carbamoylbenzènesulfonate de sodium.

Le produit a été caractérisé par spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C (cf. Figure 12 et Figure 13).

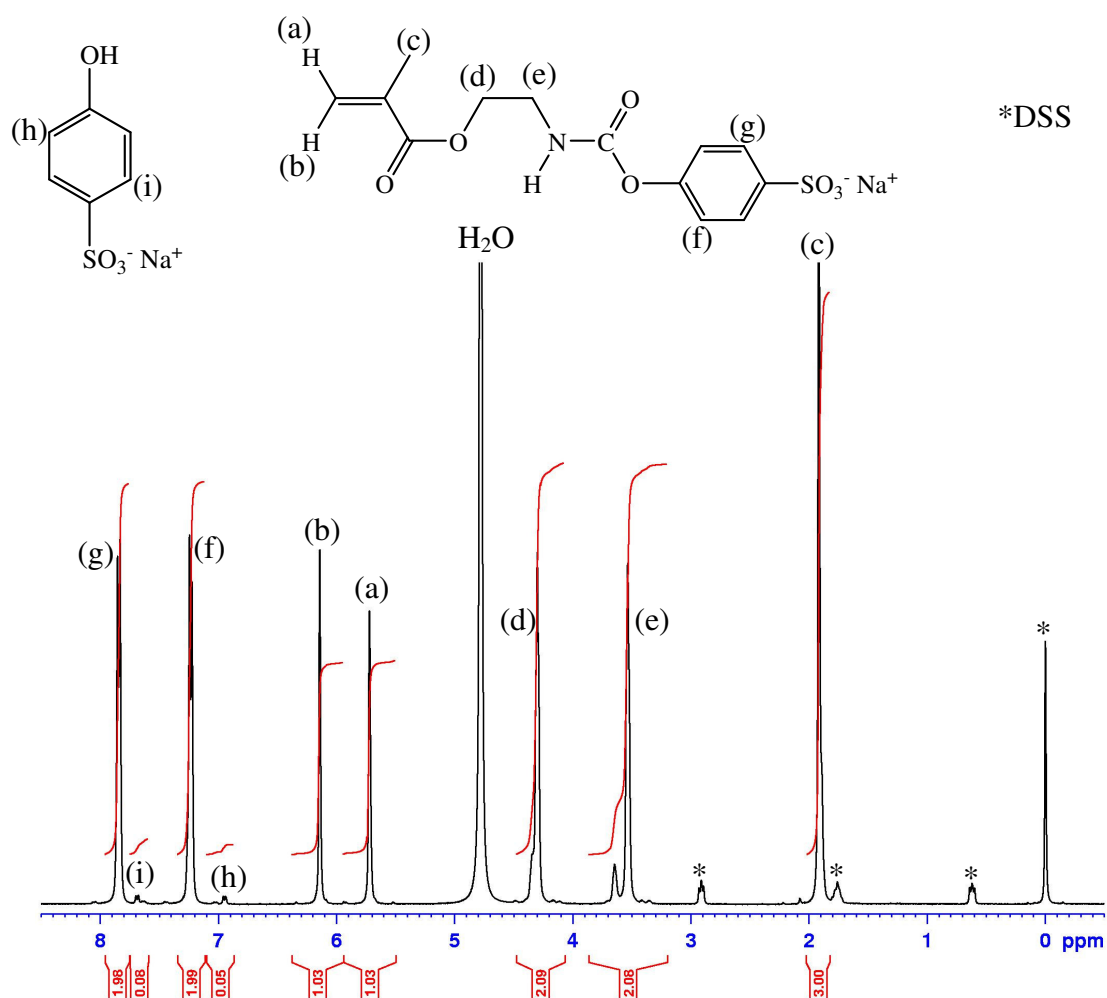


Figure 12 : Spectre RMN ^1H du 4-((méthacryloyloxy)éthyl)carbamoylbenzènesulfonate de sodium dans D_2O .

Le caractère hydrosoluble a pu être vérifié simplement en effectuant les analyses par spectroscopie RMN dans D_2O ; les échantillons sont parfaitement limpides. Le spectre RMN ^1H permet de retrouver l'ensemble des déplacements chimiques attendus pour ce composé, notamment les signaux à 5,72 et 6,14 ppm correspondant aux deux protons vinyliques de la

fonction méthacrylate. Par ailleurs, comme dans le cas de BuPhSO_3^- , deux signaux à 7,25 et 7,85 ppm correspondant aux protons aromatiques du produit formé sont présents. L'intensité des pics correspondant au HBSNa résiduel est très faible ($> 2\%$). La pureté du produit, déterminée en utilisant l'équation (Eq 1), est de 98%. Il faut noter, comme nous l'établirons plus loin, que l'intensité, très faible, des pics de HBSNa rend compte d'une instabilité de l'IEMPhSO₃⁻ dans D₂O qui sera discutée plus en détails par la suite. L'intervalle de temps, inévitable, entre la préparation de l'échantillon et son analyse, permet une hydrolyse suffisante de l'adduit. Celle-ci se traduit par l'observation spectroscopique d'une faible quantité de produit de dégradation. L'analyse élémentaire [C = 44,45 % (C_{théo} = 44,37 %) ; H = 4,00 % (H_{théo} = 4,02 %) ; N = 3,79 % (N_{théo} = 3,99 %) ; S = 8,87 % (S_{théo} = 9,13%)] excellente d'un échantillon préservé de tout contact avec l'eau confirme la pureté du composé.

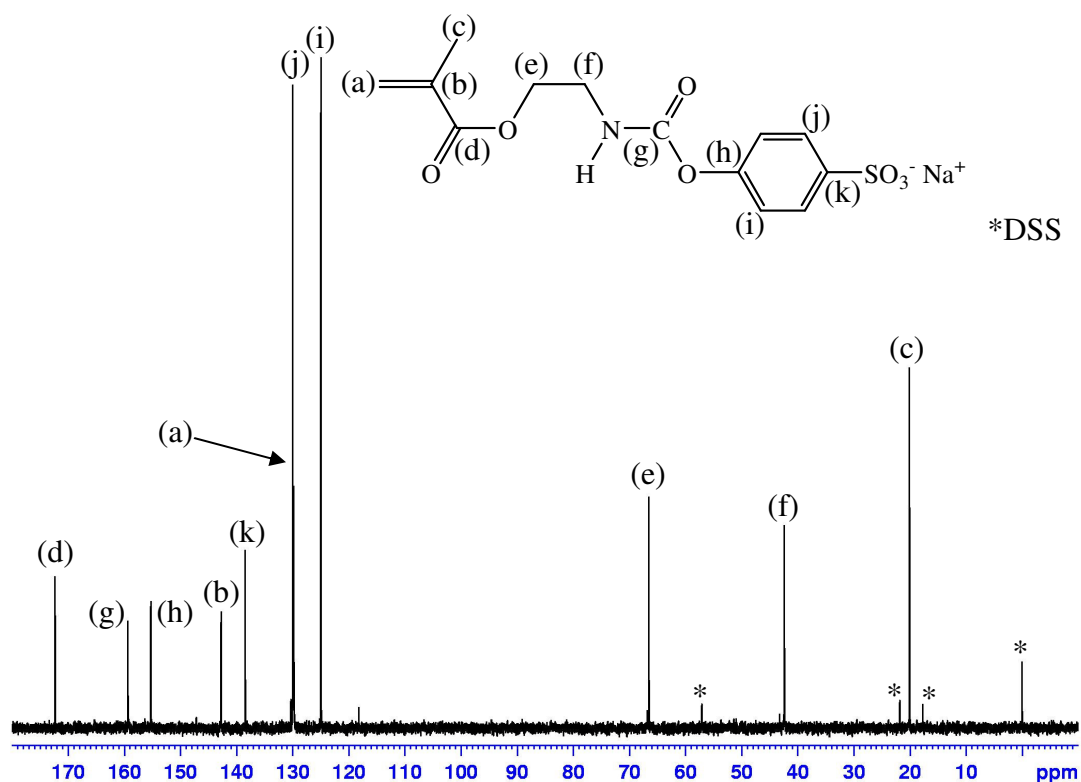


Figure 13 : Spectre RMN ¹³C du 4-(méthacryloyloxy)éthylcarbamoylbenzènesulfonate de sodium dans D₂O.

Le spectre RMN ¹³C montre, outre les déplacements chimiques pour la partie méthacrylique, les pics des carbones aromatiques (h, i, j et k) correspondant au produit de couplage de HBSNa et de l'IEM. Le signal correspondant à la fonction uréthane se retrouve,

comme dans le cas de BuPhSO_3^- , à 159,3 ppm. L'attribution des signaux (a) et (j) a pu être obtenue à l'aide d'un spectre RMN ^{13}C "avec amélioration de la non distorsion par transfert de polarisation" (DEPT 135) (cf. Figure 14). Ce type d'analyse permet de séparer les carbones primaires et tertiaires d'un côté de la ligne de base et les carbones secondaires de l'autre côté de cette ligne de base, tout en supprimant les signaux correspondant aux carbones quaternaires. Cette analyse a permis de retrouver deux signaux distincts pour les carbones (a) et (j) vers 129 ppm.

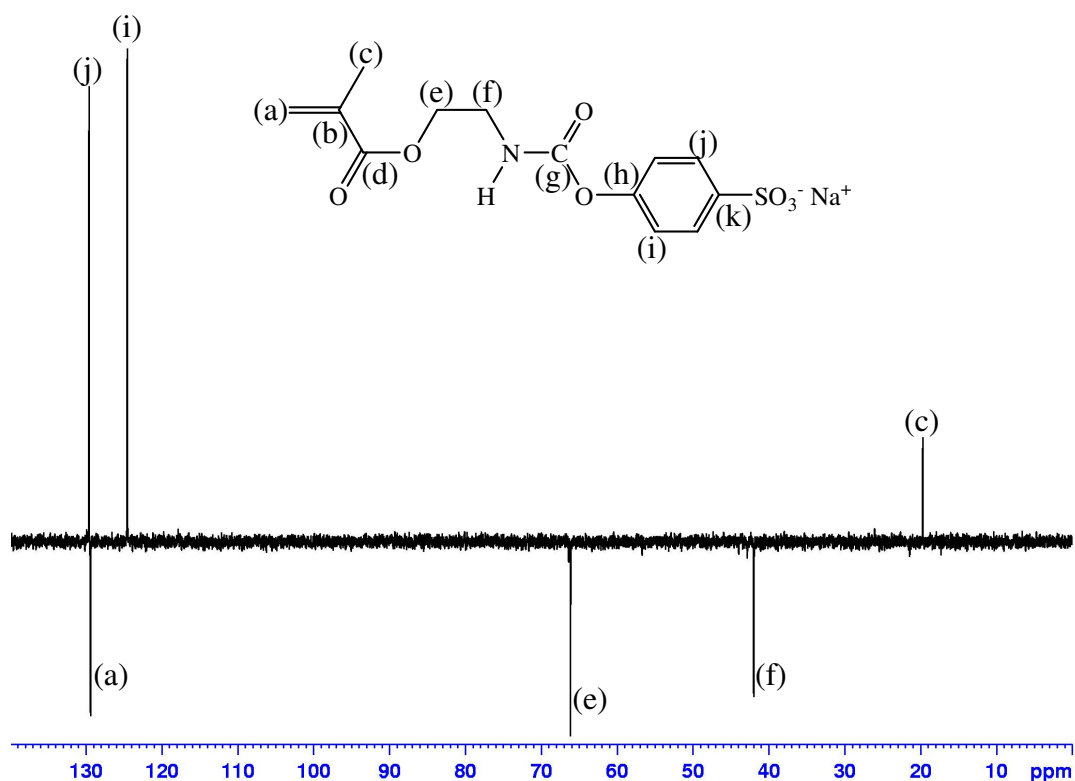


Figure 14 : Spectre RMN ^{13}C DEPT 135 du 4-((méthacryloyloxy)éthyl)carbamoylbenzènesulfonate de sodium dans D_2O .

Enfin, le produit a été caractérisé par spectroscopie IR-TF (cf. Figure 15). Cette dernière analyse confirme la présence de la liaison vinylique avec la présence d'une bande à 1640 cm^{-1} . Les fonctions carbonyles se retrouvent avec les bandes à 1700 et 1715 cm^{-1} .

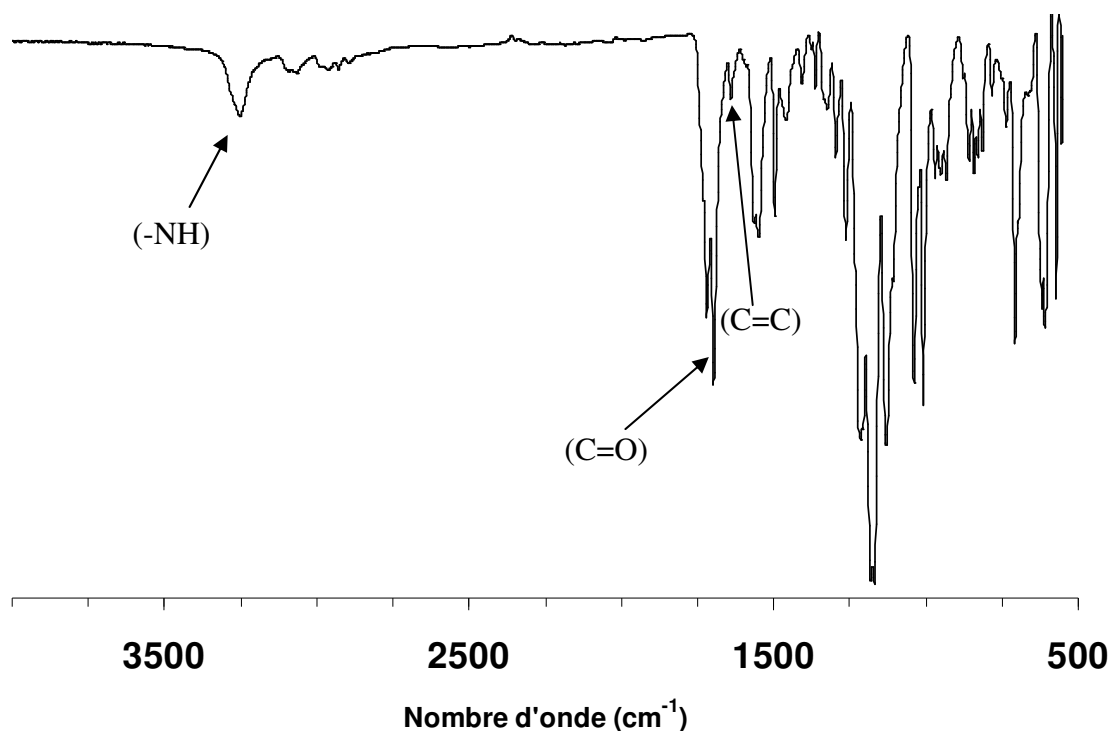


Figure 15 : Spectre IR-TF du 4-((méthacryloyloxy)éthyl)carbamoylbenzènesulfonate de sodium.

b. *Stabilité de l'IEMPhSO₃⁻*

La stabilité de l'IEMPhSO₃⁻ en phase aqueuse a été étudiée en enregistrant régulièrement des spectres RMN ¹H d'un échantillon préparé à partir de 32 mg d'IEMPhSO₃⁻ dissous dans 0,5 mL de D₂O. La Figure 16 présente une superposition de spectres RMN ¹H de cet échantillon dans la zone des protons aromatiques. L'intensité des signaux propres à l'IEMPhSO₃⁻ à 7,25 et 7,85 ppm diminue au cours du temps, alors que ceux propres à HBSNa à 6,95 et 7,71 ppm augmentent, démontrant que l'IEMPhSO₃⁻ est effectivement consommé lorsqu'il est conservé dans l'eau. Cette consommation peut être expliquée par une première étape de réaction de la fonction isocyanate bloquée avec l'eau, avec libération de HBSNa, selon le Schéma 24 (i) ci-dessous. Le composé ainsi formé, peu stable thermiquement, décarboxyle pour former l'amine correspondante (cf. Schéma 24 (ii)) susceptible, dans une seconde étape, de réagir à son tour avec l'IEMPhSO₃⁻. Cette dernière réaction mène à la formation d'un composé bis(méthacryloyl)-urée (cf. Schéma 24 (iii)).

