



**HAL**  
open science

# Préparation de structures amphiphiles de type télomère ou polymère. Applications au domaine biomédical pour la stabilisation de protéines membranaires et le transport de principes actifs

Fabrice Giusti

► **To cite this version:**

Fabrice Giusti. Préparation de structures amphiphiles de type télomère ou polymère. Applications au domaine biomédical pour la stabilisation de protéines membranaires et le transport de principes actifs. Chimie organique. Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, 2000. Français. NNT: . tel-02899603

**HAL Id: tel-02899603**

**<https://theses.hal.science/tel-02899603>**

Submitted on 15 Jul 2020

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

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

ACADEMIE D'AIX MARSEILLE  
UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

# THESE

présentée à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse  
pour obtenir le diplôme de Docteur en Sciences

SPECIALITE : CHIMIE ORGANIQUE

**Préparation de structures amphiphiles de type télomère ou polymère.  
Applications au domaine biomédical pour la stabilisation de protéines  
membranaires et le transport de principes actifs.**

Par

**Fabrice GIUSTI**

Soutenue le 21 décembre 2000 devant le Jury composé de :

**MM. :**

<b>BAUDUIN</b>	Gérard	Maître de conférence HDR Ecole Nationale Supérieure de chimie de Montpellier	Rapporteur
<b>POPOT</b>	Jean-Luc	Directeur de recherche CNRS UPR 9052 IBPC (Paris)	Examineur
<b>PUCCI</b>	Bernard	Professeur Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse	Directeur de thèse
<b>SELB</b>	Joseph	Chargé de recherche HDR CNRS, ICS Université Louis Pasteur de Strasbourg	Rapporteur
<b>TRIBET</b>	Christophe	Chargé de recherche CNRS, ESPCI (Paris)	Examineur

*à ma famille, à mes amis.*

## Remerciements

*Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à monsieur le professeur Bernard Pucci qui m'a fait confiance et qui m'a permis d'effectuer ma thèse dans son laboratoire. Il a su guider mon travail avec beaucoup de patience en me faisant bénéficier de sa grande expérience scientifique.*

*Je le remercie vivement pour son exceptionnelle disponibilité et la générosité dont il a fait preuve à mon égard, en m'apportant le soutien financier nécessaire durant ces trois années.*

*Je remercie monsieur Ange Polidori dont les conseils pratiques et la bonne humeur ont accompagné mes premiers pas dans la recherche.*

*Je remercie monsieur Jean-Luc Popot, Directeur de recherche du CNRS à l'institut de biologie physico-chimique UPR 9052, qui me fait l'honneur de sa présence au sein de ce jury.*

*Je remercie vivement les membres de son équipe qui ont activement participé au travail décrit dans la deuxième partie de cet ouvrage. Je tiens à remercier pour cela, tout particulièrement monsieur Yan Gohon et madame Delphine Chavrolin.*

*Je remercie monsieur Christophe Tribet Chargé de recherche du CNRS à l'ESPCI qui a accepté de faire partie de ce jury. Il a pleinement contribué à rendre la collaboration Paris-Avignon particulièrement fructueuse.*

*Je remercie vivement mademoiselle Carla Prata pour la quantité et la qualité de travail qu'elle a su apporter lors des études biologiques effectuées sur les composés décrits dans la deuxième partie de l'exposé.*

*Je remercie madame Françoise Candau, Directeur de recherche du CNRS de l'Institut Charles Sadron à Strasbourg, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir permis d'y effectuer un stage.*

*Stage au cours duquel, monsieur Joseph Selb chargé de recherche du CNRS de l'Institut Charles Sadron, a su m'apporter par ses judicieux conseils scientifiques, avec beaucoup d'humour et de gentillesse, une aide précieuse. Je lui en suis extrêmement reconnaissant.*

*Je le remercie encore une fois pour avoir accepté de corriger et juger mon travail en étant rapporteur du jury.*

*Je tiens à remercier aussi madame Nicole Benoît pour les mesures de viscosité effectuées avec les solutions des produits décrits dans la troisième partie de l'exposé.*

*Monsieur Gérard Bauduin, Maître de conférences à l'ENS Chimie de Montpellier, a bien voulu participer à ce jury en étant rapporteur de ce travail. Je le remercie sincèrement.*

*J'adresse mes sincères remerciements à :*

*Monsieur Philippe Barthélémy pour ses précieux conseils et ses indiscutables qualités humaines.*

*Madame Christine « you're the sunshine of our life » Contino-Pépin pour son extrême gentillesse et son sourire rayonnant, illuminant nos jours les plus sombres.*

*Madame Anne-Sylvie « pomme-pomme girl n°1 » Tixier-Fabiano pour l'aide qu'elle m'a apportée et la sympathie qu'elle m'a témoignée.*

*Madame karine « j'ai la technique » Ruiz pour sa constante bonne humeur et son agréable sourire.*

*Mademoiselle Valérie « Allez l'oémeu ! » Tomao pour m'avoir éclairé sur la plupart des étranges coutumes footballistiques avec beaucoup de patience.*

*Mademoiselle Nathalie Mora dont la sensibilité et la gentillesse m'ont accompagné au cours de ces trois dernières années.*

*Messieurs Nicolas « hardy » Michel et Yan « Laurel » Chaudier pour leur aide et assistance informatiques.*

*Messieurs Michel Wathier et Emmanuel Petitcolas pour avoir su faire profiter l'ensemble du personnel, à maintes reprises, de leurs talents culinaires.*

*Messieurs Grégory « Harpo » Durand et Sylvain « Groucho » Jasseron pour former le duo de comiques le plus original du laboratoire. Leur humour délicat, recherché et raffiné, en fait des compagnons de paillasse exceptionnels et irremplaçables.*

*Monsieur Eric Salvant et Mademoiselle Sabine Mansis dont le travail sérieux effectué au cours de leur stage de DEA m'a permis d'accéder rapidement à des résultats.*

*Enfin, je voudrais remercier Mesdemoiselles Marie-Stephen « pomme-pomme-girl n°2 » Pistres, Sandrine « Jennifer Paige » Périno et Carole « mimi mathie » Mathe pour leur charmante, agréable et sympathique présence au sein de ce laboratoire.*

*Je vous souhaite à vous tous ainsi qu'à tous ceux que j'ai pu oublier une réussite socio-professionnelle totale et une vie longue et heureuse.*

## ABBREVIATIONS UTILISEES

AcOEt : Acétate d'éthyle

AcOH : Acide acétique

ACVA : Acide 4,4'-azobis(4-cyanovalérique)

AIBN : 2,2'-Azobis(isobutyronitrile)

APTS : Acide *para*-toluènesulfonique

Ara-C : Arabinofuranosyl cytosine

BR : Bactériorhodopsine

BHAM : 1,1-Bis(hydroxyméthyl)-1-méthyl-1-acrylamidométhane

$C_{ag}$  : concentration d'agrégation

$CBr_4$  : Tétrabromométhane

CCM : Chromatographie sur couche mince

$C_p$  : concentration en polymère

CHASPSO : 3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate

$CH_2Cl_2$  : Dichlorométhane

$CH_3CN$  : Acétonitrile

$CHCl_3$  : Chloroforme

CMC : Concentration micellaire critique

DABCO : Diaza bicyclo-2,2,2-octane

DCC : Dicyclohexylcarbodiimide

DDL : Détecteur à diffusion de la lumière

DDQ : 2,3-Dichloro-5,6-dicyanoquinone

DHP : 3,4-Dihydro-2*H*-pyrane

DHPC : 1,2-Dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

DIPEA : *N,N*-Diisopropyléthylamine

DMF : *N,N*-Diméthylformamide

DMPC : 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

DMSO : Diméthylsulfoxyde

$\overline{DP}_n$  : Degré de polymérisation moyen en nombre

$\overline{DP}_w$  : Degré de polymérisation moyen en poids

EEDQ : 2-éthoxy-1-éthoxycarbone-1,2-dihydroquinoléine

EtOH : Éthanol

F : point de fusion

5-Fu : 5-Fluorouracile

GPC : Chromatographie à gel de perméation (**Gel Permeation Chromatography**) (voire SEC)

HCl : Acide chlorhydrique

HG : 6-*O*-(*N*-**Heptyl**carbamoyl)-**methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside** ou Hecameg

HLB : Balance hydrophile/lipophile (**Hydrophile/Lipophile Balance**)

HMPA : Acide poly(acrylique) modifié hydrophobiquement (**Hydrophobically Modified Poly(Acrylic acid)**)

HOBT : 1-Hydroxybenzotriazole

HTAB : Bromure d'hexadécyltriméthylammonium (**HexadecylTrimethylAmmonium Bromide**)

LCST : Température critique minimale de solution (**Lower Critical Solution Temperature**)

LiAlH<sub>4</sub> : Hydrure d'aluminium lithium

LM : Laurylmaltoside

MAP : 2-Méthyl-2-acrylamido-1-propanol

$M_{app}$  : Masse apparente

MEM : Méthoxyéthylloxyméthyle

MeOH : Méthanol

MeONa : Méthylate de sodium

$\bar{M}_n$  : Masse moléculaire moyenne en nombre

$\bar{M}_w$  : Masse moléculaire moyenne en poids

NaH : Hydrure de sodium

$N_{ag}$  : Nombre d'agrégation

NMP : *N*-méthyl-2-pyrrolidone

OTG : 1-*S*-octyl- $\beta$ -D-thioglucopyranoside

PAA : Acide poly(acrylique) (**Poly(Acrylic Acid)**)

Pd/C : Palladium sur charbon

PM(s) : Protéine(s) membranaire(s)

PMMA : Poly(méthacrylate) de méthyle (**Poly(MethylMethAcrylate)**)

PC : Phosphatidylcholine

PS : Poly(styrène)

QELS : Diffusion quasi-élastique de la lumière (**Quasi-Elastic Light Scattering**)

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SDS : Dodécylsulfate de sodium (**Sodium DodecylSulfate**)

SEC : Chromatographie d'exclusion stérique (**Size Exclusion Chromatography**) (voire GPC)

*t*BuO<sup>-</sup>K<sup>+</sup> : *tertio*-Butylate de potassium

Tris : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

TEA : Triéthylamine

$T_{eb}$  : Température d'ébullition

TFA : Acide trifluoroacétique (**TriFluoroacetic Acid**)

THAM : Tris(hydroxyméthyl)acrylamidométhane

THF : Tétrahydrofurane

THP : Tétrahydropyrane



## PREAMBULE

Le travail rapporté dans ce mémoire en vue de l'obtention du titre de docteur de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, a donné lieu à :

- une communication orale : F. Giusti & B. Pucci, *Synthèse d'amphipol utilisables pour la stabilisation en solution aqueuse de protéine membranaires*. Réunion plénière GDR 690-692, Décembre 1999.

- une communication par affiche : F. Giusti, C. Prata, Y. Gohon, C. Tribet, J.L. Popot, B. Pucci, *Synthèse et études biologiques de nouveaux amphipols non ioniques dérivés du Tris(hydroxyméthyl)aminométhane*, 13<sup>ème</sup> journée de la chimie SFC-PACA, Mars 2000.