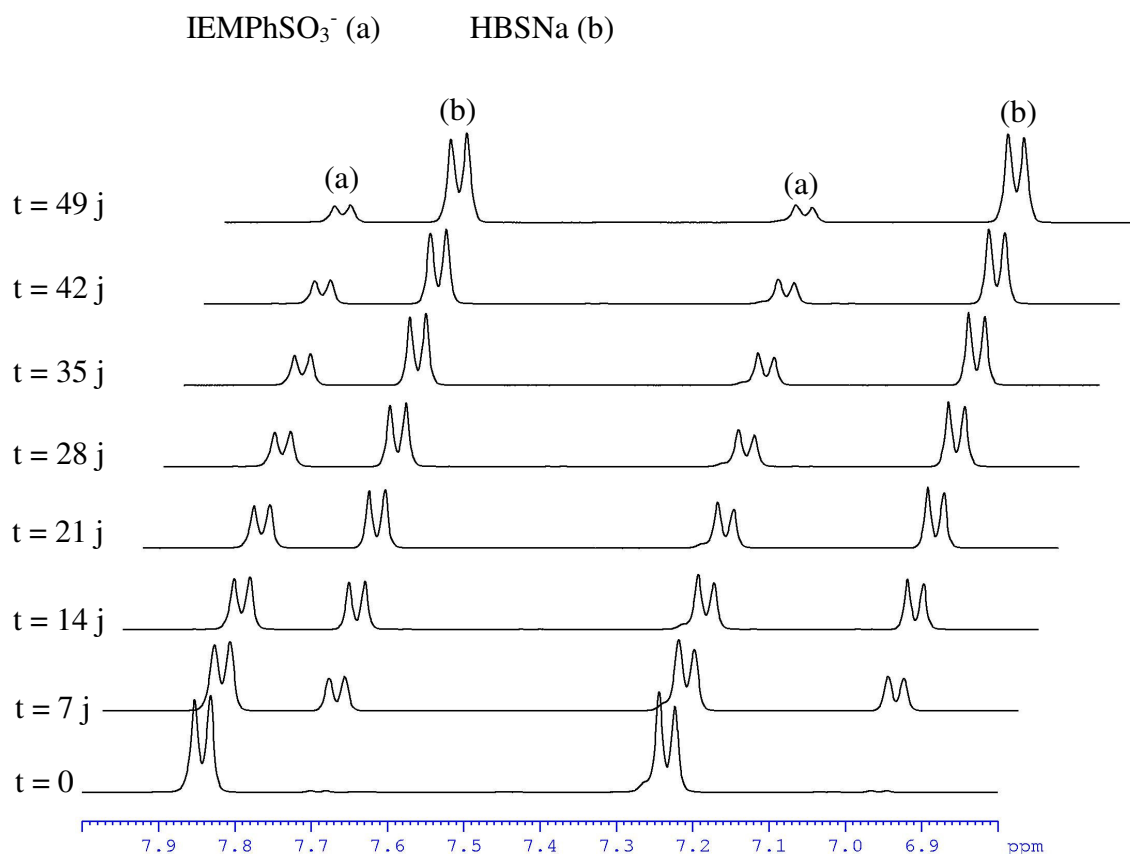


Figure 16 : Superposition de spectres RMN ^1H d'un échantillon de l'IEMPhSO $_3^-$ dans la zone des aromatiques.

Afin de pouvoir rendre compte, de manière quantitative, de l'évolution cinétique de la réaction, l'équation suivante peut être utilisée:

$$\frac{I_{6,95}}{I_{6,95} + I_{7,25}} = f(t)$$

où $I_{6,95}$ et $I_{7,25}$ représentent les intégrations des deux protons en position méta de la fonction sulfonate, respectivement associé au HBSNa et à l'IEMPhSO $_3^-$. Il apparaît que la courbe d'évolution cinétique, représentée à la Figure 17, ne peut être décrite ni par un ordre un, ni par un ordre deux par rapport à IEMPhSO $_3^-$. 50 % de l'IEMPhSO $_3^-$ a été consommé en 17 jours, mais moins de 3 % en 5 h, indiquant qu'à l'échelle de temps de polymérisation radicalaire "classique" seule une petite quantité s'est hydrolysée. Cette conclusion est particulièrement intéressante car (a) la présence d'HBSNa provenant de l'hydrolyse de l'IEMPhSO $_3^-$ pourrait conduire au cours d'un processus radicalaire à des réactions de transfert d'hydrogène du phénol, et (b) la formation d'urée de type bis(méthacrylique) pourrait mener à la formation de

chaînes pendantes méthacryliques, elles mêmes susceptibles de réagir avec une chaîne en propagation pour mener par pontage à un système réticulé.

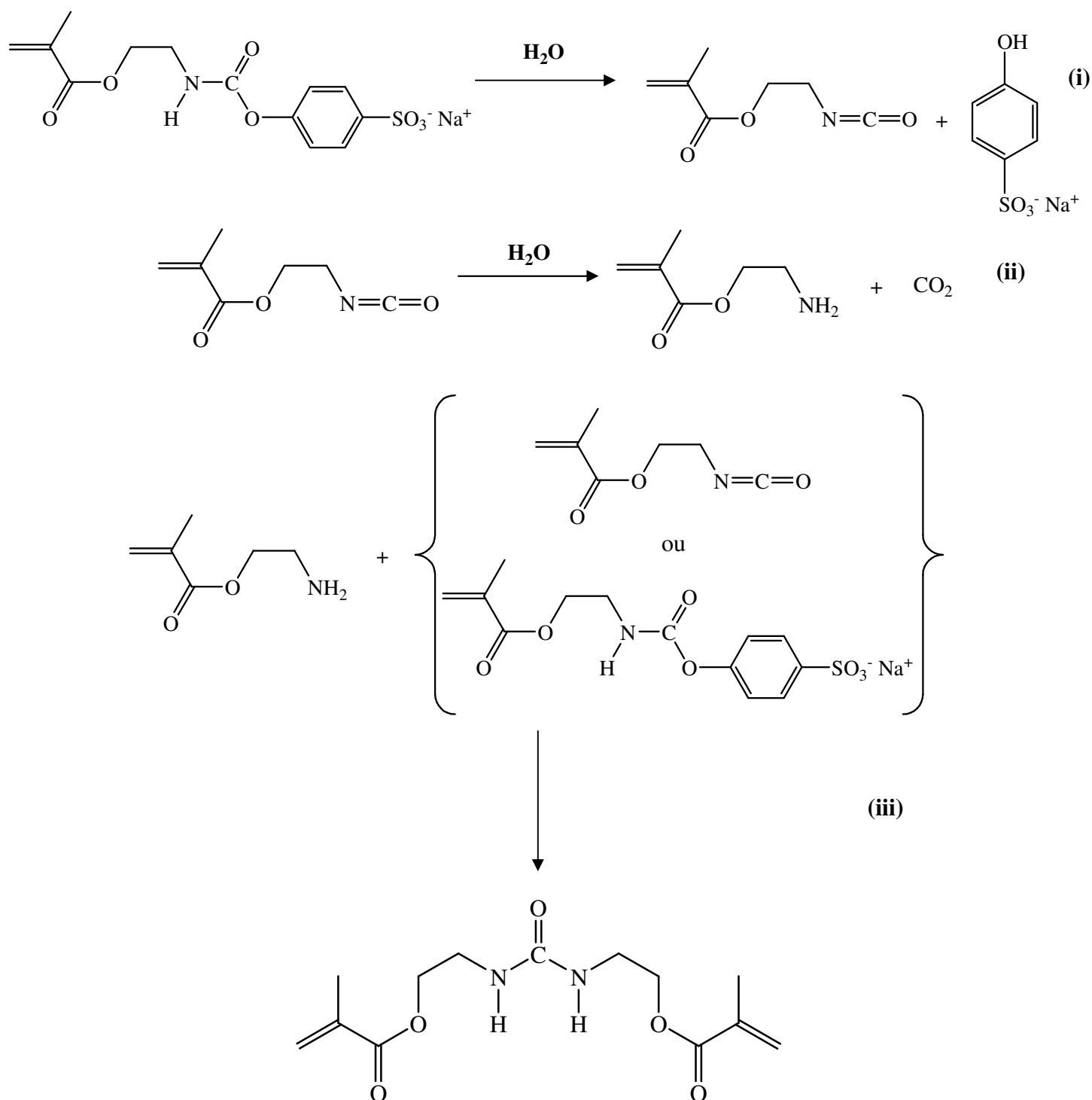


Schéma 24 : Mécanisme d'hydrolyse de l'IEMPhSO₃⁻ dans l'eau.

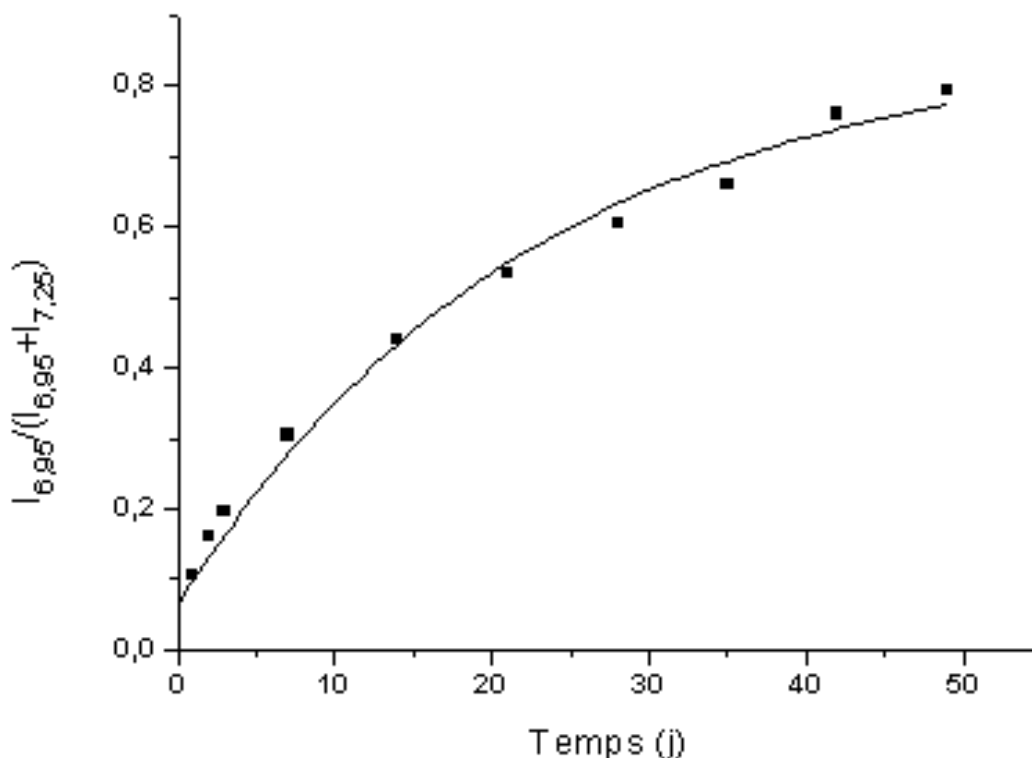


Figure 17 : Evolution cinétique de l'apparition de HBSNa provenant de l'instabilité de l'IEMPhSO₃⁻ dans D₂O.

c. *Variation des conditions de synthèse de l'IEMPhSO₃⁻*

Divers paramètres expérimentaux tels que le temps de réaction et le solvant ont été modifiés afin d'observer leur influence sur la synthèse de l'IEMPhSO₃⁻ ; l'ensemble de ces résultats sont regroupés dans le Tableau 3. L'influence du temps de réaction a tout d'abord été étudiée en respectant la stœchiométrie de la réaction (1 équivalent de chacun des réactifs). La synthèse a été menée pour des temps de réaction compris entre 5 minutes et 3 heures (expériences 1 à 7) : sur base de ces données, le rendement de la réaction atteint sa valeur maximale (78 %) après une heure de réaction. Le rapport des intégrations des protons de HBSNa et de l'IEMPhSO₃⁻ chute d'abord, ce qui est logique à taux de conversion faible ; il reste ensuite relativement constant, à partir d'un temps de réaction d'environ 15 minutes. Le meilleur compromis entre temps de réaction, rendement et pureté est obtenu pour l'expérience 5, soit une heure de réaction.

#	t (min)	Solvant	Rendement isolé (%)	Rapport [$I_{6,95} / I_{7,25}$]*
1	5	H ₂ O	4	2,6
2	10	H ₂ O	55	0,35
3	15	H ₂ O	67	0,035
4	30	H ₂ O	76	0,041
5	60	H ₂ O	78	0,035
6	120	H ₂ O	77	0,030
7	180	H ₂ O	63	0,066
8	15	DMSO	80	0,114
9	180	DMSO	80	0,396

Tableau 3 : Protection de l'IEM : influence du temps de réaction et du solvant ($n_{\text{IEM}} = 7 \text{ mmol}$, $n_{\text{HBSNa}} = 7 \text{ mmol}$, $V_{\text{Solvant}} = 7 \text{ mL}$, * intégrations mesurées par RMN ¹H immédiatement après dissolution du produit dans D₂O)

Des expériences ont également été menées dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) (expériences 8 et 9), car, à la concentration de travail de HBSNa (1 mol.L⁻¹), la solution de HBSNa dans le DMSO est parfaitement limpide avant ajout de l'IEM alors que dans l'eau, dans ces conditions, HBSNa n'est pas complètement dissous. Le rendement est plus important que pour les expériences correspondantes dans l'eau (expériences 3 et 7), cependant les produits formés sont moins purs que pour les expériences menées dans l'eau.

L'influence du rapport stœchiométrique entre l'IEM et HBSNa a également été étudiée. Les résultats issus de la modification du rapport stœchiométrique sont regroupés dans le Tableau 4. Une quantité de HBSNa comprise entre 0,75 et 1,00 équivalent par rapport à l'IEM ne modifie que très légèrement le rendement de la réaction puisque celui passe de 73 à 78 % (expériences 1 à 4). Un défaut de HBSNa de moitié par rapport à l'IEM diminue par contre de manière importante le rendement : 28 % (expérience 5).

La pureté du produit de synthèse a été estimée à partir du rapport des intégrations de protons aromatiques de HBSNa à 6,95 ppm et de protons de l'IEMPhSO₃⁻ à 7,25 ppm provenant des spectres RMN ¹H des échantillons dans le D₂O. Il apparaît que ce rapport n'est que faiblement influencé par le rapport stœchiométrique des réactifs, les valeurs étant comprises entre 0,015 et 0,035.

#	Equivalent HBSNa par rapport à l'IEM	Rendement par rapport à HBSNa (%)	Rapport [I _{6,95} / I _{7,25}]*
1	1	78	0,035
2	0,95	73	0,025
3	0,8	73	0,015
4	0,75	73	0,020
5	0,5	28	0,031

Tableau 4 : Protection de l'IEM avec HBSNa : influence du rapport stœchiométrique des réactifs (temps = 1 h, n_{IEM} = 7 mmol, V_{H2O} = 7 mL, * intégrations mesurées par RMN ¹H immédiatement après dissolution du produit dans D₂O).

Dans la suite de cet exposé, les conditions expérimentales de synthèse de l'IEMPhSO₃⁻ correspondront toujours à un rapport molaire de 1 équivalent d'IEM pour 0,8 équivalent de HBSNa, dans l'eau, et pour un temps de réaction d'une heure.

d. *Utilisation d'un autre agent potentiel de blocage*

L'utilisation de 2-hydroxyéthanesulfonate de sodium (HESNa) à la place de HBSNa (cf. Schéma 25 réaction (i)) a été envisagée afin d'obtenir un monomère plus stable vis-à-vis de l'eau (ne garantissant pas la réactivité de la fonction uréthane formée vis-à-vis d'amines aliphatiques). La synthèse a été menée pour un temps de réaction de deux heures. Un solide blanc précipite dans l'eau au cours de la synthèse. Le filtrat a été précipité dans l'acétone pour conduire à la formation d'un composé blanc. Les deux fractions ont été séchées et analysées par spectroscopie RMN.

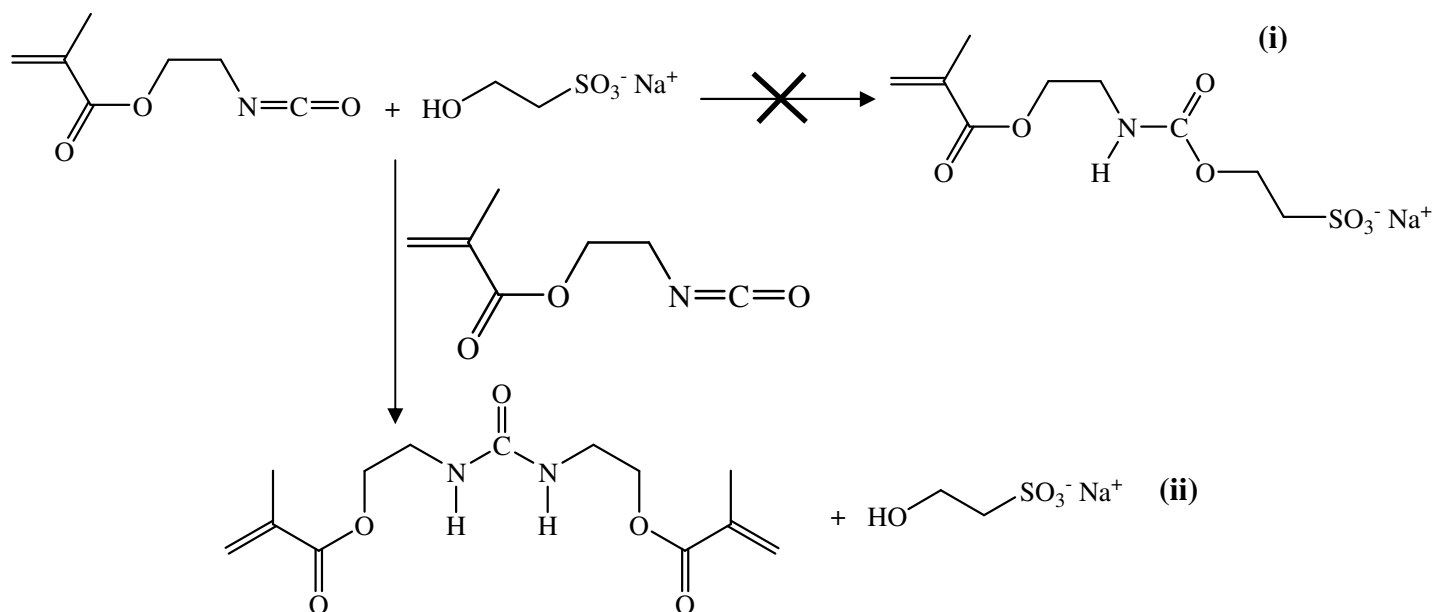


Schéma 25 : Réaction entre l'IEM et HESNa.

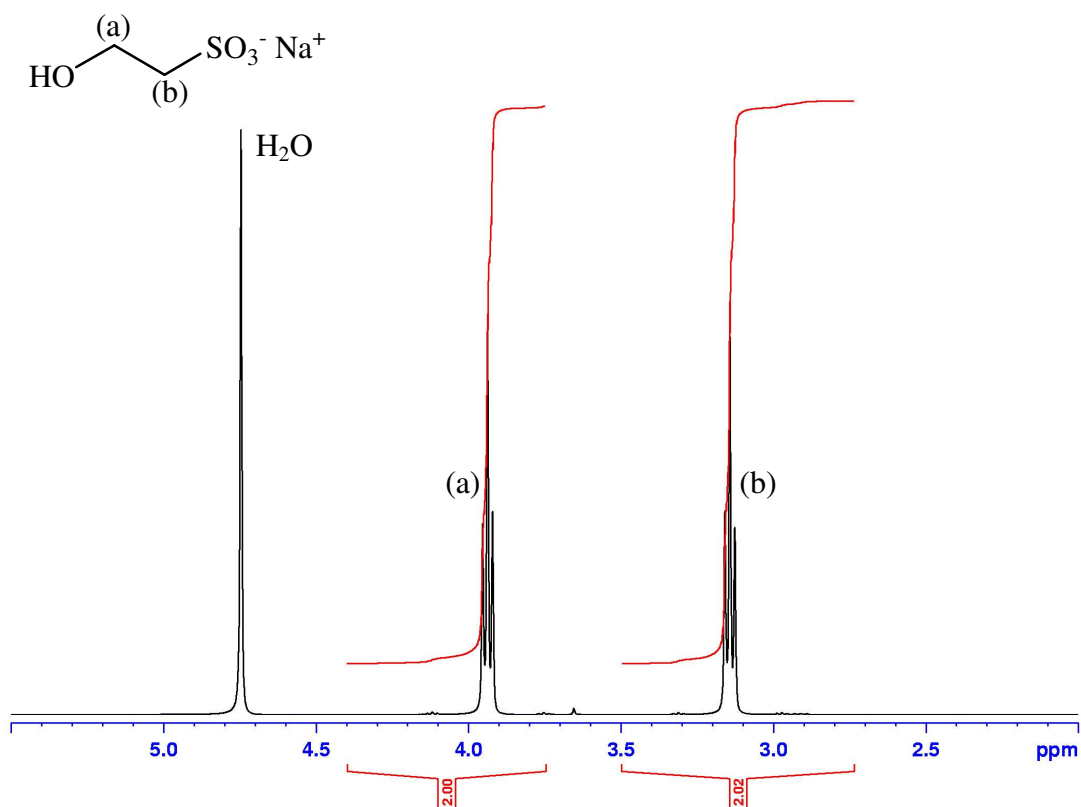


Figure 18 : Spectre RMN ¹H du 2-hydroxyéthanesulfonate de sodium dans D₂O.

La Figure 18 présente le spectre RMN ¹H du solide blanc issu de la précipitation dans l'acétone. Le spectre correspond exactement au spectre de HESNa. Les Figure 19 et 20

présentent les spectres RMN ^1H et ^{13}C du solide ayant précipité durant la synthèse et étant donc insoluble dans l'eau. Le spectre RMN ^1H montre que ce produit correspond au composé bis(méthacryloyl)-urée décrit précédemment (cf. paragraphe B.I). Le spectre RMN ^{13}C confirme cette structure (cf. Figure 20). Cette expérience montre que la protection de l'IEM dans les conditions utilisées avec HBSNa ne conduit pas à l'obtention d'un monomère protégé mais à la formation du composé bis(méthacryloyl)-urée (cf. Schéma 25 réaction (ii)). Elle indique que dans l'eau, la réaction d'un alcool aliphatique n'est pas compétitive avec la réaction de l'eau comme nucléophile. La littérature décrit de nombreux exemples de réactions d'addition d'alcools aliphatiques sur des isocyanates aliphatiques dans des solvants organiques ; nous n'avons pas trouvé d'exemples de réaction dans l'eau.

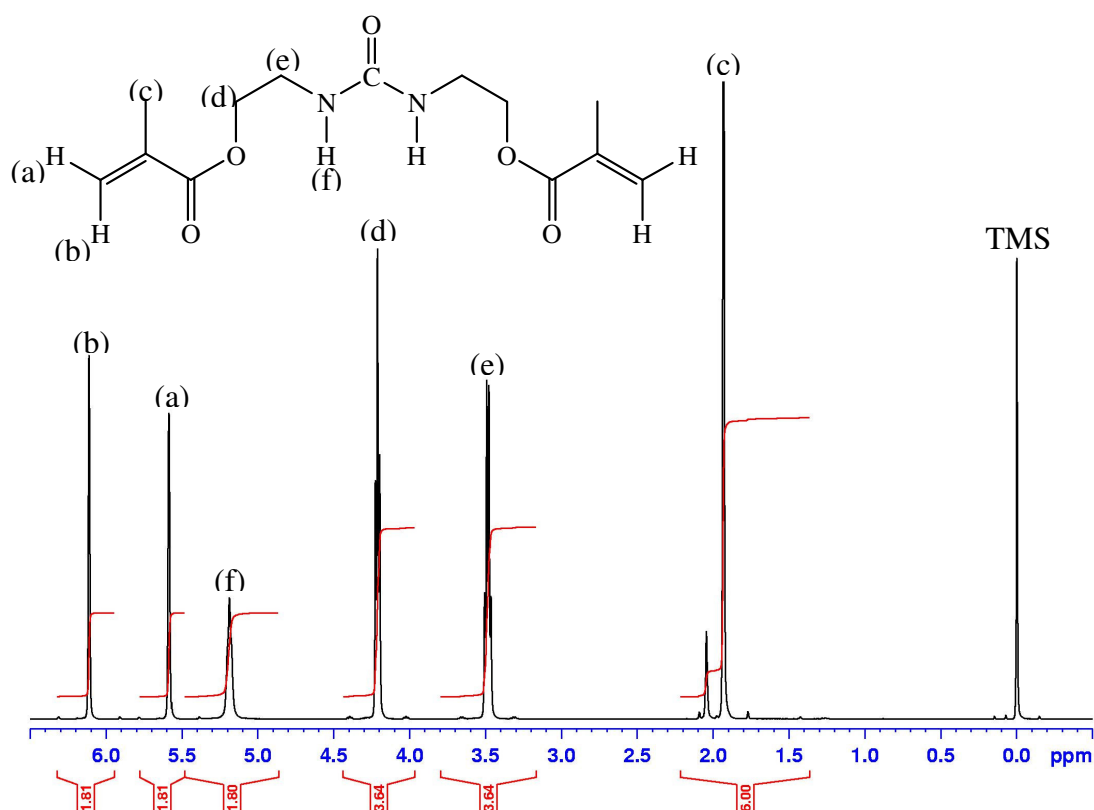


Figure 19 : Spectre RMN ^1H du composé bisméthacrylate urée dans CDCl_3 .

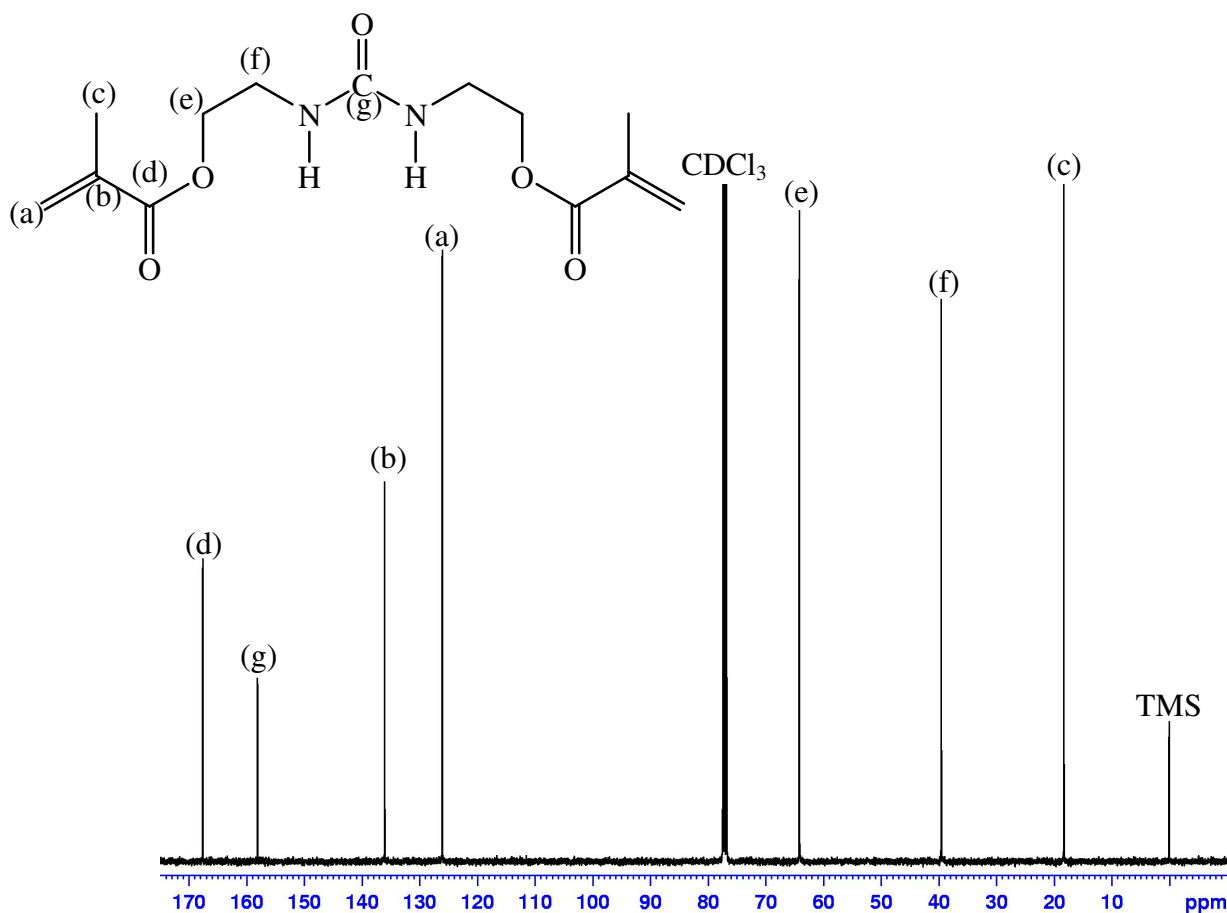


Figure 20 : Spectre RMN ^{13}C du composé bisméthacrylate urée dans CDCl_3 .

III. Polymérisation de l'IEMPhSO $_3^-$ et réactivité du polymère formé vis-à-vis d'une amine aliphatique

1. Polymérisation de l'IEMPhSO $_3^-$

La protection de l'IEM à l'aide de HBSNa ayant permis d'obtenir, avec un bon rendement, le composé IEMPhSO $_3^-$ très pur, la polymérisation radicalaire du monomère dans l'eau a été envisagée malgré le risque potentiel de voir le produit d'hydrolyse HBSNa, un phénol, agir comme agent de transfert lors de la polymérisation et de limiter les masses molaires (cf. Schéma 26). Une solution contenant le monomère et du persulfate de potassium, en tant qu'amorceur (10 % en masse par rapport au monomère) dans de l'eau désionisée a été maintenue sous agitation à température ambiante avec un bullage d'argon pendant 30 minutes, puis dans un bain d'huile à 60°C pendant 90 minutes. La solution étant relativement

visqueuse à l'issue des 90 minutes, elle a été diluée par un ajout d'eau désionisée. Le polymère a ensuite été récupéré par précipitation dans l'éthanol puis filtration. Après séchage sous vide mécanique une nuit à 50°C, la conversion en monomère, déterminée par gravimétrie, est de 40 %.

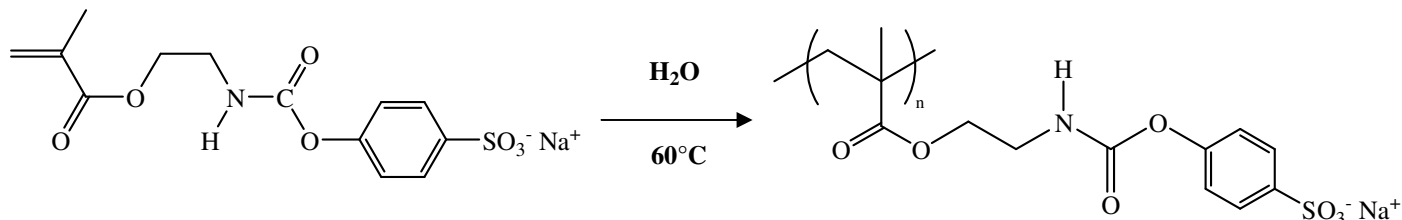


Schéma 26 : Polymérisation radicalaire de l'IEMPhSO₃⁻ dans l'eau.

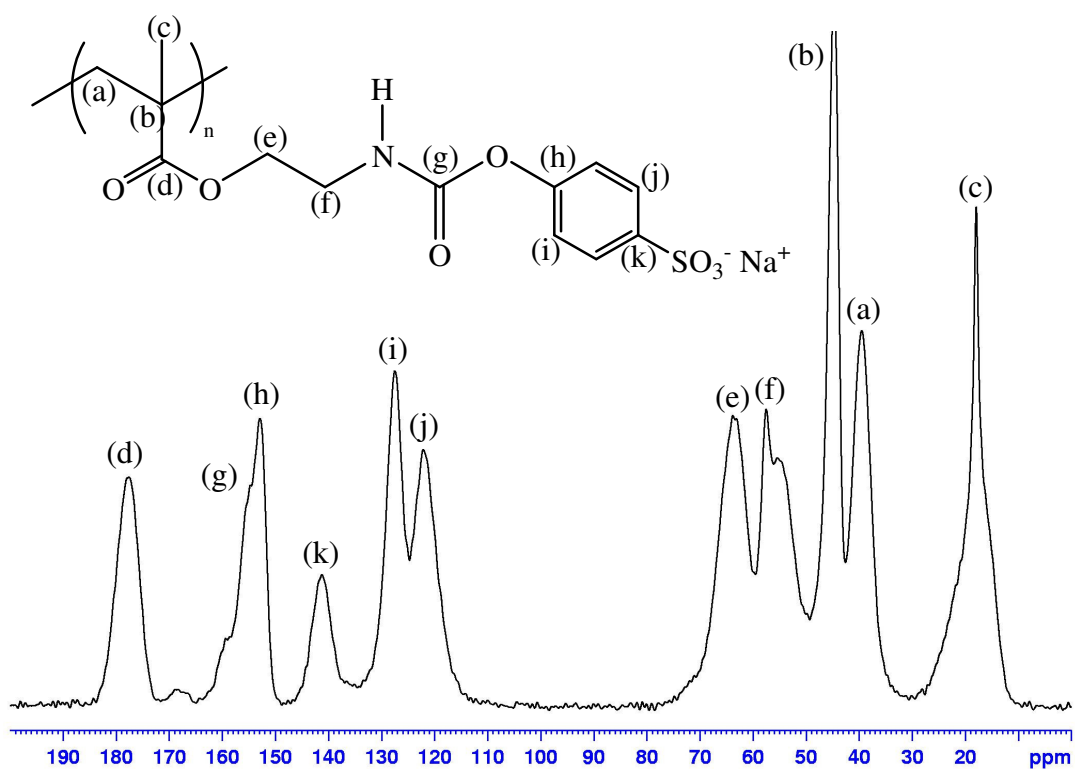


Figure 21 Spectre RMN ¹³C à l'état solide du poly(IEMPhSO₃⁻).

Alors que la spectroscopie RMN en solution est largement utilisée pour analyser les polymères, les polyélectrolytes posent quelques problèmes particuliers. La gamme de concentrations nécessaires pour obtenir un bon rapport signal/bruit mènent généralement à des solutions très visqueuses. Dans notre cas, la resolubilisation difficile du polyélectrolyte dans l'eau empêche de caractériser le polymère par spectroscopie RMN en solution ; le recours à la spectroscopie RMN ¹³C à l'état solide s'est donc avéré nécessaire. Pour effectuer cette

analyse, l'échantillon sec a été broyé afin d'obtenir une fine poudre. La Figure 21 présente le spectre RMN ^{13}C à l'état solide du poly(IEMPhSO $_3^-$). Ce spectre est compatible avec la structure proposée ; on identifie l'ensemble des carbones et notamment celui de la fonction uréthane -NH-C(=O)-O- vers 155 ppm, ainsi que les différents carbones aromatiques avec d'une part, à 122 et 128 ppm, les deux carbones tertiaires et d'autre part, à 141 et 153 ppm, les deux carbones quaternaires.

La caractérisation des masses molaires relatives pour ce polymère n'a pu être réalisée par chromatographie d'exclusion stérique, le laboratoire ne disposant pas de colonne pour l'analyse des polyélectrolytes.

2. Réactivité du poly(IEMPhSO $_3^-$) vis-à-vis d'une amine

La réactivité du poly(IEMPhSO $_3^-$) a été étudiée par analogie avec notre étude précédente sur le composé modèle BuPhSO $_3^-$. Pour cela, le polymère a été ajouté à un excès de n-butylamine (3 équivalents) dans de l'eau désionisée sous agitation à température ambiante (cf. Schéma 27). Après 3 jours, la solution a été filtrée et la fraction solide a été séchée. La solubilisation du polymère n'ayant pu être obtenue dans des solvants tels que l'acétone, le méthanol, le chloroforme, le diméthylsulfoxyde ou l'eau, le polymère a également été caractérisé par spectroscopie RMN ^{13}C à l'état solide (cf. Figure 22).