- un soumis pour publication : C. Prata, F. Giusti, Y. Gohon, B. Pucci, J.L. Popot, C. Tribet, *Non-ionic amphiphilic polymers derived from Tris(hydroxymethyl)acrylamidomethane keep membrane proteins soluble and native in the absence of detergent*. *Biopolymers*.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>1</b>
<i>Les polymères amphiphiles associatifs, de nouvelles structures aux potentialités illimitées</i>	
<b>I. LES TENSIOACTIFS OU SURFACTANTS : DESCRIPTION ET PROPRIÉTÉS CHIMIQUES.....</b>	<b>5</b>
<b>II. EXTRACTION ET PURIFICATION DES PROTÉINES MEMBRANAIRES.....</b>	<b>9</b>
<b>III. LA VECTORISATION DE PRINCIPES ACTIFS.....</b>	<b>16</b>
<b>IV. LES POLYMÈRES AMPHIPHILES ASSOCIATIFS.....</b>	<b>21</b>
<b>CHAPITRE I .....</b>	<b>35</b>
<i>Cinétique de polymérisation et de télomérisation du Tris(hydroxyméthyl)acrylamidométhane</i>	
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>36</b>
<b>II. RAPPEL SUR LES NOTIONS DE TÉLOMÉRISATION.....</b>	<b>42</b>
<b>1. Description des différentes étapes d'une réaction de télomérisation .....</b>	<b>42</b>
<b>2. Expression cinétique des différentes étapes .....</b>	<b>44</b>
2.1. Étape d'initiation .....	44
2.2. Étape de propagation .....	44
2.3. Étape de terminaison .....	45
2.4. Étape de transfert .....	46
<b>3. Évolution des concentrations en réactif .....</b>	<b>46</b>
3.1. Évolution de la concentration en initiateur.....	47
3.2. Évolution de la concentration en monomère .....	47
3.3. Évolution de la concentration en télogène.....	47
3.4. Détermination de la constante $f k_p^2 / k_t$ .....	48
<b>4. Description des réactions de télomérisation des monomères dérivant du THAM .....</b>	<b>49</b>

**III. PRÉSENTATION DU PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL ET DE LA MÉTHODE SUIVIE..... 50**

**IV. SYNTHÈSE ET ÉTUDES DES CINÉTIQUES DE TÉLOMÉRISATION DU THAM ET DE SES DÉRIVÉS ..... 52**

**A. Etude de l'influence des fonctions hydroxyles sur les cinétiques de polymérisation du THAM..... 52**

**1. Synthèse et étude cinétique du THAM et de ses analogues mono- ou dihydroxylés 53**

1.1. Synthèse du THAM ..... 53

1.2. Cinétique de polymérisation du THAM ..... 53

1.2.1. Cinétique de télomérisation du THAM dans le méthanol ..... 53

1.2.2. Cinétique de polymérisation du THAM dans l'eau ..... 54

1.3. Synthèse et étude cinétique du bis(hydroxyméthyl)méthylacrylamidométhane (BHAM) **1**..... 60

1.3.1. Synthèse du BHAM..... 60

1.3.2. Etudes cinétiques du BHAM ..... 61

1.4. Synthèse et études cinétiques du 2-méthyl-2-acrylamidopropanol (MAP) **2**..... 61

1.4.1. Synthèse du MAP..... 61

1.4.2. Etudes cinétiques du MAP ..... 62

**2. Synthèse et études cinétiques de monomères dérivés du THAM..... 63**

2.1. Synthèse des monomères ..... 64

2.1.1. Synthèse des monomères protégés par cétylation ..... 64

2.1.1.1. Synthèse du THAM isopropylidène **3**..... 64

2.1.1.2. Synthèse du THAM isopropylidène acétylé **4**..... 64

2.1.2. Synthèse des composés protégés par acétylation..... 65

2.1.2.1. Synthèse du dérivé monoacétylé **5** ..... 65

2.1.2.2. Synthèse du dérivé diacétylé **6** ..... 65

2.1.2.3. Synthèse du dérivé triacétylé **7**..... 69

2.1.3. Synthèse des dérivés protégés par acétylation ..... 69

2.1.3.1. Synthèse du dérivé monotétrahydropyranyle (THAM monoTHP) **11**..... 71

2.1.3.2. Synthèse du dérivé ditétrahydropyranyle (THAM diTHP) **12**..... 73

2.1.3.3. Synthèse du dérivé tritétrahydropyranyle (THAM triTHP) **13**..... 74

2.2. Etudes des cinétiques de polymérisation des monomères dérivés du THAM..... 75

**3. Synthèse et études cinétiques du THAM triméthoxylé **16**..... 83**

3.1. Synthèse du THAM triméthoxylé..... 83

3.2. Cinétique de polymérisation du THAM triméthoxylé..... 85

**4. Conclusion..... 85**

**B. Synthèse et études cinétiques des dérivés du Tris(hydroxyméthyl)-N-méthylacrylamidométhane ..... 91**

**1. Essai de synthèse du THAM N-méthyl par condensation du Tris N-méthyl sur le chlorure d'acryloyle ..... 91**

1.1. N-méthylation du Tris..... 91

1.1.1. Tentative de N-méthylation du Tris par action d'un agent alkylant .....	91
1.1.2. N-alkylation du Tris par amination réductive du formaldéhyde.....	92
1.2. Formation et essai de réduction du Tris(hydroxyméthyl)formamidométhane <b>17</b> ....	97
1.2.1. Formation du Tris(hydroxyméthyl)formamidométhane <b>17</b> .....	97
1.2.2. Réduction du Tris(hydroxyméthyl)formamidométhane <b>17</b> .....	98
1.3. Formation et réduction des dérivés du Tris(hydroxyméthyl)formamidométhane..	100
1.3.1. Formation des dérivés du composé <b>17</b> .....	100
1.3.1.1. Synthèse du Tris(acétoxyméthyl)formamidométhane <b>18</b> .....	100
1.3.1.2. Synthèse du 2,2-diméthyl-5-formylamido-5-hydroxyméthyl 1,3-dioxane <b>19</b> .....	101
1.3.1.3. Synthèse du tris(tétrahydropyraniloxy)méthyl)formylamidométhane <b>21</b> ....	102
1.3.1.4. Formation d'un dérivé tritrylé .....	103
1.3.2. Réduction des dérivés du composé <b>17</b> .....	104
1.3.2.1. Réduction du composé <b>18</b> .....	106
1.3.2.2. Réduction du composé <b>19</b> .....	106
1.3.2.3. Réduction des dérivés O-tétrahydropyranyles .....	107
1.3.2.4. Réduction des dérivés tritylés .....	108
<b>2. Condensation d'un groupement acryloyle sur le N-méthyl TRIS et ses dérivés ....</b>	<b>109</b>
2.1. Essais de synthèse du tris(hydroxyméthyl)-N-méthylacrylamidométhane .....	109
2.2. Synthèse du THAM isopropylidène N-méthylé <b>27</b> .....	110
2.3. Synthèse du THAM tri-O-tétrahydropyranyle N-méthylé <b>29</b> .....	112
<b>3. N-Méthylation du THAM.....</b>	<b>114</b>
3.1. Formation et méthylation des dérivés tri-O-R.....	115
3.2. Formation et méthylation des dérivés iso-O-R.....	118
<b>4. Cinétique de polymérisation du THAM isopropylidène N-méthylé.....</b>	<b>123</b>
4.1. Cinétique de télomérisation du THAM isopropylidène <b>3</b> et du THAM isopropylidène-N-méthylé <b>27</b> dans le THF .....	125
4.2. Cinétique de polymérisation du THAM isopropylidène <b>3</b> et du THAM isopropylidène-N-méthylé <b>27</b> dans l'acétonitrile .....	126
<b>V) CONCLUSION.....</b>	<b>128</b>

## **CHAPITRE II.....130**

### *Synthèse et études des propriétés biologiques d'amphipols dérivés du THAM.*

#### **I. INTRODUCTION..... 131**

#### **II. SYNTHÈSE D'AMPHIPOLS NEUTRES DÉRIVÉS DU THAM..... 141**

##### **1. Stratégie de synthèse envisagée .....141**

##### **2. Synthèse d'amphipol par cotélomérisation de monomères dérivés du THAM .....144**

###### 2.1. Synthèse des monomères.....145

###### 2.1.1. Synthèse des monomères porteurs de chaîne grasse .....145

2.1.2. Synthèse de monomères destinés à constituer les parties hydrophiles de l'amphipol.....	148
2.1.3. Synthèse des formes protégées des monomères amphiphiles.....	151
2.1.3.1. Synthèse des dérivés amphiphiles monogalactosylés.....	151
2.1.3.2. Synthèse des dérivés amphiphiles digalactosylés.....	152
2.2. Synthèse des cotélomères.....	153
2.2.1. Procédé de synthèse.....	153
2.2.1.1. Synthèse d'amphipols neutres par cotélomérisation de dérivés acétylés du THAM.....	153
2.2.1.2. Synthèse d'amphipols neutres par cotélomérisation de dérivés du THAM protégés par cétalisation.....	156
2.2.2. Résultats obtenus et interprétation.....	159
2.2.2.1. Cotélomérisation de monomères non galactosylés.....	159
2.2.2.2. Cotélomérisation de monomères galactosylés.....	164
2.3. Conclusion.....	165
<b>3. Synthèse d'amphipols par modification chimique d'un homotélomère d'un dérivé du THAM.....</b>	<b>166</b>
3.1. Synthèse de l'homotélomère du THAM isopropylidène.....	166
3.2. Modification hydrophobe de l'homotélomère.....	167
3.3. Conclusion.....	169

### ***III. RÉSULTATS BIOLOGIQUES: Association de protéines membranaires avec des cotélomères amphiphiles. ....171***

<b>1. Solubilité des télomères en solution aqueuse.....</b>	<b>171</b>
<b>2. Essais préliminaires d'association d'une protéine hydrophobe, la bactériorhodopsine, avec des amphipols non ioniques.....</b>	<b>172</b>
<b>3. Études complémentaires de l'association de protéines hydrophobes avec les cotélomères amphiphiles dérivés du Tris.....</b>	<b>175</b>
3.1. Existence et solubilité des complexes.....	175
3.2. Déterminant de la polydispersion des associations amphipols-protéines formées et de leur stabilité après élimination de l'excès de polymère.....	178
3.3. Mesures de l'activité enzymatique du cytochrome $b_6f$ .....	179
<b>4. Conclusion.....</b>	<b>182</b>

### ***IV. ANALYSE DE LA COMPOSITION DES SOLUTIONS AQUEUSES D'AMPHIPOLS ET DES COMPLEXES AMPHIPOLS/PROTÉINE PAR DIFFUSION QUASI ÉLASTIQUE DE LA LUMIÈRE (Q.E.L.S.) ..... 184***

<b>1. Principe et théorie de la diffusion quasi-élastique de la lumière.....</b>	<b>184</b>
<b>2. Calcul des différentes valeurs accessibles par analyse de l'intensité diffusée.....</b>	<b>185</b>
<b>3. Analyse de l'intensité diffusée par les solutions d'amphipols neutres dérivés du Tris.....</b>	<b>186</b>
<b>4. Analyse des associations amphipols/protéines par Q.E.L.S.....</b>	<b>188</b>

<i>V. CONCLUSION</i> .....	191
----------------------------	-----

## **CHAPITRE III**.....193

### *Synthèses et études des propriétés rhéologiques de polymères associatifs dérivés du Tris.*

<i>I. INTRODUCTION</i> .....	194
------------------------------	-----

1. Vecteurs macromoléculaires .....	195
2. Vecteurs vésiculaires .....	199
3. Les vecteurs de type virosomes .....	202
4. Les vecteurs micellaires .....	203
5. Les vecteurs de type hydrogels.....	207
6. Les vecteurs micellaires polymères pluricompartimentaux.....	211

<i>II. SYNTHÈSE DE POLYMÈRES AMPHIPHILES ASSOCIATIFS DÉRIVÉS DU TRIS</i> .....	214
--	-----

1. Méthode de synthèse envisagée .....	214
2. Synthèse des homopolymères par polymérisation radicalaire .....	216
2.1. Mise au point de la réaction de polymérisation des dérivés protégés du THAM .....	216
2.2. Synthèse et modification hydrophobe des homopolymères du THAM isopropylidène .....	220
2.3. Déprotection des polymères modifiés et obtention des poly(Tris) amphiphiles ....	223
3. Conclusion.....	225