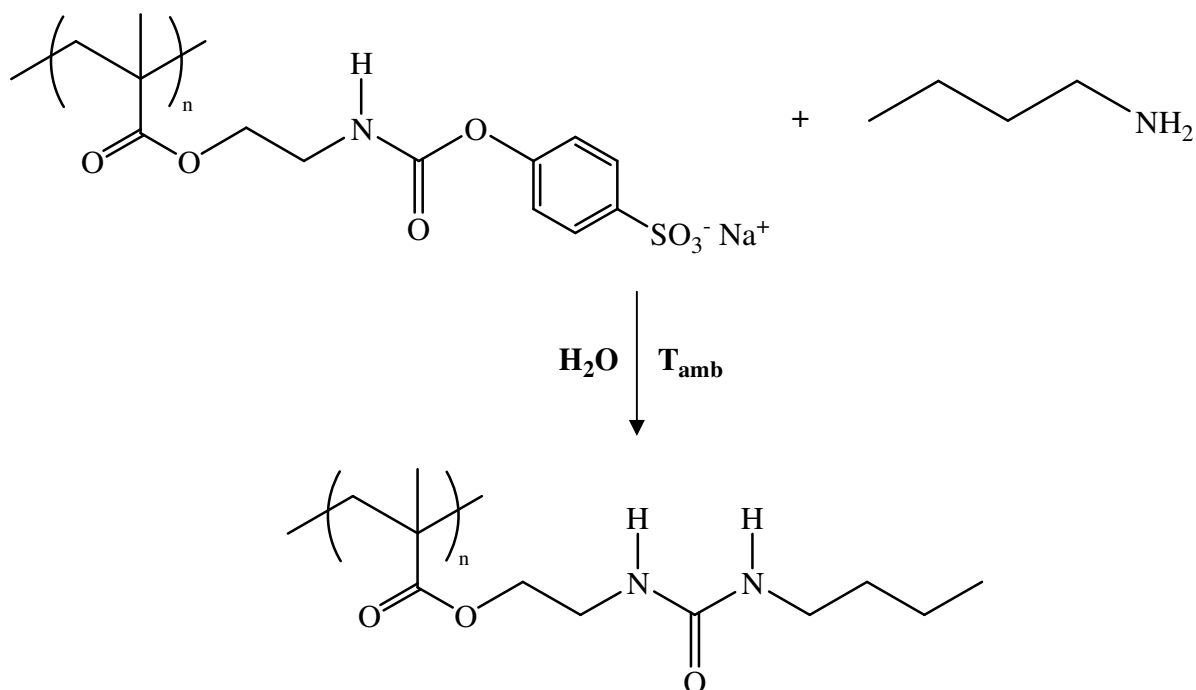


Schéma 27 : Réaction du poly(IEMPhSO $_3^-$) avec la n-butylamine

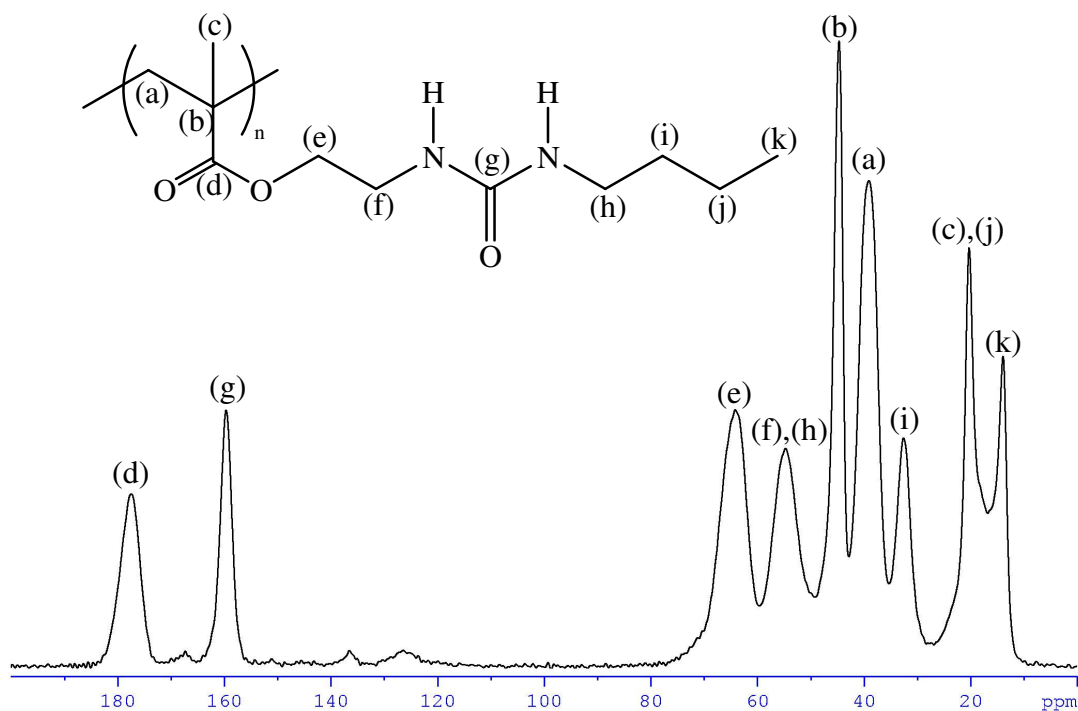


Figure 22 : Spectre RMN ^{13}C à l'état solide du poly(IEMPhSO $_3^-$) après réaction avec la n-butylamine.

Ce spectre montre l'ensemble des signaux que l'on peut attribuer aux carbones de (a) à (f) déjà présents sur le spectre du polymère avant modification. Suite à l'addition de la n-butylamine sur le polymère, les déplacements chimiques des carbones aromatiques du poly(IEMPhSO $_3^-$) ont disparu : massif entre 110 et 130 ppm ((i) et (j)), pics à 142 ppm (k) et à 153 ppm (h) sur la Figure 21, ainsi que le pic à 155 ppm correspondant au carbone de la fonction uréthane. De nouveaux pics apparaissent dans la zone des carbones alkyle et surtout un pic significatif à 160 ppm correspondant au déplacement chimique attendu pour le carbone d'une fonction urée -NH-C(=O)-NH-. L'ensemble de ces informations spectroscopiques est donc tout à fait compatible avec la structure attendue et un remplacement significatif des fonctions réactives isocyanate bloqué par des fonctions urée. Le fait que cette urée est bien celle attendue, c'est-à-dire -NH-C(=O)-NH-Bu, et non pas une urée résultant de l'hydrolyse de la fonction isocyanate bloqué, est soutenu par la présence de signaux importants correspondant au groupement n-butyle introduit. Une analyse quantitative n'est pas possible sur base du spectre enregistré, mais il est évident que l'intensité de ces signaux n'est compatible qu'avec une proportion importante d'urée sous forme n-butylurée.

Lors des essais décrits ci-dessus, une faible fraction de polymère insoluble est toujours présente. Une partie de cette fraction insoluble résulte de la redissolution difficile du

poly(IEMPhSO₃⁻) déjà évoquée précédemment, mais il n'est pas impossible qu'une autre fraction résulte de solubilité limitée du copolymère formé et de la précipitation partielle de celui-ci au fur et à mesure que les fonctions chargées sont remplacées par des fonctions urée neutres. Afin de déterminer la solubilité de la polyurée dans l'eau sans ambiguïté, une modification du protocole d'addition de la n-butylamine a été envisagée. Le monomère IEMPhSO₃⁻ a été polymérisé comme décrit précédemment, puis après 90 minutes, 3 équivalents de n-butylamine ont été ajoutés à la solution en supprimant le chauffage. La solution, parfaitement limpide avant cette addition, se trouble quasiment instantanément pour former un précipité blanc. Après filtration de ce précipité et séchage, celui-ci a été caractérisé par spectroscopie RMN ¹³C à l'état solide ; le spectre obtenu est identique à celui décrit à la Figure 22. L'espèce formée est donc bien un polymère dans lequel une fraction très significative des fonctions isocyanate bloqué a été remplacée par des fonctions n-butylurée. Ce résultat suggère que la turbidité de la solution observée lors de la modification du poly(IEMPhSO₃⁻) selon nos conditions initiales est le reflet conjugué de la difficile resolubilisation du poly(IEMPhSO₃⁻) dans l'eau ainsi que de l'insolubilité du polymère modifié à taux de conversion élevé.

3. Conclusions

La synthèse d'un monomère isocyanate bloqué hydrosoluble à partir de l'IEM a été effectuée en utilisant le 4-hydroxybenzènesulfonate de sodium en tant qu'agent de blocage. A notre connaissance, ce monomère est le seul monomère méthacrylate isocyanate bloqué soluble dans l'eau décrit dans la littérature. La synthèse est rapide et aisée à mettre en œuvre et permet d'obtenir un produit pur avec un bon rendement. Le monomère protégé a été polymérisé dans l'eau par voie radicalaire. La bonne réactivité des fonctionnalités isocyanate bloqué présentes sur le polymère vis-à-vis d'amines aliphatiques a été démontrée dans l'eau à température ambiante. La stabilité hydrolytique du polymère dans l'eau à température ambiante est limitée, mais suffisante pour garantir un couplage efficace avec des nucléophiles réactifs comme les amines. Ces résultats encourageants suggèrent que le polymère obtenu ou d'autres (co)polymères dérivés pourraient être utilisés pour la bioconjugaison de molécules biologiques.

IV. Microsphères réactives à base de divinylbenzène et de co-monomères isocyanate bloqué

1. Introduction

Il est nécessaire, lorsque l'on désire coupler une molécule biologique à un polymère de synthèse, que celui-ci soit soluble dans l'eau. Dans certaines applications cependant, ce qui est recherché c'est la possibilité de coupler la molécule biologique à un substrat polymère solide. La fonction réactive ne doit pas dans ce cas contribuer à la solubilisation du système dans l'eau. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à la réactivité de fonctions isocyanate bloqué lipophiles présentes sur des substrats insolubles de type microsphères.

La large gamme d'applications possibles pour les microsphères polymères a encouragé de nombreuses sociétés privées et des laboratoires à entreprendre divers projets d'envergure ces dernières années. Les microsphères uniformes en taille et en forme peuvent être utilisées en tant que support fonctionnel⁷, phase stationnaire^{8,9} pour la séparation chromatographique ou bien encore dans des domaines tels que les technologies de l'optique, de l'électronique et les biotechnologies.¹⁰⁻¹⁴

Plusieurs méthodes de préparation de microsphères polymères sont connues comme l'émulsion, la suspension et la polymérisation en milieu dispersé ; ces techniques ont fait l'objet de nombreuses revues.¹⁵⁻¹⁸ De manière générale, la stabilisation électrostatique en présence ou en absence d'un émulsifiant, dans le cadre de polymérisation en émulsion, permet d'obtenir des particules stables, individuelles et sphériques.¹⁹ D'autre part, les stabilisants stériques, permettant d'éviter la floculation de particules en croissance,^{20,21} ou les stabilisants réactifs, capables de copolymériser avec le monomère principal, génèrent des espèces greffées.²² Ces procédés synthétiques impliquent l'utilisation de stabilisants tels que poly(*N*-vinyle pyrrolidone) ou poly(alcool de vinylique).²³⁻²⁶

La polymérisation par précipitation (également appelé polymérisation-précipitation) est une technique particulièrement intéressante pour obtenir des microsphères monodisperses dans la mesure où elle permet de travailler sans surfactant ou stabilisant.²⁷⁻³¹ Initialement, la solution contenant le monomère, l'amorceur, le solvant et de manière optionnelle un co-monomère ou un co-solvant, est parfaitement homogène. Durant le processus de polymérisation, les chaînes de polymère en croissance forment une phase hétérogène et précipitent. La précipitation peut être de nature enthalpique, dans le cas d'interactions

polymère-solvant défavorables, ou entropique si la réticulation empêche le polymère et le solvant d'être bien mélangés.

La polymérisation-précipitation entropique peut, suivant la nature du solvant, conduire à l'obtention de diverses architectures. Dans un bon solvant, ces polymérisations conduisent souvent à l'obtention de gels macro- ou microscopique selon la concentration en monomère.³²⁻³⁴ Dans un mauvais solvant, la polymérisation-précipitation permet d'obtenir des particules de taille micrométrique.^{27,28,30,35} La distribution des tailles, souvent large, est due à un manque de stabilité colloïdale.¹⁵

Diverses équipes se sont intéressées à l'obtention de microsphères à base de divinylbenzène (DVB). Cette synthèse est effectuée, généralement, dans l'acétonitrile, mauvais solvant du polydivinylbenzène, et amorcée thermiquement. La production de ce type de microsphères a également pu être obtenue à partir d'un amorçage photochimique.³⁶ La nature physique et chimique de ces microsphères a pu être modifiée pour atteindre des structures poreuses^{37,38} ou bien encore des microsphères synthétisées à partir d'un mélange de DVB et de différents co-monomères.³⁹⁻⁴⁴

La synthèse de microsphères à base de DVB par polymérisation-précipitation a été, entre autre, décrite par Stöver et coll.⁴⁵ Cette technique présente l'intérêt d'utiliser des réactifs disponibles commercialement. Les particules obtenues par ces auteurs sont composées exclusivement de DVB et sont donc relativement inertes chimiquement, et en tout cas inappropriées pour l'attachement covalent direct de molécules biologiques. La synthèse de particules à base de DVB et de co-monomères réactifs permettrait de contourner cette limite, à condition d'identifier des conditions expérimentales de polymérisation-précipitation capables de tolérer la présence en quantités parfois non négligeables de co-monomères polaires. Plusieurs approches ont récemment été décrites, fondées sur l'utilisation de méthacrylate de glycidyle ou p-(chlorométhyl)styrène comme co-monomères réactifs.^{39,46,47} Nous avons de notre côté effectué le choix de travailler avec des co-monomères IEM bloqué, dont la littérature décrivait la bonne réactivité avec des fonctions amine aliphatique.

La synthèse et la caractérisation de deux monomères IEM protégés seront rapidement abordées avant de détailler l'obtention et la caractérisation de microsphères fonctionnalisées isocyanate bloqué.

2. Synthèses de monomères porteurs d'une fonction isocyanate bloquée

La synthèse de quelques monomères méthacrylates possédant une fonction isocyanate bloquée est, comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique (cf. paragraphe A.II.6), déjà décrite dans la littérature. Sadoun² a notamment décrit la synthèse d'IEM protégé à partir de différents agents de blocage (phénol, alcools, oximes et lactame). Notre choix s'est fixé sur le phénol et l'acétone oxime qui sont des composés classiques pour le blocage des isocyanates et qui présentent également des gammes de température de déblocage parmi les plus basses.

La synthèse a été effectuée en présence d'un léger excès (10 % molaire) d'agent de blocage par rapport à l'IEM, en présence de dilaurate de dibutylétain (DBTDL) comme catalyseur, dans le toluène à reflux (cf. Schéma 28).

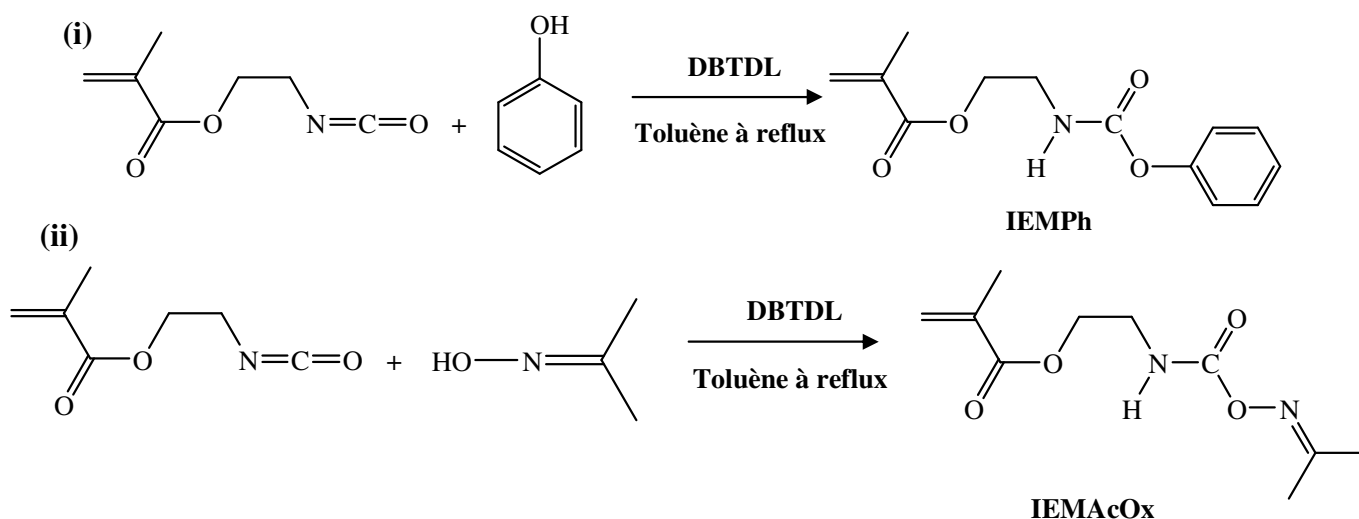


Schéma 28 : Réactions de protection de l'IEM par le phénol (i) et l'acétone oxime (ii).

Après recristallisation dans le toluène, filtration et séchage, les monomères bloqués par le phénol (IEMPh) et par l'acétone oxime (IEMAcOx) se présentent sous la forme d'une poudre blanche. Les analyses par spectroscopies RMN ¹H et IR-TF des deux monomères permettent de retrouver les données de la littérature.² Pour compléter la caractérisation, les deux monomères ont été également analysés par spectroscopie RMN ¹³C ; les Figure 23 et 24 présentent respectivement les spectres de l'IEMPh et de l'IEMAcOx. Ces analyses sont elles aussi en accord avec les structures obtenues.

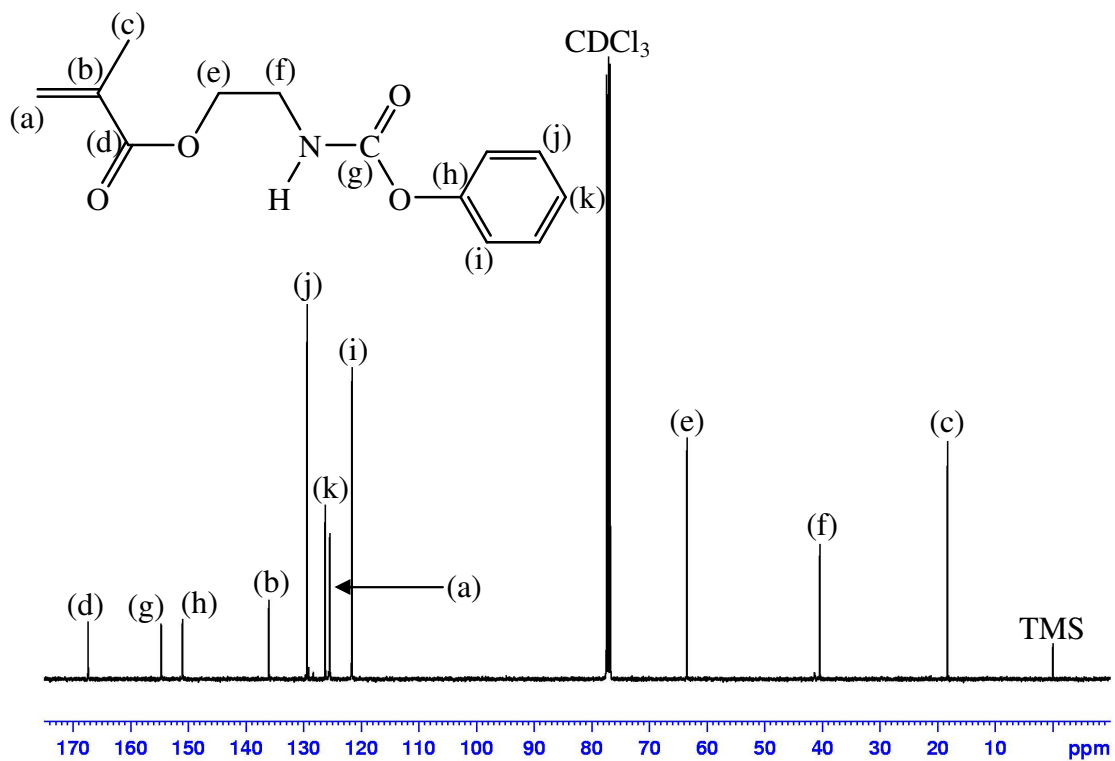


Figure 23 : Spectre RMN ^{13}C de l'IEMPh dans CDCl_3 .

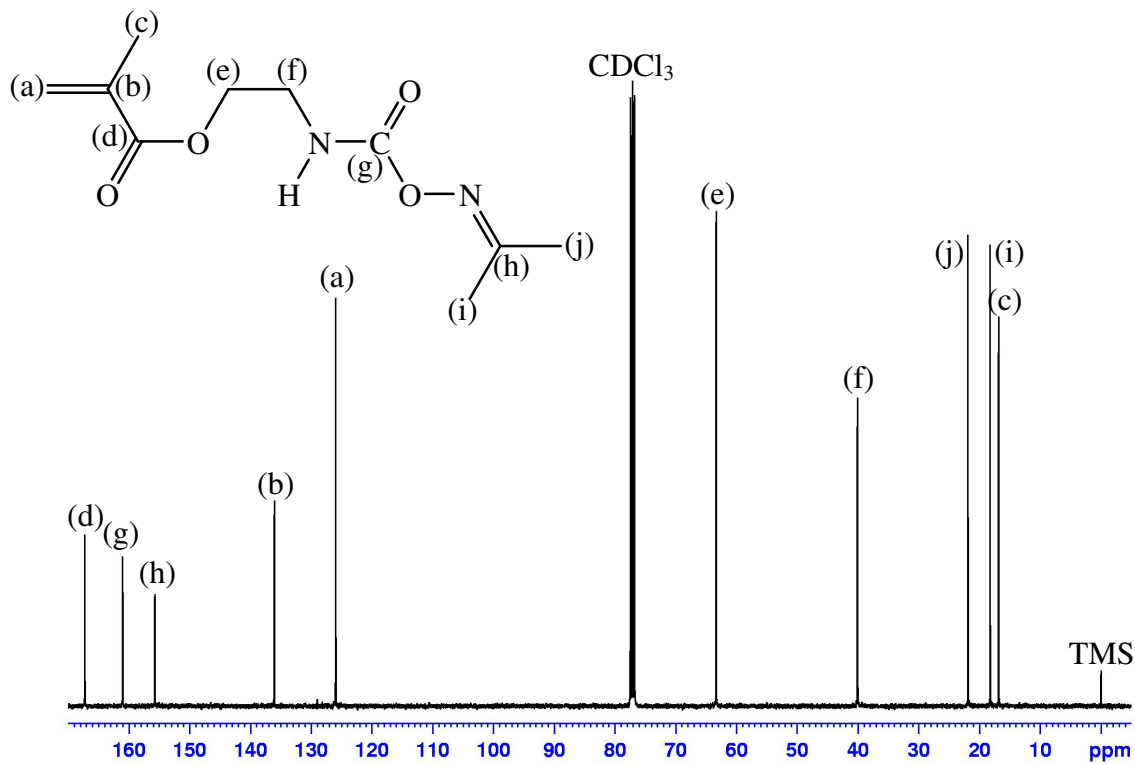


Figure 24 : Spectre RMN ^{13}C de l'IEMAcOx dans CDCl_3 .

3. Synthèse des microsphères à base de divinylbenzène et de monomères isocyanate bloqué

Une fois les monomères isocyanate bloqué obtenus, nous nous sommes intéressés à synthétiser des microsphères à base de divinylbenzène et de ces monomères (cf. Schéma 29).

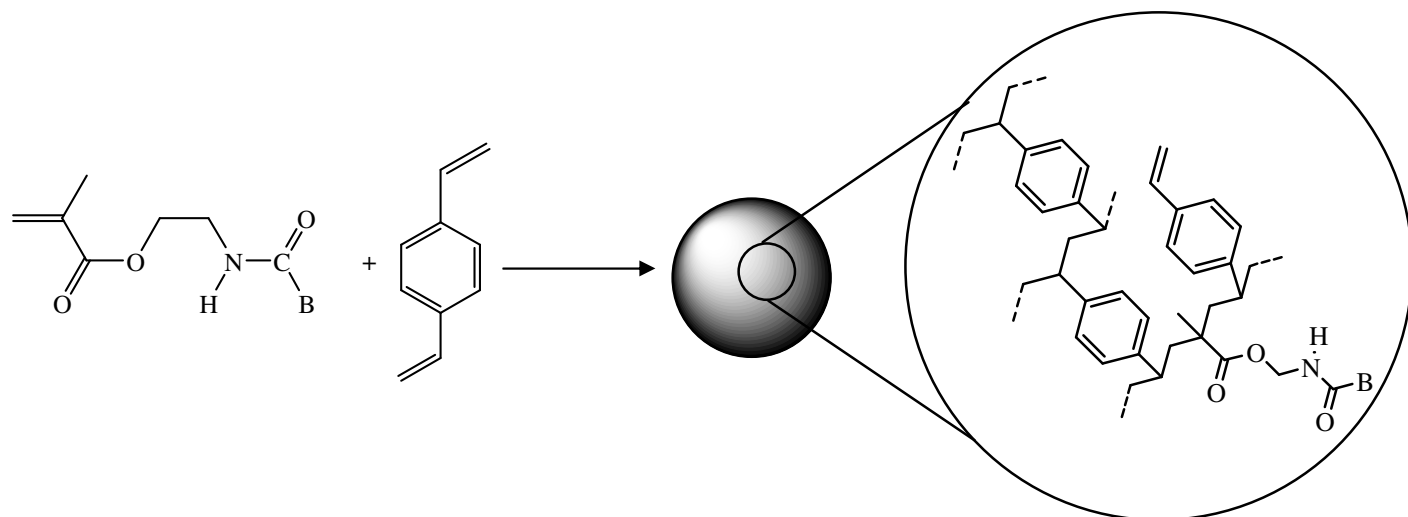


Schéma 29 : Synthèse de microsphères à base de DVB et d'IEM protégé par polymérisation-précipitation radicalaire.

Une adaptation du mode opératoire décrit par Stöver et coll.⁴⁵ s'est avérée nécessaire. Dans la technique décrite, les réactifs sont en effet introduits dans une bouteille en polyéthylène placée dans un réacteur connecté à un contrôleur de température. Le réacteur agite lentement l'échantillon en faisant rouler la bouteille dans le sens horizontal. Cet équipement n'étant pas disponible au laboratoire, différentes méthodes d'agitation ont été testées. L'ensemble des expériences effectuées est regroupé dans le Tableau 5.

Les premiers essais ont été menés directement dans un ballon avec une agitation magnétique lente en chauffant à 70°C (expériences 1 à 3). Les solutions sont laissées sous chauffage et agitation pendant une journée. Après filtration et séchage, les échantillons ont été caractérisés par microscopie électronique à balayage (MEB). Les Figure 25 (i), (ii) et (iii) présentent les clichés MEB respectivement des échantillons DVB, DVB/IEMPh et DVB/IEMAcOx.

#	Monomère IEM bloqué utilisé	n _{DVB} (mmol)	n _{monomère protégé} (mmol)	Masse totale de co-monomères (g)	t (j)	T (°C)	Type d'agitation, vitesse (tours.min ⁻¹)	Masse récupérée (g)
1	-	27,5	0	3,580	1	70	magnétique - lente	3,015
2	IEMPh	24,75	2,75	3,908	1	70	magnétique - lente	3,397
3	IEMAcOx	24,75	2,75	3,850	1	70	magnétique - lente	3,425
4	-	27,5	0	3,580	4	40	orbitale - 30	1,153
5	IEMPh	24,75	2,75	3,908	4	40	orbitale - 30	1,461
6	IEMAcOx	24,75	2,75	3,850	4	40	orbitale - 30	1,695
7	IEMPh	24,75	2,75	3,908	4	40	pâles mécaniques - 40	1,347
8 ^a	IEMPh	19,25	8,25	4,563	4	40	orbitale - 30	0,543
9 ^a	IEMAcOx	19,25	8,25	4,389	3	40	orbitale - 30	0,372

Tableau 5 : Synthèses de microsphères

(n_{AIBN} = 0,40 mmol ; V_{Acétonitrile} = 9 mL ; ^a V_{Acétonitrile} = 18 mL)

Comme le montrent les clichés MEB, les structures obtenues sont des microsphères agglomérées, ce qui ne correspond pas aux résultats décrits par Stöver pour l'expérience avec le DVB sans co-monomère (particules individuelles et monodisperses). Ce résultat négatif résulte des conditions d'agitation adoptées, manifestement trop éloignées de celles décrites dans la littérature. Une autre technique de mise en œuvre a donc été envisagée. De nouvelles solutions ont été préparées dans des ballons bouchés, puis maintenues quatre jours dans une enceinte thermorégulée sous agitation orbitale (30 tours.min⁻¹ à 40°C) (expériences 4 à 6). Cet équipement destiné à la culture biologique ne permet pas de chauffer au delà de 50°C ; pour des raisons de sécurité, nous avons travaillé 10 °C en dessous de cette température plafond soit à 40°C. Après quatre jours, les solutions ont été filtrées sous vide sur membrane de 0,5 µm. Les particules ont été lavées au THF puis séchées une journée sous vide à température ambiante. Ces échantillons ont également été caractérisés par MEB (cf. Figure 26 (i), (ii) et (iii)).

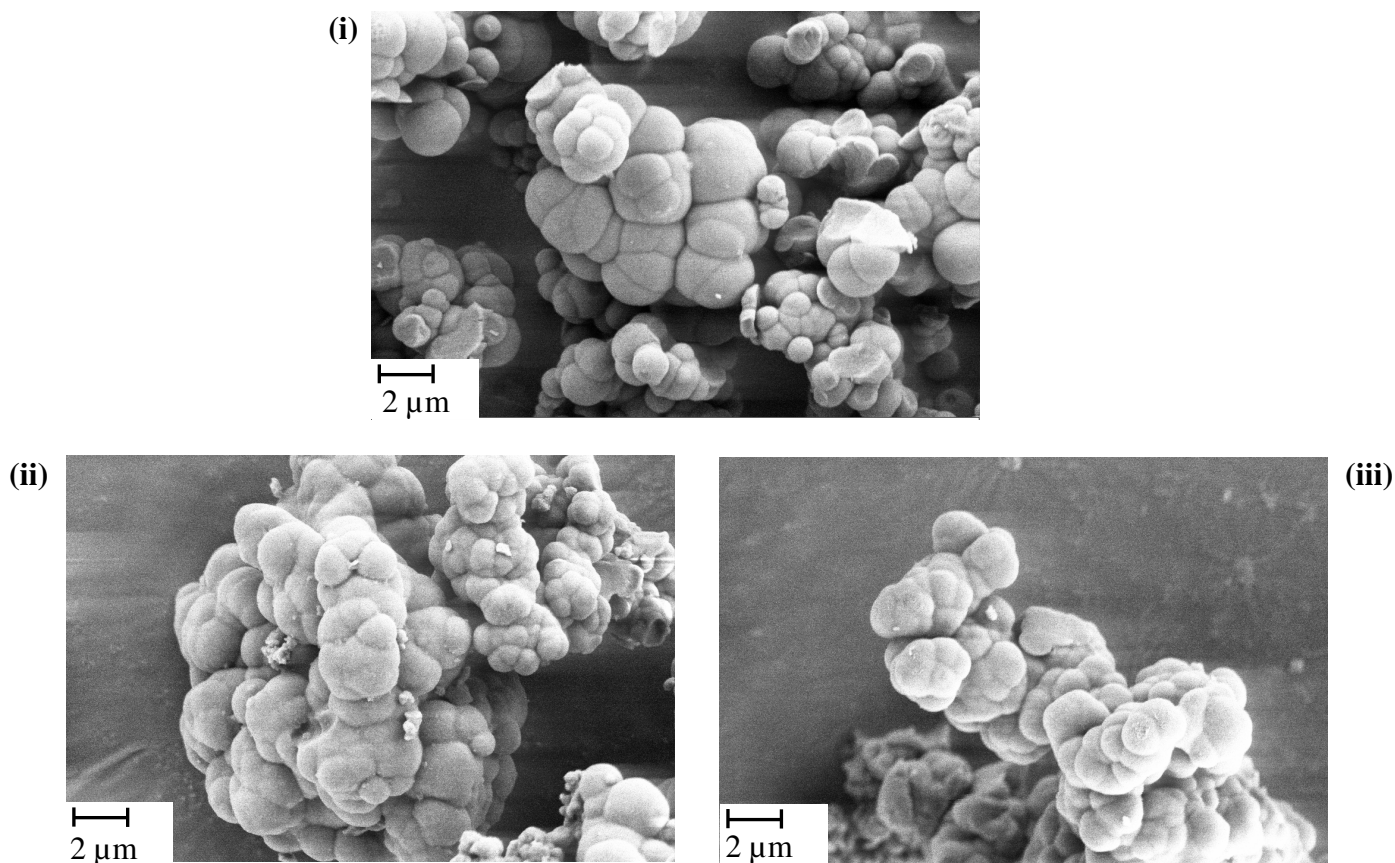


Figure 25 : Clichés MEB : (i) expérience 1 (DVB sans co-monomère), (ii) expérience 2 (DVB/IEMPh), et (iii) expérience 3 (DVB/IEMAcOx).

L'échantillon synthétisé à partir de DVB sans co-monomère (expérience 4) présente à nouveau une structure de particules agglomérées entre elles (cf. Figure 26 (i)). Ce résultat indique que les conditions d'agitation ne sont toujours pas optimales. Par contre, de manière étonnante, les deux échantillons synthétisés à partir de 90 % de DVB et 10 % d'IEM bloqué (expériences 5 et 6) présentent elles des structures sphériques et individuelles pour les particules (cf. Figure 26 (ii) et (iii)). L'explication de ces résultats surprenants mais encourageants résulte probablement du fait que les monomères IEM protégés, plus polaires que le DVB, favorisent, pour une raison encore non élucidée, la précipitation sans agglomération. Dans les deux cas, la distribution de tailles des particules n'est pas monodisperse. En effet, les particules de l'échantillon DVB/IEMPh possèdent des tailles comprises entre 1,0 et 4,0 μm avec une majorité de particules entre 2,5 et 4,0 μm . Les particules de l'échantillon DVB/IEMAcOx possèdent des tailles comprises entre 2,0 et 4,0 μm . Pour cet échantillon, aucune particule de moins de 2,0 μm n'est observée. La synthèse de ces microsphères (expériences 5 et 6) s'est montrée parfaitement reproductible (trois essais

séparés). Des synthèses en triplant ou quintuplant les quantités des différents réactifs ont montré des structures identiques à celles présentées.