<i>III. ÉTUDES DES PROPRIÉTÉS RHÉOLOGIQUES DES POLYMÈRES AMPHIPHILES DÉRIVÉS DU TRIS</i> .....	227
--	-----

<i>A. Quelques notions de base en rhéologie</i> .....	227
---	-----

1. Généralités-définitions .....	227
2. Mesure des viscosités.....	228
2.1. Viscosité apparente.....	228
2.2. Viscosités réduites et intrinsèques .....	230

<i>B. Études rhéologiques</i> .....	231
-------------------------------------	-----

1. Mesures des viscosités apparentes .....	231
--	-----

1.1. Évolution de la viscosité en fonction du gradient de vitesse de cisaillement.....	231
1.2. Évolution de la viscosité apparente en fonction de la concentration en polymère .....	235
<b>2. Mesure de la viscosité réduite .....</b>	<b>236</b>
2.1. Mesure de la viscosité réduite du polymère <u>114''/12/C<sub>11</sub></u> .....	236
2.2. Mesure de la viscosité réduite de l'homopoly(Tris) <u>117</u> .....	239
<b>3. Étude des propriétés rhéologiques des poly(Tris) obtenus après précipitation des phases aqueuses .....</b>	<b>241</b>
<b>4. Conclusion.....</b>	<b>244</b>
<b><i>IV) CONCLUSION.....</i></b>	<b>246</b>
<b><i>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</i></b>	<b>248</b>
<b><i>PARTIE EXPÉRIMENTALE.....</i></b>	<b>253</b>
<b><i>I. MÉTHODES GÉNÉRALES.....</i></b>	<b>254</b>
<b><i>II. SYNTHÈSE DES MONOMÈRES.....</i></b>	<b>256</b>
<b><i>III. EXPÉRIENCE DE CINÉTIQUE DE POLYMÉRISATION.....</i></b>	<b>296</b>
<b><i>IV. SYNTHÈSE DES AMPHIPOLS NEUTRES.....</i></b>	<b>300</b>
<b><i>V. ÉTUDES DES PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES DES AMPHIPOLS NEUTRES....</i></b>	<b>305</b>
<b><i>VI. ANALYSES Q.E.L.S. DES SOLUTIONS AQUEUSES DES AMPHIPOLS NEUTRES ET DES AMPHIPOLS CHARGÉS ET DES COMPLEXES FORMÉS AVEC LES PROTÉINES.....</i></b>	<b>306</b>
<b><i>VII. SYNTHÈSE DES POLYMÈRES AMPHIPHILES DÉRIVÉS DU TRIS.....</i></b>	<b>309</b>
<b><i>VIII. ANALYSE DES MASSES MOLAIRES DES HOMOPOLYMÈRES PROTÉGÉS.....</i></b>	<b>312</b>
<b><i>BIBLIOGRAPHIE.....</i></b>	<b>314</b>
<b><i>RÉCAPITULATIF DES FORMULES DES PRINCIPAUX COMPOSÉS.....</i></b>	<b>342</b>

***RÉSUMÉ*..... 346**

***ABSTRACT*..... 347**



# **INTRODUCTION**

## **GÉNÉRALE**

*Les polymères amphiphiles associatifs, de  
nouvelles structures aux potentialités  
illimitées.*

La compréhension et l'interprétation des phénomènes biologiques, de par leur complexité, ont toujours nécessité l'établissement de collaborations interdisciplinaires. Les compétences requises dans un tel domaine sont en effet multiples et variées. Le chimiste en particulier, peut y jouer un rôle non seulement dans le paramétrage des phénomènes mais également pour l'élaboration « d'outils » utiles voire indispensables au bon déroulement des recherches biologiques. C'est dans cette optique que de nombreux travaux ont été réalisés au cours de ces deux dernières décennies dans la conception, la synthèse et l'étude physico-chimique et biologique de substrats amphiphiles utilisables pour la vectorisation de principes actifs<sup>1-3</sup> ou pour l'extraction, la purification et l'analyse des protéines<sup>4-6</sup>.

Les molécules dites amphiphiles, de structure et de nature très différentes les unes des autres, sont ainsi nommées car elles présentent un tropisme à la fois pour les milieux aqueux et huileux. Elles sont toutes constituées d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe bien distinctes l'une de l'autre. Cette particularité structurale confère à l'édifice moléculaire des propriétés physico-chimiques très intéressantes (ces propriétés seront explicitées ultérieurement dans l'exposé) largement mises en jeu dans le milieu naturel. Par analogie, les scientifiques ont très vite compris l'intérêt qu'ils pouvaient avoir à utiliser de telles structures dans l'étude des processus biologiques et dans le transport des principes biologiquement actifs.

La vectorisation de principe actif, ce procédé qui consiste à véhiculer *in vivo* certaines substances jusqu'à une cellule cible, pourrait en effet se définir grossièrement comme une solution aux problèmes de toxicité posés par des traitements médicaux peu spécifiques et coûteux. C'est le cas, par exemple, du traitement des cancers par chimiothérapie où les substances utilisées sont rarement spécifiques de la cellule malade, leur action cytotoxique pouvant s'exercer aussi sur des cellules saines. Par ailleurs, il faut se rappeler que l'efficacité d'un principe actif n'est pas seulement limitée par son manque de sélectivité mais aussi par sa stabilité dans le milieu physiologique. Dans ces conditions, si l'on dispose d'une structure hôte pouvant d'une part assurer le transport *in vivo* d'un principe actif ainsi que sa distribution sélective au niveau de la cellule cible et d'autre part capable de retarder et d'empêcher la dégradation de cette même substance par des intervenants endogènes (anticorps, enzymes...), il est alors envisageable d'utiliser un médicament sans risque d'effets secondaires et à moindre coût. La sélectivité introduite permet dès lors de limiter les doses nécessaires au seuil d'efficacité souhaité.