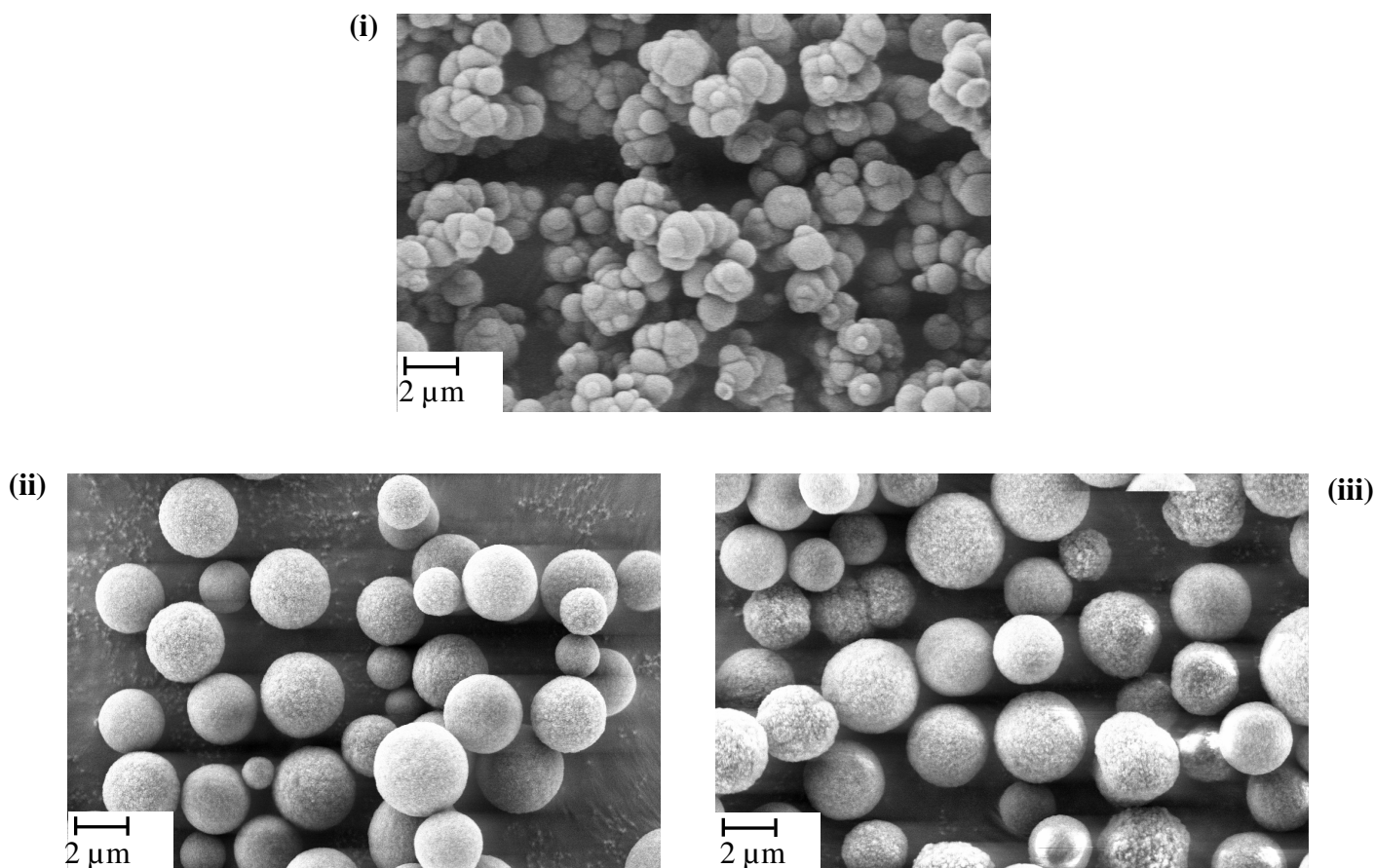


Figure 26 : Clichés MEB: (i) expérience 4 (DVB sans co-monomère), (ii) expérience 5 (DVB/IEMPh) et (iii) expérience 6 (DVB/IEMAcOx).

Une expérience à partir d'un mélange molaire 90/10 DVB/IEMPh (expérience 7) a été menée en utilisant une agitation mécanique à l'aide d'une pale double hélice à 40°C. La structure caractérisée par MEB mène ici aussi à une agglomération de particules.

Enfin, pour augmenter la quantité de fonctions isocyanate bloqué dans les particules, le rapport molaire DVB/monomère protégé a été modifié pour passer à 70/30 (expériences 8 et 9). Des expériences préliminaires ayant montré la formation après quatre jours d'un bloc solide compact sans précipitation, le volume d'acétonitrile a été doublé à 18 mL au lieu de 9 mL. Les masses de produits récupérés après séchage sont sensiblement moins importantes que celles obtenues pour un rapport molaire 90/10. Les clichés MEB de ces deux expériences (cf. Figure 27 (i) et (ii)) montrent que les particules sont plus petites que les précédentes, ce qui

indique une influence de la dilution sur la taille des particules. Enfin l'influence du temps de réaction joue également sur cette taille puisque l'expérience 9 a été menée sur trois jours au lieu de quatre.

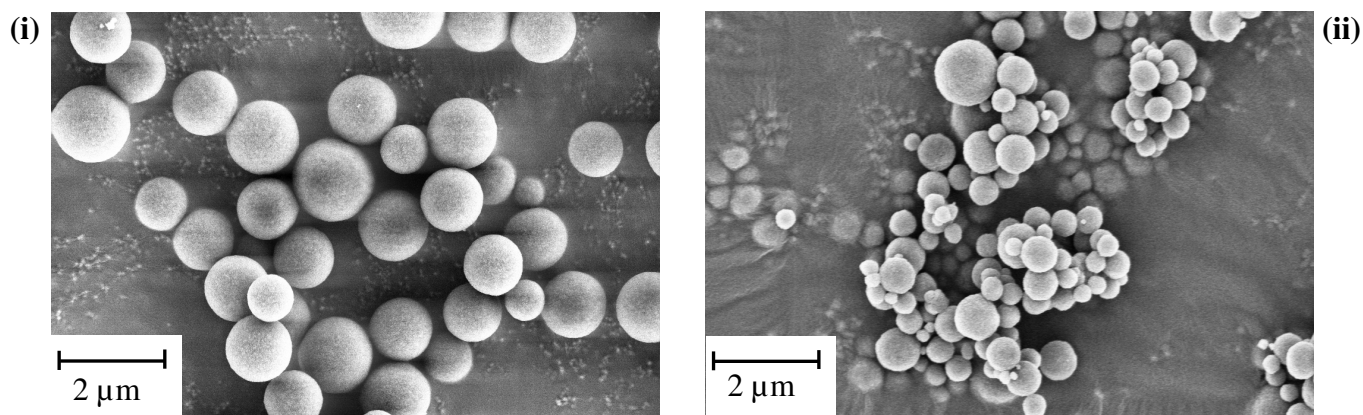


Figure 27 : Clichés MEB : (i) expérience 8 du (DVB/IEMPh) et (ii) expérience 9 (DVB/IEMAcOx).

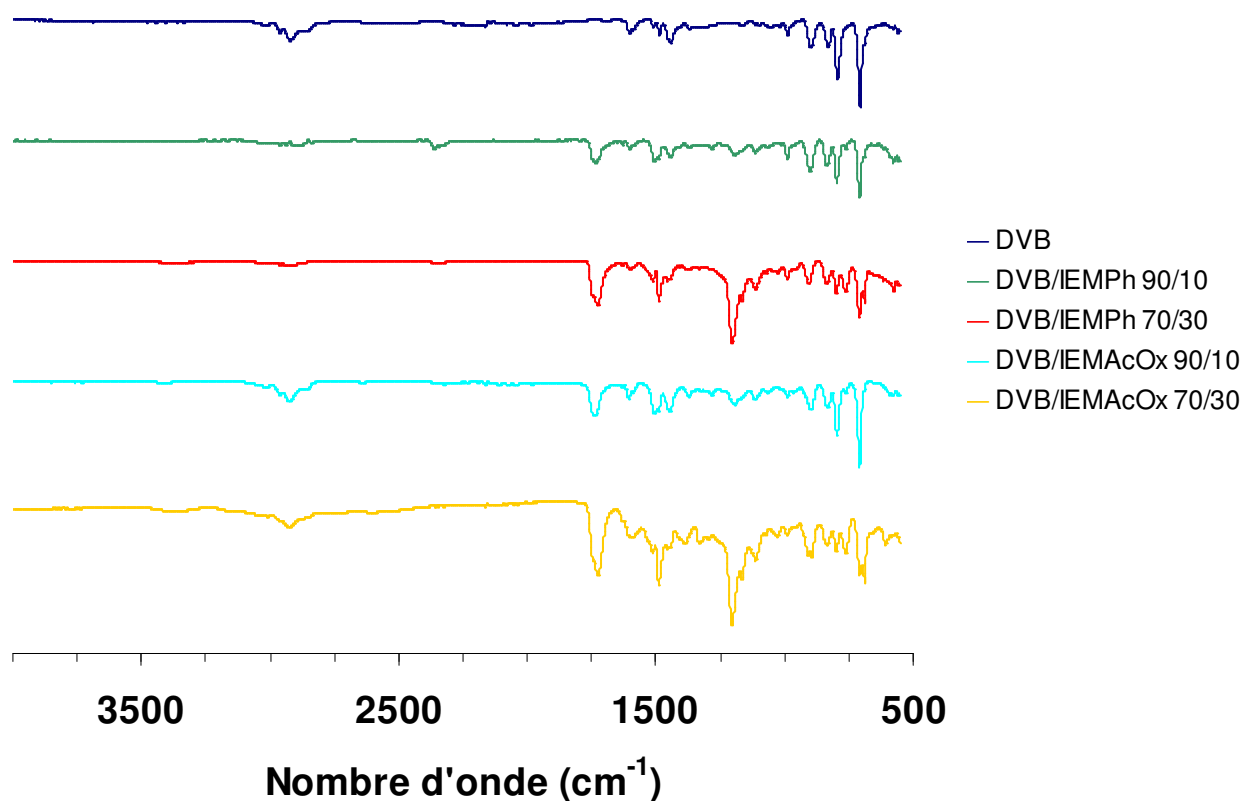


Figure 28 : Superposition des spectres IR-TF des microsphères expériences 4-6, 8 et 9.

Pour montrer la présence des monomères protégés dans les particules, les échantillons 4-6, 8 et 9 ont été caractérisés par spectroscopie IR-TF. La Figure 28 présente une superposition des spectres correspondant. Pour les échantillons contenant l'un des monomères protégés, il apparaît clairement une bande vers 1700 cm^{-1} , caractéristique des carbonyles. Par ailleurs, la quantité plus importante de monomère IEM protégé dans certains échantillons est reflétée par une intensité plus importante de cette bande.

4. Conclusions et perspectives

La synthèse de particules micrométriques à base de divinylbenzène et de co-monomères IEM protégé lipophiles a été effectuée à partir de polymérisation-précipitation radicalaire dans l'acétonitrile. La proportion maximale de monomère isocyanate bloqué incorporée dans les microsphères est de 30 % molaire par rapport au divinylbenzène. Diverses tailles de particules ont été obtenues allant de moins de $1,0\ \mu\text{m}$ à $4,0\ \mu\text{m}$. La présence des monomères IEM bloqués a été vérifiée par spectroscopie IR-TF.

Des expériences sont actuellement menées pour déterminer chimiquement le taux de fonctionnalité à la surface de ces objets. Cette détermination se fonde sur le couplage en solution dans le THF de la 1-pyrèneméthylamine sur les fonctions isocyanate bloqué disponibles sur les particules. La solution est régulièrement analysée par spectroscopie de fluorescence. Enfin, ces travaux ont conduit très récemment à la mise en place d'une collaboration avec l'équipe du professeur Dulce Papy du laboratoire CRRET (Université Paris 12) pour tester le potentiel de ces systèmes en bioconjugaison.

1. Fravel, H. G.; Reguiski, T. W.; Thomas, M. R. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development* **1984**, 23, (4), 586-590.
2. Sadoun, T.; Clouet, G.; Brossas, J. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **1987**, 188, (6), 1367-1373.
3. Zheng, S.; Bennett, G. A., US 0064324, **2005**.
4. McLauchlin, A., WO 14425, **1998**.
5. Nakao, M.; Nyudo, T.; Sato, H., JP 55017357, **1980**.
6. Guise, G. B.; Jackson, M. B.; McLaren, J. A. *Aust. J. Chem.* **1972**, 25, (12), 2583-2595.
7. Tuncel, A.; Kahraman, R.; Piskin, E. *Journal of Applied Polymer Science* **1994**, 51, (8), 1485-1498.
8. Galia, M.; Svec, F.; Frechet, J. M. J. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **1994**, 32, (11), 2169-2175.
9. Ellingsen, T.; Aune, O.; Ugelstad, J.; Hagen, S. *Journal of Chromatography* **1990**, 535, (1-2), 147-161.
10. Li, W. H.; Stover, H. D. H.; Hamielec, A. E. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **1994**, 32, (11), 2029-2038.
11. Okubo, M.; Nakagawa, T. *Colloid and Polymer Science* **1994**, 272, (5), 530-535.
12. McDonald, C. J.; Bouck, K. J.; Chaput, A. B.; Stevens, C. J. *Macromolecules* **2000**, 33, (5), 1593-1605.
13. Zhang, S. H.; Huang, X. A.; Yao, N. S.; Horvath, C. *Journal of Chromatography A* **2002**, 948, (1-2), 193-201.
14. Li, S. N.; Yang, X. L.; Huang, W. Q. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2005**, 206, (19), 1967-1972.
15. Stover, H. D. H., *Polymeric Materials Encyclopedia*. CRC Press: New York, **1996**.
16. Horak, D. *Acta Polymerica* **1996**, 47, (1), 20-28.
17. Ugelstad, J.; Mfutakamba, H. R.; Mork, P. C.; Ellingsen, T.; Berge, A.; Schmid, R.; Holm, L.; Jorgedal, A.; Hansen, F. K.; Nustad, K. *Journal of Polymer Science-Polymer Symposia* **1985**, (72), 225-240.
18. Arshady, R. *Colloid and Polymer Science* **1992**, 270, (8), 717-732.
19. Lovell, P. A.; El-Aasser, M. S., *Emulsion Polymerization and Emulsion Polymers*. John Wiley & Sons Ltd: **1997**.

20. Kawaguchi, S.; Winnik, M. A.; Ito, K. *Macromolecules* **1996**, 29, (13), 4465-4472.
21. Barrett, K. E. J., *Dispersion Polymerization in Organic Media*. John Wiley & Sons: London, **1975**.
22. Gibanel, S.; Heroguez, V.; Forcada, J. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **2001**, 39, (16), 2767-2776.
23. Marumoto, K.; Suzuta, T.; Noguchi, H.; Uchida, Y. *Polymer* **1978**, 19, (8), 867-871.
24. Uchida, T.; Hosaka, S.; Murao, Y. *Immunological Communications* **1982**, 11, (6), 467-476.
25. Paine, A. J. *Macromolecules* **1990**, 23, (12), 3109-3117.
26. Paine, A. J.; Luymes, W.; McNulty, J. *Macromolecules* **1990**, 23, (12), 3104-3109.
27. Bamford, C. H.; Ledwith, A.; Sengupta, P. K. *Journal of Applied Polymer Science* **1980**, 25, (11), 2559-2566.
28. Li, K.; Stover, H. D. H. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **1993**, 31, (13), 3257-3263.
29. Li, K.; Stover, H. D. H. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **1993**, 31, (10), 2473-2479.
30. Sosnowski, S.; Gadzinowski, M.; Slomkowski, S. *Macromolecules* **1996**, 29, (13), 4556-4564.
31. Naka, Y.; Kaetsu, I.; Yamamoto, Y.; Hayashi, K. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **1991**, 29, (8), 1197-1202.
32. Okay, O.; Funke, W. *Makromolekulare Chemie-Rapid Communications* **1990**, 11, (11), 583-587.
33. Antonietti, M. *Macromolecular Symposia* **1995**, 93, 213-225.
34. Murray, M. J.; Snowden, M. J. *Advances in Colloid and Interface Science* **1995**, 54, 73-91.
35. Tai, E. F.; Caskey, J. A.; Allison, B. D. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **1986**, 24, (3), 567-577.
36. Lime, F.; Irgum, K. *Macromolecules* **2007**, 40, (6), 1962-1968.
37. Bai, F.; Huang, B.; Yang, X. L.; Huang, W. Q. *Polymer* **2007**, 48, (13), 3641-3649.
38. Li, W. H.; Stover, H. D. H. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **1998**, 36, (10), 1543-1551.

39. Jin, J. M.; Lee, J. M.; Ha, M. H.; Lee, K.; Choe, S. *Polymer* **2007**, 48, (11), 3107-3115.
40. Li, G. L.; Yang, X. L.; Bai, F. *Polymer* **2007**, 48, (11), 3074-3081.
41. Li, W. H.; Li, K.; Stover, H. D. H. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **1999**, 37, (14), 2295-2303.
42. Li, W. H.; Stover, H. D. H. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **1999**, 37, (15), 2899-2907.
43. Yang, S. H.; Shim, S. E.; Choe, S. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **2005**, 43, (6), 1309-1311.
44. Baba, Y.; Ohe, K.; Kawasaki, Y.; Kolev, S. D. *Reactive & Functional Polymers* **2006**, 66, (10), 1158-1164.
45. Downey, J. S.; Frank, R. S.; Li, W. H.; Stover, H. D. H. *Macromolecules* **1999**, 32, (9), 2838-2844.
46. Heroguez, V. *Particules et Nanoparticules: de la synthèse à leurs utilisations* Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est, **08/02/2007**.
47. Heroguez, V. *Particules et Nanoparticules: de la synthèse à leurs utilisations*, 35ème Journées d'Etudes des Polymères, Antibes, **17/09/2007**.

C. Partie Expérimentale

I. Techniques de caractérisations

1. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire en solution

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance II 400 (400 MHz pour le ^1H et 100 MHz pour le ^{13}C), équipé d'une sonde BBFO 5 mm à température ambiante. Le tétraméthylsilane (TMS) est la référence utilisée pour les analyses effectuées dans les solvants organiques. Pour les analyses dans l'eau deutériée, le 3-(triméthylsilyl)propan-1-sulfonate de sodium (DSS) est utilisé comme référence.

Les spectres RMN ^{13}C quantitatifs des échantillons d'hydrogel ont été réalisés sur un spectromètre Bruker Avance 300 équipé d'une sonde BBO 10 millimètres. Pour ces analyses, la température a été maintenue à 296 K, le temps de répétition a été fixé à 6 s et le nombre d'accumulations a été fixé à 31 800.

2. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire à l'état solide

Les mesures de RMN ^{13}C du solide ont été réalisées sur un spectromètre de type Bruker DSX 300 (Fréquence de Larmor du carbone 13 de 75,47 MHz) à l'aide d'une sonde double résonance, permettant la rotation à l'angle magique de l'échantillon. Des rotors de 4 mm de diamètre ont été utilisés pour ces expériences. La vitesse de rotation de l'échantillon a été choisie à 8 kHz. Les spectres de RMN ^{13}C ont été obtenus à température ambiante, à l'aide des techniques dites de "haute résolution" dans les solides, i.e rotation de l'échantillon à l'angle magique, découplage dipolaire des protons et polarisation croisée $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$. L'impulsion de 90° sur le canal ^1H était de 3,8 μs et la polarisation croisée $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ a été réalisée à une fréquence de 66 kHz, avec un temps de contact de 1 ms. La puissance du découplage des protons appliqué durant l'acquisition du signal RMN ^{13}C a été fixée à 93 kHz. Le temps de répétition utilisé dans ces expériences était de 3 s, en accord avec le temps de relaxation spin-réseau des protons des échantillons. Les déplacements chimiques du carbone 13 ont été rapportés par rapport au TMS, par utilisation de la glycine, sous sa forme α , comme

référence externe : le déplacement chimique du pic associé au groupement C=O de la glycine a été fixé à 176,0 ppm.

3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Les spectres IR-TF ont été enregistrés au moyen d'un spectromètre Bruker Tensor 27 DGTS en mode réflexion totale atténuée (ATR).

4. Analyse thermogravimétrique

Les thermogrammes ont été réalisés au moyen d'un appareil Setsys Evolution (Setaram Instrumentation), sous argon, de la température ambiante jusqu'à 600 °C avec un gradient de température de 10 K.min⁻¹.

5. Détermination de point de fusion

Les déterminations de point de fusion ont été effectuées au moyen d'un appareil Electrothermal 9100, paramétré 5°C en dessous de la valeur de la littérature puis en augmentant la température à la vitesse de 1°C.min⁻¹.

6. Analyse élémentaire

Les analyses élémentaires ont été effectuées au Service Central d'Analyse du CNRS à Vernaison.

7. Microscopie électronique à balayage

Les analyses par microscopie électronique à balayage ont été effectuées à l'aide d'un appareil MEB-FEG Léo 1530, équipé d'un canon à effet de champs.

II. Réactifs

Le méthacrylate de 2-isocyanatoéthyle (IEM) (Aldrich), l'isocyanate de butyle (Fluka), le métabisulfite de potassium (Aldrich), le 4-hydroxybenzènesulfonate de sodium dihydraté (Aldrich), le 2-hydroxyéthansulfonate de sodium (Aldrich), le persulfate de potassium (Prolabo), le méthacrylate de 2-hydroxyéthyle (HEMA) (Aldrich), la n-butylamine (Aldrich), le divinylbenzène (Fluka), ont été utilisés sans purification.

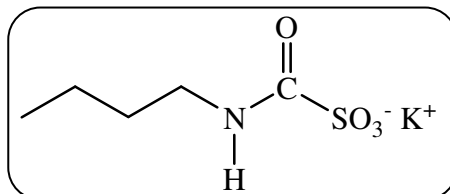
L'azo-bis(isobutyronitrile) (Aldrich) a été recristallisé dans le méthanol.

Le 1,4-dioxane (SDS), le méthanol (SDS), l'acétonitrile (SDS), le toluène (SDS), le tétrahydrofurane (SDS) ont été utilisés sans purification.

L'eau a été purifiée à l'aide d'un système Millipore Elix 3 avant utilisation.

III. Synthèses

n-Butylcarbamoylsulfonate de potassium (n-Bu-NH-C(=O)-SO₃⁻ K⁺)



Mode opératoire :

Le n-butylcarbamoylsulfonate de potassium est synthétisé suivant le protocole décrit par Zheng et Bennett.¹

2 g d'isocyanate de n-butyle (0,02 mol) sont solubilisés dans 2 mL de 1,4-dioxane. La solution limpide et de couleur jaune, est ajoutée rapidement à une solution préparée à partir de 2,22 g métabisulfite de potassium (0,01 mol) dans 10 mL d'eau désionisée. Le milieu réactionnel devient immédiatement orange ; il est laissé sous agitation une nuit à température ambiante. La solution est refroidie au congélateur pendant 30 minutes pour cristalliser le produit. La fraction insoluble est filtrée sur fritté ; le filtrat est évaporé pour obtenir un solide légèrement brun. Le rendement, non précisé dans le brevet, est de 55 %.

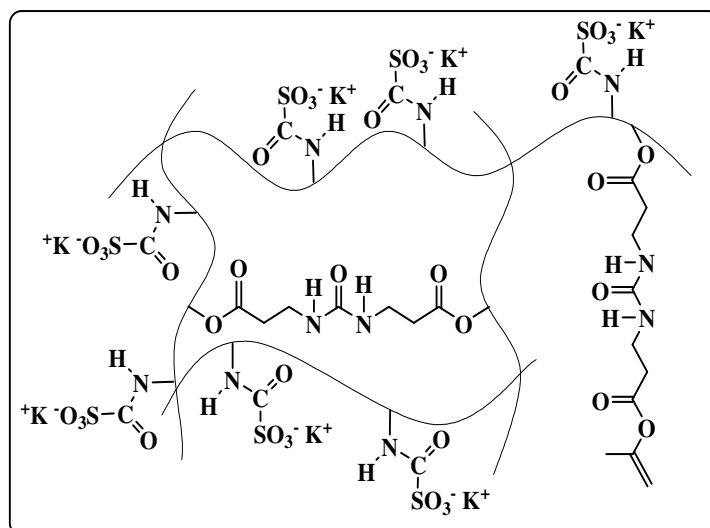
Caractérisation :

RMN ¹H (400 MHz, D₂O): δ (ppm) = 0,88 (triplet, 3H); 1,33 (sextuplet, 2H); 1,52 (quintuplet, 2H); 3,37 (triplet, 2H).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O): δ(ppm) = 15,6 (CH₃-); 22,0 (CH₃-CH₂-CH₂-); 32,9 (-CH₂-CH₂-CH₂-); 42,8 (-CH₂-CH₂-NH-); 168,1 (-NH-C(=O)-SO₃⁻ K⁺).

IR-TF (cm⁻¹): 1 700 (C(=O)-O); 1 730 (NH-C(=O)).

Hydrogel fonctionnalisé (-NH-C(=O)-SO₃⁻ K⁺)



Mode opératoire :

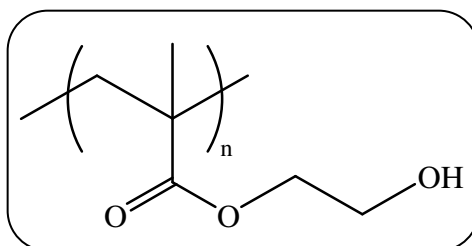
Une solution de métabisulfite de potassium dans 5 mL d'eau désionisée est laissée sous agitation et dégazée pendant 30 minutes sous bullage d'argon à température ambiante. L'IEM est ajouté rapidement à cette solution toujours sous agitation, sous bullage d'argon et à température ambiante jusqu'à l'observation de la formation de l'hydrogel. Il est séché sous vide une nuit, à température ambiante, pour obtenir un solide blanc. Afin de caractériser l'hydrogel, par RMN ^{13}C à l'état liquide, la synthèse est effectuée dans l'eau deutériée. Les analyses IR-TF et ATG ont été effectuées à partir d'une fraction de gel séché.

Caractérisation :

RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O) : δ (ppm) = 17 (CH_3 -); 39 ($-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{NH}-$); 45 ($-\underline{\text{CH}_2}-\text{C}(-\text{CH}_3)-$). 54 ($-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}(-\text{CH}_3)-$); 63 ($-\text{O}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-$); 160 ($-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$); 168 ($-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{SO}_3^- \text{K}^+$). 179 ($-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$).

IR-TF (cm^{-1}): 3 500-3 100 (N-H) ; 1 750-1 650 (C=O, fonctions carbonyles).

———— Poly(méthacrylate de 2-hydroxyéthyle) (PHEMA) ————



Mode opératoire :

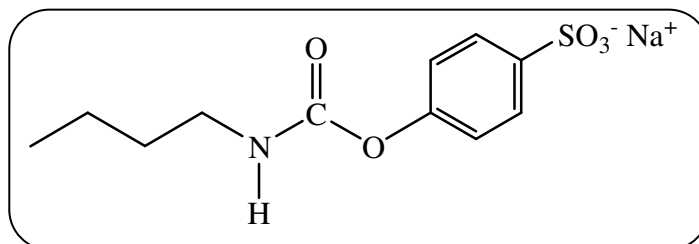
Une solution de métabisulfite de potassium (393 mg ; 1,8 mmol) dans 5 mL d'eau désionisée est agitée et dégazée pendant 30 minutes sous bulage d'argon à température ambiante. Le monomère HEMA (0,5 mL ; 4,1 mmol) est rapidement ajouté à la solution. La solution est laissée sous agitation à température pendant 17 heures. Le poly(méthacrylate de 2-hydroxyéthyle), insoluble dans l'eau, précipite progressivement. Le polymère formé est récupéré par filtration puis séché sous vide à température ambiante une nuit. 90 mg de polymère sec sont obtenus soit une conversion de 17 %.

Caractérisation :

RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 0,86 (3H); 1,85 (2H); 3,61 (2H); 3,95 (2H); 4,48 (1H).

IR-TF (cm^{-1}): 3 700-3 100 (OH) ; 1 700 (C=O).

4-(Butylcarbamoyl)benzènesulfonate de sodium (BuPhSO₃⁻)



Mode opératoire :

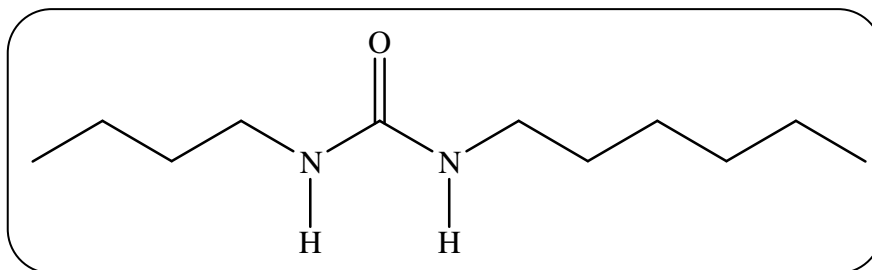
Une solution de 4-hydroxybenzènesulfonate de sodium (3,33 g ; 0,017 mol) dans 16 mL d'eau désionisée est laissée sous agitation pendant 10 minutes à température ambiante. 2,33 mL (0,021 mol) d'isocyanate de n-butyle sont ajoutés rapidement. La solution initialement blanchâtre et trouble vire immédiatement au violet puis après 10 minutes au jaune, en restant trouble. Après 45 minutes la solution légèrement jaune devient limpide. Après 1 heure, la solution est précipitée dans un large volume d'acétone. Le précipité est filtré sur fritté puis séché une nuit sous vide à 50°C. 2,7 g d'une poudre légèrement brunâtre sont récupérés soit un rendement de 57 %.

Caractérisation :

RMN ¹H (400 MHz, D₂O): δ(ppm) = 0,91 (triplet, 3H); 1,33 (multiplet, 2H); 1,50 (multiplet, 2H); 3,19 (multiplet, 2H); 7,25 (doublet, 2H); 7,85 (doublet, 2H).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O): δ(ppm) = 15,7 (CH₃-); 21,8 (CH₃-CH₂-); 33,5 (-CH₂-CH₂-CH₂-); 57,1 (-CH₂-CH₂-NH-); 124,9 (-O-C-CH_{arom}-); 129,9 (-CH_{arom}-C-SO₃⁻ Na⁺); 142,5 (-C_{arom}-SO₃⁻ Na⁺); 155,4(-O-C_{arom}-); 159,3 (-NH-C(=O)O).

1-Butyl-3-hexylurée



Mode opératoire :

Ce protocole s'inspire des travaux de Guise.² 1 g (3,4 mmol) de BuPhSO₃⁻ est ajouté à une solution préparée à partir de 1 g n-hexylamine (10 mmol) dans 2,5 mL d'eau désionisée. La solution est laissée une nuit sous agitation à température ambiante. L'urée, légèrement

brunâtre, précipite au cours de la réaction. 34 mL d'acide chlorhydrique (0,2 mol.L⁻¹) sont ajoutés, la solution est laissée sous agitation 30 minutes à température ambiante ; la fraction solide blanchit et un léger dégagement gazeux est observé. La solution est ensuite filtrée sur fritté. Le précipité est lavé à l'aide de 100 mL d'eau désionisée. Après séchage une nuit sous vide à température ambiante, 0,48 g d'une poudre blanche sont récupérés soit un rendement de 70 %.

Caractérisation :

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0,90 (multiplet, 6H); 1,35 (multiplet, 4H); 1,42 (quintuplet, 8H); 3,10 (quintuplet, 4H); 4,76 (singulet, 2H).

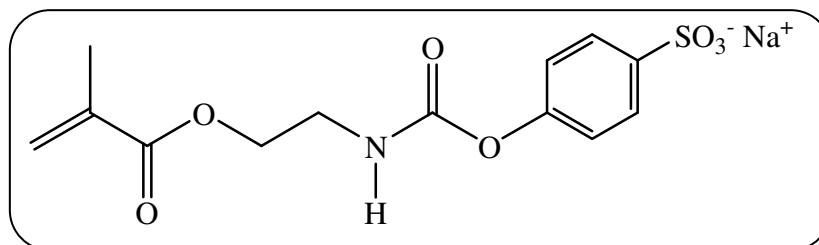
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 14,2 (CH₃-); 20,7 (CH₃-CH₂-CH₂-); 33,5 (CH₂-CH₂-CH₂-); 40,2 (CH₂-CH₂-NH-); 159,3 (-NH-C(=O)-NH-).

IR-TF (cm⁻¹) : 1570 et 1615 (NH-C(=O)-NH).

AE (% (valeur théorique %)): C = 65,77 (65,95) ; H = 11,78 (12,08) ; N = 13,82 (13,98) ; O = 8,17 (7,99).

Point de fusion : 46 °C (le point de fusion reste stable après recristallisation dans l'éthanol).

— **4-((2-(Méthacryloyloxy)éthyl)carbamoyl)benzenesulfonate de sodium (IEMPhSO₃⁻)**



Mode opératoire :

Le composé 4-((2-(méthacryloyloxy)éthyl)carbamoyl)benzenesulfonate de sodium est synthétisé suivant le mode opératoire décrit pour la synthèse du 4-(butyrcarbamoyl)benzenesulfonate de sodium. Aucun changement de couleur n'est observé, seule la turbidité diminue au cours de la synthèse pour obtenir une solution complètement limpide après 15 minutes. Après séchage le produit se présente sous la forme d'une poudre blanche.

Caractérisation :

RMN ¹H (400 MHz, D₂O): δ(ppm) = 1,89 (singulet, 3H); 3,53 (quadruplet, 2H); 4,29 (triplet, 2H); 5,72 (singulet, 1H); 6,14 (singulet, 1H); 7,25 (doublet, 2H); 7,85 (doublet, 2H).

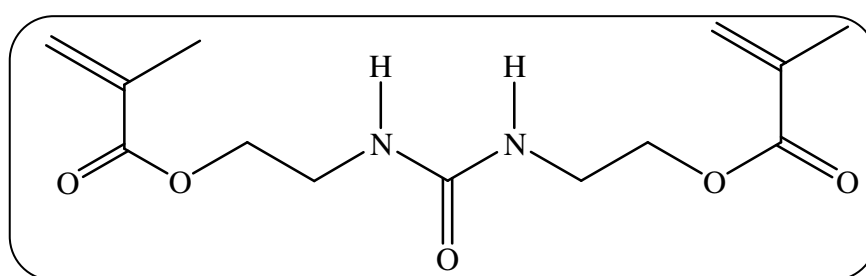
RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): $\delta(\text{ppm}) = 20,4 (\text{CH}_3-); 42,6 (-\text{CH}_2-\text{NH}-); 66,8 (-\text{O}-\text{CH}_2-); 125,2 (-\text{O}-\text{C}-\underline{\text{CH}}_{\text{arom}}-); 130,1 (\underline{\text{CH}}_2=\text{C}-); 130,2 (-\text{CH}_{\text{arom}}-\text{C}-\text{SO}_3^- \text{Na}^+); 138,7 (=C(\underline{\text{CH}}_3)-); 143,2 (-\text{C}_{\text{arom}}-\text{SO}_3^- \text{Na}^+); 155,5 (-\text{O}-\text{C}_{\text{arom}}-); 159,3 (-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-); 169,5 (-\text{C}(=\text{O})\text{O}).$

RMN ^{13}C DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 17,4 (\text{CH}_3-); 39,6 (-\text{CH}_2-\text{NH}-); 63,8 (-\text{O}-\text{CH}_2-); 122,2 (-\text{O}-\text{C}-\underline{\text{CH}}_{\text{arom}}-); 127,1 (\underline{\text{CH}}_2=\text{C}-); 127,2 (-\text{CH}_{\text{arom}}-\text{C}-\text{SO}_3^- \text{Na}^+).$

IR-TF (cm^{-1}): 1 550 (NH); 1 640 (C=C); 1 700 (C(=O)-O); 1 720 (NH-C(=O)); 3 250 (NH)

AE (% (valeur théorique%)): C = 44,45 (44,37); H = 4,00 (4,02); N = 3,79 (3,99); S = 8,87 (9,13).