C'est dans cet objectif que le concept de vectorisation-ciblage a été développé. Toutefois, les progrès réalisés dans ce domaine sont directement liés à une meilleure compréhension des

mécanismes régissant la fixation d'un substrat exogène tel qu'un agent pathogène (virus, bactéries) ou un système moléculaire vectoriel sur une cellule cible et notamment une meilleure connaissance des composants de la membrane plasmique et de la relation structure-activité de ses composants. La collaboration entre les services de biologie et les laboratoires de chimie se révèle à nouveau nécessaire. Les molécules synthétisées devront dès lors favoriser, faciliter, permettre la compréhension des mécanismes qui régissent les processus de reconnaissance membranaire et donc autoriser l'isolement des facteurs protéiques ou glycolipidiques impliqués. Ces molécules, dans la plupart des cas, mimeront la structure originelle des membranes cellulaires hôtes et, dès lors, seront à nouveau des agents amphiphiles.

En effet, si la cellule chez les êtres vivants est définie comme étant un espace clos, la bicouche phospholipidique constituant la membrane est cependant le lieu d'un échange perpétuel entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire. Ces échanges indispensables aux fonctions biologiques de la cellule (échange de nutriments, métabolites, anions, cations) sont essentiellement assurés par des protéines ou des glycoprotéines (protéines membranaires) dans la membrane cellulaire. Certaines de ces protéines interviennent aussi en tant que récepteurs spécifiques de substances chimiques appelées messagers chimiques (tels que les hormones par exemple) et sont aussi impliquées dans les mécanismes de reconnaissance cellulaire où elles déterminent les propriétés antigéniques de la cellule. Elles sont alors des sites d'ancrage potentiels de certains virus ou de certains systèmes moléculaires vectoriels.

Parmi les nombreuses protéines contenues dans une membrane biologique, quelques-unes ou une seule présenteront les propriétés recherchées. Il est donc nécessaire d'isoler ces ou cette protéine(s) du reste des constituants cellulaires. Le biologiste doit de ce fait disposer d'outils généralement issus d'un développement mené en laboratoire de chimie, lui permettant d'extraire une protéine de son milieu naturel puis de la conserver sous sa forme native et lui permettre *in fine* de la caractériser.

La vectorisation de principes actifs et l'étude des protéines membranaires ont motivé une quantité de travail très importante. De nombreuses structures, destinées à assurer l'extraction des protéines hydrophobes et leur maintien dans un environnement non dénaturant ou destinées à permettre le transport *in vivo* d'une substance active vers un organe cible, ont été proposées.

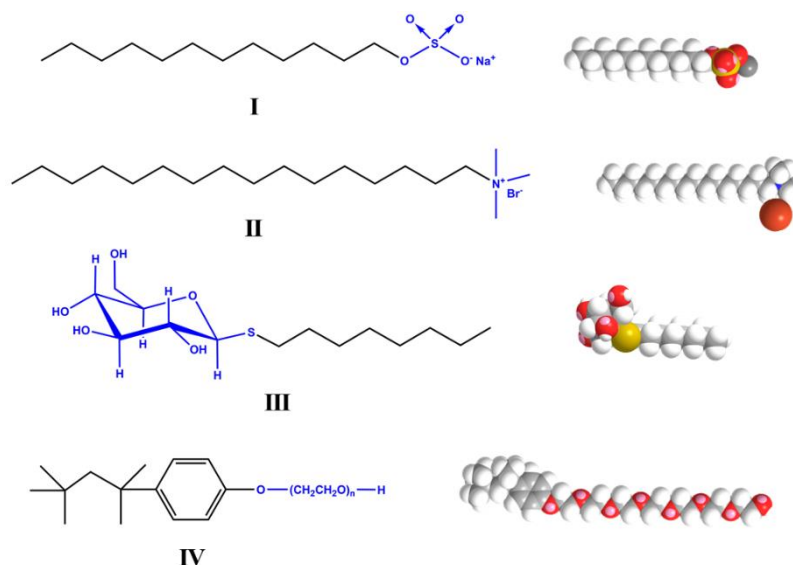
Dans ce domaine de recherche, nous avons choisi de porter notre attention sur les potentialités des polymères amphiphiles hydrosolubles. Il a été en effet récemment montré que certains de ces

polymères baptisés "amphipols" se sont révélés efficaces pour maintenir des protéines hydrophobes en solution aqueuse sous leur forme native<sup>7-9</sup>. Par ailleurs, il a également été envisagé d'utiliser ces polymères susceptibles de former des microdomaines hydrophobes dans l'eau, pour solubiliser et transporter des principes actifs hydrophobes<sup>10</sup>.

Mais, afin de mieux comprendre l'intérêt de ces structures originales, il apparaît impératif de rappeler dans un premier temps les principales méthodes mises en œuvre pour isoler les protéines et celles permettant de transporter un principe actif. Il faut de plus savoir à quoi correspond un polymère amphiphile associatif, quelles peuvent être sa structure et ses propriétés et donc en fait définir les caractéristiques et propriétés des tensioactifs.

## I) LES TENSIOACTIFS : DESCRIPTION ET PROPRIÉTÉS CHIMIQUES

Un tensioactif est un composé constitué comme tous les agents amphiphiles, d'une partie hydrophobe et d'une partie hydrophile. La structure est généralement une structure dibloc. On distingue la tête polaire ionique (sulfonate, carboxylate, ammonium) ou non ionique (sucre, polyoxyéthylène) de la queue apolaire (généralement perhydrocarbonée et dans certains cas perfluorocarbonée) (cf. figure 1).