—— **Urée N,N' -[2-(2-méthyl-2-acide propenoïque)éthyle ester]** ———



Mode opératoire :

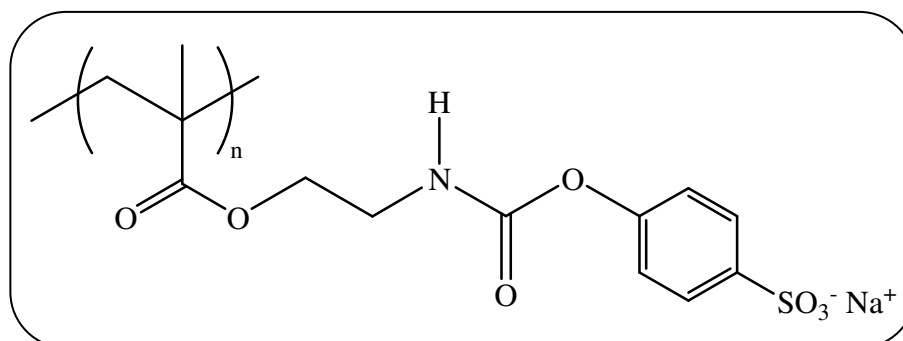
L'urée est synthétisée suivant le mode opératoire utilisé pour obtenir le 4-((2-(méthacryloyloxy)éthyl)carbamoyl)benzenesulfonate de sodium en substituant le 4-(butylcarbamoyl)benzenesulfonate de sodium par le 2-hydroxyéthansulfonate de sodium. Après avoir laissé la solution contenant le 2-hydroxyéthansulfonate de sodium et l'IEM dans l'eau sous agitation à température ambiante pendant deux heures, un solide précipite. Après filtration et séchage une nuit à température ambiante sous vide, 0,56 g d'un solide blanc sont récupérés.

Caractérisation :

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 1,93 (\text{singulet}, 6\text{H}); 3,49 (\text{triplet}, 4\text{H}); 4,21 (\text{triplet}, 4\text{H}); 5,19 (\text{singulet}, 2\text{H}); 5,58 (\text{singulet}, 2\text{H}); 6,11 (\text{singulet}, 2\text{H}).$

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 18,3 (\text{CH}_3-); 39,5 (-\text{CH}_2-\text{NH}-); 64,1 (-\text{O}-\text{CH}_2-); 126,4 (\underline{\text{CH}}_2=\text{C}-); 136,0 (=C(\underline{\text{CH}}_3)-); 158,1 (-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-); 167,6 (-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-).$

— **Poly(4-((2-(méthacryloyloxy)éthyl)carbamoyle)benzènesulfonate de sodium)** —
(Poly(IEMPhSO₃⁻))



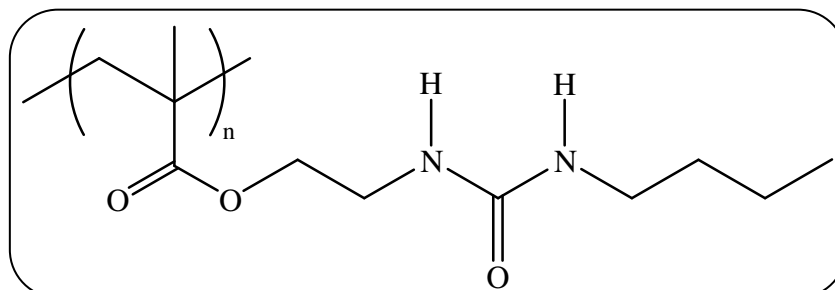
Mode opératoire :

Une solution est préparée à partir de IEMPhSO₃⁻ (1 g ; 2,8 mmol) et du persulfate de potassium (10 mg ; 0,037 mmol) dans 20 mL d'eau désionisée. La solution est laissée 30 minutes sous bullage d'argon. Le ballon est bouché puis plongé dans un bain d'huile thermostaté à 60°C sous agitation magnétique. Après 90 minutes, le barreau aimanté ne peut plus agiter la solution devenue très visqueuse. 30 mL d'eau désionisée sont ajoutés afin de diluer la solution. La solution est précipitée dans l'éthanol. Après élimination du solvant et séchage une nuit sous vide à 50°C, 0,43 g de polymère blanc sont récupérés soit une conversion en monomère de 40 %.

Caractérisation :

RMN ¹³C solide : δ(ppm) = 18 (CH₃-); 40 (-CH₂-C(CH₃)-); 45 (-C(CH₃)-); 58 (-CH₂-NH); 64 (-O-CH₂-); 122 (-CH_{arom}-C-SO₃⁻ Na⁺); 128 (-O-C-CH_{arom}-); 141 (-C_{arom}-SO₃⁻ Na⁺); 153 (-O-C_{arom}-); 155 (-NH-C(=O)O-); 178 (-C(=O)O-).

— **Poly(méthacrylate de 2-(3-butylureidoéthyle))** —



Mode opératoire :

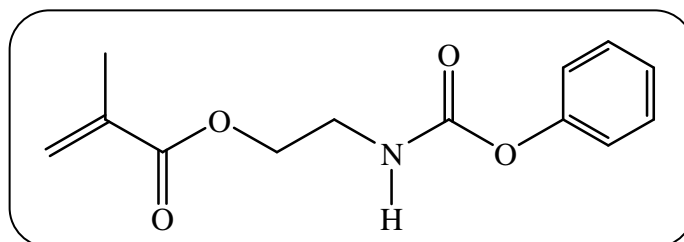
0,4 g de poly(IEMSO₃⁻) sont ajoutés à une solution de n-butylamine (0,241 g ; 3,3 mmol) dans 50 mL d'eau désionisée. La solution est laissée sous agitation à température ambiante.

Après 3 jours, 66 mL d'une solution d'acide chlorhydrique (0,1 mol.L⁻¹) sont ajoutés. La solution est laissée sous agitation 30 minutes à température ambiante. Après filtration sur fritté et séchage une nuit sous vide à 50°C, 0,205 g de poudre blanche sont récupérés.

Caractérisation :

RMN ¹³C solide : δ(ppm) = 14 (-CH₂-CH₂-CH₃); 20 ((CH₃-C) et (-CH₂-CH₂-CH₃)); 33 (-NH-CH₂-CH₂-CH₂-); 39 (-CH₂-C(CH₃)-); 45 (-CH₂-C(CH₃)-); 55 (-CH₂-NH-C(=O)-NH-CH₂-); 64 (-O-CH₂-CH₂-); 160 (-NH-C(=O)-NH-); 177 (-C(=O)O).

———— **2-(Méthacryloyloxy)éthylcarbamate de phényle (IEMPh)** —————



Mode opératoire :

Le 2-(méthacryloyloxy)éthylcarbamate de phényle est synthétisé suivant le protocole décrit par Sadoun³ en substituant le benzène par le toluène.

10,3 g (0,11 mol) de phénol et 0,2 mL (3 mmol) de dilaurate de dibutylétain sont dissous dans 100 mL de toluène (préalablement séché sur sodium). La solution est portée à reflux du toluène sous agitation. Une solution de 14,1 mL (0,1 mol) de méthacrylate de 2-isocyanatoéthyle dans 25 mL de toluène sec est ajoutée goutte-à-goutte. L'ajout est effectué en conservant un léger reflux de toluène sous agitation. Lorsque l'addition est terminée, la solution est laissée encore 30 minutes à reflux puis refroidie. Le produit est récupéré par filtration sur fritté et lavage à l'hexane. Le produit est ensuite recristallisé dans le toluène. Après une nouvelle filtration, le produit est séché une nuit à 50°C sous vide. 25 g de poudre blanche sont récupérés soit un rendement de 85 %.

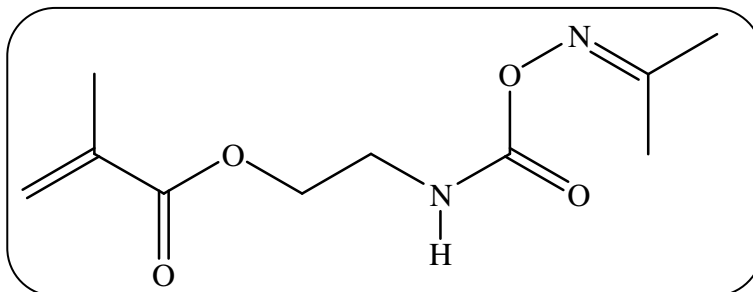
Caractérisation :

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 1,97 (singulet, 3H); 3,59 (quadruplet, 2H); 4,29 (triplet, 2H); 5,38 (singulet, 1H); 5,61 (singulet, 1H); 6,15 (singulet, 1H); 7,11-7,37 (massif, 5H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 18,3 (CH₃-); 40,5 (-CH₂-NH-); 63,5 (-O-CH₂-); 121,6 (-O-C-CH_{arom}-); 125,4 (-O-C-CH-CH-CH_{arom}-); 126,2 (CH₂=C-); 129,3 (-O-C-CH-CH_{arom}-); 136,0 (=C(CH₃)-); 151,0 (-O-C_{arom}-); 154,7 (-NH-C(=O)O-), 167,3 (-C(=O)O-).

IR-TF (cm^{-1}): 1 550 (NH); 1 650 (C=C); 1 700 (C(=O)-O); 1 740 (NH-C(=O)); 3 350 (NH)

—— **Méthacrylate d'acétone,O-[(2-hydroxyéthyl)carbamoyl]oxime (IEMAcOx)** ——



Mode opératoire :

Le méthacrylate d'acétone,O-[(2-hydroxyéthyl)carbamoyl]oxime est synthétisé en suivant le protocole décrit pour la synthèse du 2-(méthacryloyloxy)éthylcarbamate de phényle en utilisant 8,0 g d'acétone oxime à la place du phénol.

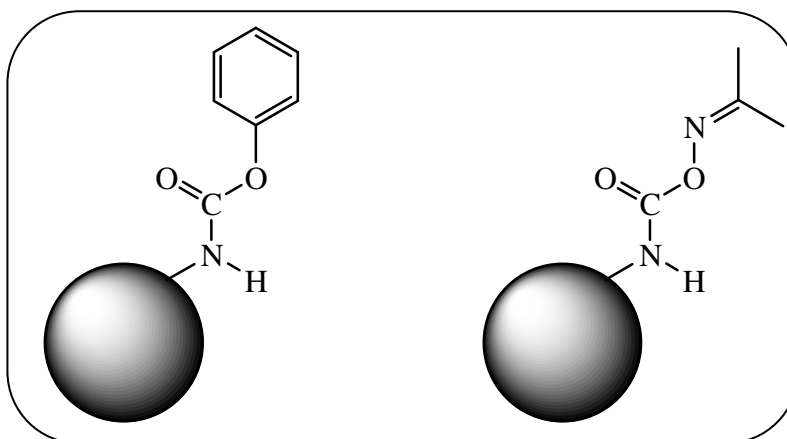
Caractérisation :

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 1,95-2,03 (multiplet, 9H); 3,59 (quadruplet, 2H); 4,29 (t, 2H); 5,61 (s, 1H); 6,15 (s, 1H); 6,58 (s, 1H).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 16,9 ($\text{CH}_3\text{-C=N-}$); 18,3 ($\text{CH}_3\text{-}$); 21,7 ($\text{CH}_3\text{-C=N-}$); 40,5 ($\text{-CH}_2\text{-NH-}$); 63,5 ($\text{-O-CH}_2\text{-}$); 126,2 ($\underline{\text{CH}}_2\text{=C-}$); 136,0 ($\text{=C(CH}_3\text{)-}$); 155,7 ($\text{-N=C(CH}_3\text{)}_2$); 161,0 (-NH-C(=O)O-), 167,3 (-C(=O)O-).

IR-TF (cm^{-1}): 1 550 (NH); 1 630 (C=C); 1 700 (C(=O)-O); 1 740 (NH-C(=O)); 3 350 (NH)

—— **Microsphères à base de divinylbenzène** ——



Mode opératoire :

27,5 mmol de divinylbenzène ou de co-monomère, 66 mg (0,4 mmol) d'azobis(isbutyronitrile) et 11,5 mL d'acétonitrile sont placés dans un ballon bouché par un septum. Le ballon est laissé 4 jours sous agitation orbital à 30 tours.min⁻¹ (Edmund Bühler GmbH – TH 15) thermostaté à 40 °C (Edmund Bühler GmbH – KS-15 CONTROL). Les particules sont isolées par filtration sous vide sur membrane 0,5 µm puis lavées successivement 3 fois au tétrahydrofurane et enfin séchées sous vide une journée à température ambiante.

1. Zheng, S.; Bennett, G. A., US 0064324, 2005.
2. Guise, G. B.; Jackson, M. B.; McLaren, J. A. *Aust. J. Chem.* 1972, 25, (12), 2583-2595.
3. Sadoun, T.; Clouet, G.; Brossas, J. *Makromolekulare Chemie* 1987, 188, (6), 1367-1373.

Conclusions générales

Dans le but de pouvoir disposer de polymères porteurs de fonctions isocyanate bloqué pendantes, nous nous sommes intéressés au développement de méthodes de synthèse de polymères réactifs à partir du monomère commercial méthacrylate de 2-isocyanatoéthyle.

Pour pouvoir utiliser ces polymères au contact de biomolécules, il est souhaitable qu'ils soient solubles dans l'eau. La synthèse de composé isocyanate bloqué hydrosoluble est quasi exclusivement obtenue en utilisant un agent de blocage de la famille des bisulfites. Dans le but de protéger la fonction isocyanate de l'IEM et donc d'obtenir un monomère bloqué hydrosoluble, l'IEM a été mis en présence d'une solution de métabisulfite de potassium dans l'eau. Cette réaction n'a pas permis d'isoler le monomère protégé mais a conduit à la formation d'un hydrogel, qui après analyse par spectroscopie RMN ^{13}C quantitative, possède un taux important de fonctions isocyanate bloqué $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{SO}_3^-$. Cet hydrogel, conservable sous voie sèche, présente un très bon comportement de gonflement dans l'eau.

Pour obtenir un monomère isocyanate bloqué hydrosoluble, nous avons eu recours au 4-hydroxybenzènesulfonate de sodium comme agent de blocage alternatif. La synthèse et la caractérisation d'un composé modèle a permis de mettre en place un protocole expérimental simple et rapide. La réactivité de ce composé modèle vis-à-vis d'une amine aliphatique à température ambiante dans l'eau a été démontrée. Ces résultats ont conduit à la synthèse d'un monomère IEM bloqué hydrosoluble. Après polymérisation radicalaire dans l'eau, la réactivité des fonctions isocyanate bloqué, présentes sur le polymère, vis-à-vis d'une amine aliphatique a également été montrée.

Enfin, dans le cadre de couplage de biomolécules sur des polymères solides, nous avons développé la synthèse de particules micrométriques à base de divinylbenzène et de monomères IEM bloqué. Ces particules sont obtenues par polymérisation-précipitation radicalaire dans l'acétonitrile. L'analyse spectroscopique IR-TF des particules montre la présence de bandes caractéristiques des carbonyles propres au monomère IEM protégé. Afin de déterminer le taux de fonctions disponibles à la surface de ces objets, une étude du couplage de la 1-pyrèneméthylamine suivie par spectroscopie de fluorescence est actuellement en cours.

Polymères Réactifs à Base d'Isocyanates Bloqués :
Développement de Méthodologies de Synthèses pour la Bioconjugaison

Résumé : L'utilisation du méthacrylate de 2-isocyanatoéthyle (IEM), dérivé commercial, a permis le développement de trois architectures polymères fonctionnalisées par un isocyanate bloqué. Un hydrogel fonctionnalisé par des groupements -NH-C(=O)-SO_3^- a été synthétisé à partir de l'IEM et du métabisulfite de potassium. Cet hydrogel présente un degré de fonctionnalisation important, un bon comportement au stockage sous voie sèche ainsi qu'une très bonne capacité au gonflement dans l'eau. Le recours à un agent de blocage alternatif a permis la protection de l'IEM et l'obtention d'un monomère hydrosoluble qui a été polymérisé par voie radicalaire dans l'eau. La réactivité de ce polymère vis-à-vis d'amines aliphatiques dans l'eau a été démontrée. Enfin, le blocage de l'IEM par le phénol ou l'acétone oxime a permis l'obtention de microsphères à base de divinylbenzène, fonctionnalisées par un isocyanate bloqué.

Mots-clés : chimie des polymères, isocyanates bloqués, bioconjugaison, polymère hydrosoluble, hydrogel réactif, microsphères réactives.

Reactive Polymers Based on Blocked Isocyanates :
Development of Synthetic Methods for Bioconjugation

Abstract : Three polymer architectures containing blocked isocyanate functionalities were developed during this work, based on 2-isocyanatoethyl methacrylate (IEM). A -NH-C(=O)-SO_3^- functionalized hydrogel was synthesized from IEM and potassium metabisulfite. This hydrogel features significant functionalization degree, acceptable storage under dry condition, as well as considerable swelling when immersed in water. Direct protection of the IEM monomer was made possible *via* an alternative blocking agent, yielding a hydrosoluble monomer that was polymerized in water under free-radical conditions. The reactivity of the obtained polymer towards primary amines in water was substantiated. Finally, IEM blocking using phenol or acetone oxime led to divinylbenzene-based microspheres containing reactive blocked isocyanates.

Keywords: polymer chemistry, blocked isocyanates, bioconjugation, hydrosoluble polymer, reactive hydrogel, reactive microspheres.