**Figure 1** : Exemples de tensioactifs monocaténaux formant des micelles et modèles moléculaires correspondants.

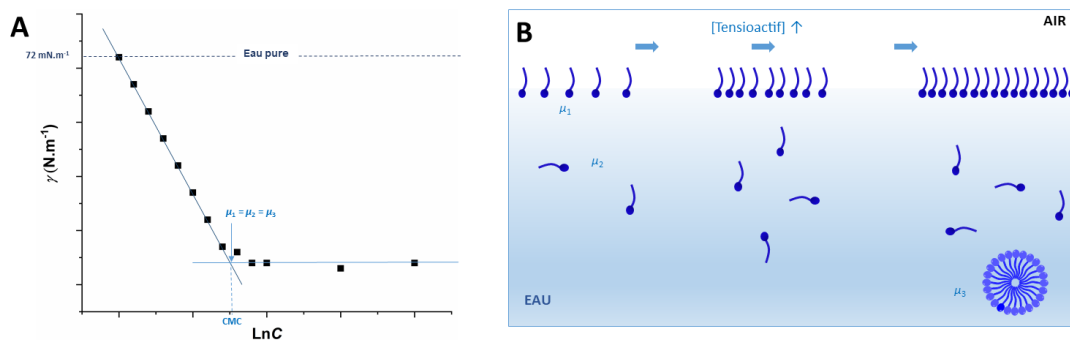
Les structures présentées sur cette figure sont parmi les détergents les plus communément utilisés dont un tensioactif anionique, le dodécylsulfate de sodium (**I**) (SDS), un tensioactif cationique, le bromure d'hexadécyltriméthylammonium (**II**) (HTAB), deux tensioactifs neutres, le  $\beta$ -D-thiooctylglucoside (**III**) (OTG) et un dérivé poly(oxyéthylénique) du 4-isooctylphénol ou triton (X-114 avec  $n \sim 7-8$ ) (**IV**). Les parties polaires de chaque amphiphile sont identifiées en bleu. Les modèles tridimensionnels (3-D) ont été obtenus en optimisant les structures à l'aide du logiciel Chem-3D en appliquant le champ de force MM2. Ils sont représentatifs des structures prises dans leur premier puits de potentiel à l'état gazeux et ne préfigurent pas l'état solvaté des molécules.

En solution aqueuse, les molécules de tensioactifs s'orientent préférentiellement en formant à la surface du liquide une couche généralement monomoléculaire (partie hydrophobe orientée vers l'air et tête polaire dans l'eau) qui provoque une diminution de la tension superficielle du liquide proportionnelle à la concentration en tensioactif suivant la loi de Gibbs<sup>11</sup> (équation 1).

$$\Gamma = -\frac{c}{RT} \cdot \frac{d\gamma}{dc} \quad (1)$$

Avec  $\Gamma$  l'excès superficiel par unité de surface (en mol.m<sup>-2</sup>),  $C$  la concentration en tensioactif (en mole/m<sup>3</sup>),  $\gamma$  la tension superficielle (en N.m<sup>-1</sup>),  $R$  la constante des gaz parfaits (8.32 J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>) et  $T$  la température absolue (°K).

Au-delà d'une certaine concentration appelée concentration micellaire critique (CMC), se produit un phénomène nouveau : l'agrégation des molécules de tensioactifs au sein de la solution aqueuse en micelles. Les têtes polaires sont alors orientées à l'extérieur des micelles, au contact de l'eau, et le cœur est constitué par les chaînes hydrophobes. La formation des micelles peut être considérée comme un mécanisme permettant de diminuer l'énergie interfaciale du tensioactif lorsque les potentiels chimiques des molécules adsorbées à l'interface s'équilibrent avec ceux des molécules en solution (cf. figure 2).



**Figure 2** : **A**/Evolution de la tension superficielle d'une solution aqueuse d'un tensioactif (dont la partie polaire est schématisée par une sphère et la partie hydrophobe par un segment courbe) en fonction de sa concentration. **B**/Evolution de la distribution du tensioactif à l'interface air-eau et dans la solution, en fonction de l'augmentation graduelle de sa concentration.

La formation des micelles est un phénomène régi par des facteurs entropiques, les arrangements supramoléculaires observés permettent en effet de minimiser l'accroissement d'enthalpie libre (et la baisse d'entropie) globale du système<sup>12,13</sup>.

La variation d'enthalpie libre standard de micellisation par molécule de tensioactif est donné par la relation suivante<sup>14</sup> :

$$\Delta G_m^\circ \approx RT \ln CMC \quad (2)$$

Avec  $R$  la constante des gaz parfait et  $T$  la température absolue du système.

L'énergie hydrophobe, notion introduite par Israelachvili<sup>15</sup>, représente l'énergie nécessaire pour hydrater une chaîne hydrocarbonée. Cette énergie a été estimée à 3448 J.mol<sup>-1</sup> par groupement méthylène. La longueur de la chaîne hydrophobe aura donc une forte influence sur l'ensemble des

propriétés du tensioactif et notamment sur la CMC qui décroît fortement lorsque le nombre de carbone de la chaîne augmente.

La température a elle aussi une influence sur la solubilité des tensioactifs. Kraft<sup>16</sup> a montré qu'un tensioactif peut exister sous forme de cristaux insolubles dans l'eau pour des températures inférieures à une certaine valeur bien déterminée alors que pour des températures supérieures à celle-ci la solubilité du tensioactif augmente rapidement. Cependant pour un tensioactif non ionique, au fur et à mesure que la température augmente l'agitation thermique devient de plus en plus importante et provoque un défaut d'hydratation des têtes polaires conduisant à l'accroissement de l'hydrophobie de la molécule et à une baisse de la solubilité; la solution de tensioactif se trouble et se sépare en deux phases. La démixtion se produit à une température critique ( $T_c$ ) appelée point de trouble<sup>17</sup>.

La géométrie du tensioactif a aussi généralement une influence sur le type d'agrégation formée en phase aqueuse qu'il est possible de prévoir en connaissant la valeur du paramètre d'empilement  $N_s$  du tensioactif<sup>15</sup>. Ce paramètre est défini par la relation suivante :

$$N_s = \frac{V_c}{a_0 \cdot l_c} \quad (3)$$

Avec  $V_c$ , le volume de la chaîne hydrophobe,  $a_0$ , l'aire par molécule de tensioactif à l'interface agrégat-solvant lorsque l'équilibre thermodynamique est atteint et  $l_c$ , la longueur de la chaîne hydrophobe.

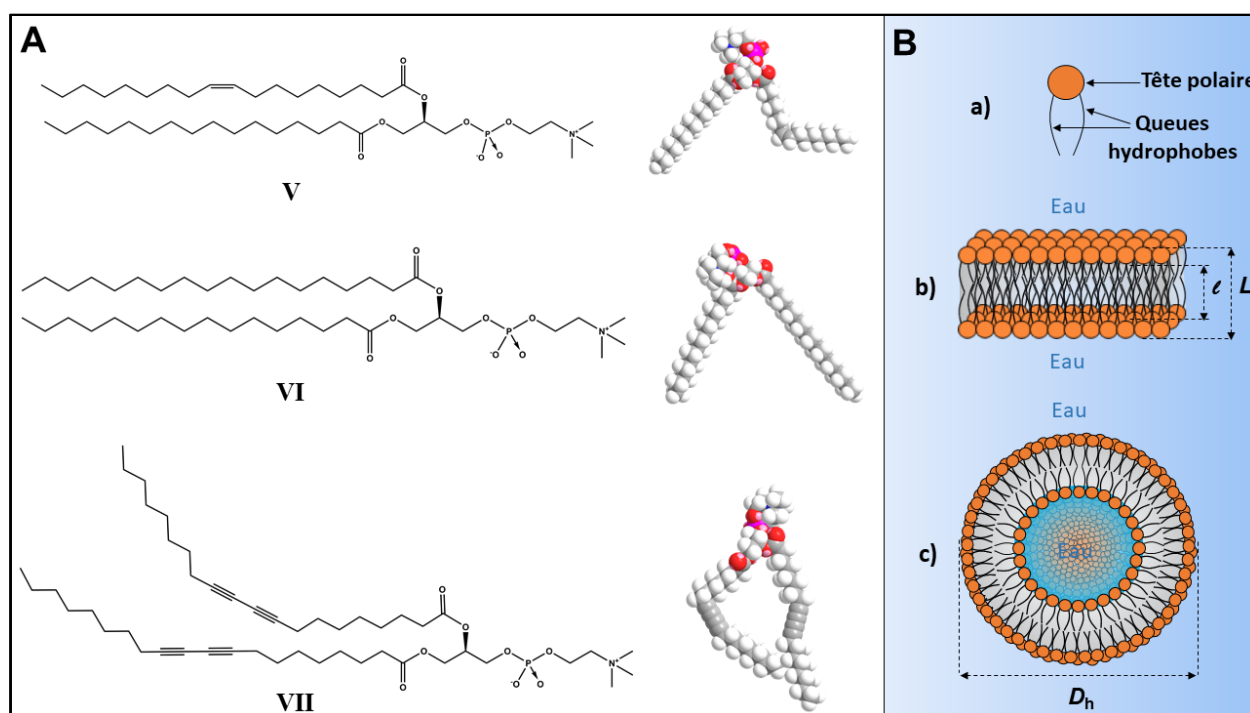
La valeur de ce paramètre pourra varier pour un même tensioactif en fonction du solvant dans lequel il se trouve et de la température de la solution.

Suivant la valeur de  $N_s$ , trois cas sont distingués :

- $N_s < 1/3$  et le tensioactif adopte dans ce cas une géométrie conique pour former, à la CMC et au-delà, des micelles sphériques. C'est le cas des tensioactifs monocaudaux dotés d'une tête polaire volumineuse.
- $1/3 < N_s < 1/2$  et le tensioactif adopte une géométrie de type cale pour former des micelles cylindriques.
- $N_s > 1/2$  et le tensioactif adopte dans ce cas une géométrie de type cylindrique pour former des bicouches ou des multicouches. C'est le cas des tensioactifs bicaudaux (dotés de deux

queues hydrophobes) qui peuvent et forment généralement dans l'eau des structures différentes des micelles.

Ainsi, les phospholipides qui sont des tensioactifs bicaudaux adoptant dans l'eau la géométrie globale d'un cylindre ou d'un cône tronqué, vont former en général des liposomes ou des vésicules plutôt que des micelles (cf. figure 3). Les liposomes sont des sphères creuses dont la membrane est constituée d'une ou plusieurs bicouches de tensioactifs et qui renferment en leur cœur de l'eau. De telles structures vésiculaires ont été découvertes par Bangham<sup>18</sup>.



**Figure 3 :** A/Exemple de tensioactifs (phosphoglycérolipides) formant des lamelles et des vésicules et modèles moléculaires correspondant. Deux lipides naturels, la 2-oléyl-1-palmitoyl-Sn-glycero-3-phosphocholine (V) et son analogue saturé la 1-palmitoyl-2-stéaroyl-Sn-glycero-3-phosphocholine (VI). Un lipide synthétique, la 1,2 bis-(10,12-triéicosadiynoyl)-Sn-glycero-3-phosphocholine<sup>19</sup> (VII). Les modèles moléculaires ont été obtenus avec le logiciel Chem-3D en appliquant le champ de force MM2 permettant d'optimiser les structures à l'état gaz (premier puit de potentiel de l'état non solvaté). B/Schématisation d'un lipide (a), d'une bicouche ( $\ell = 2,5-3,5$  nm ;  $L = 3,5-4,5$  nm) (b) et d'un liposome ou vésicule dont le diamètre hydrodynamique ( $D_h$ ) peut varier de 0,025 à 2,5  $\mu$  suivant le cas (c).

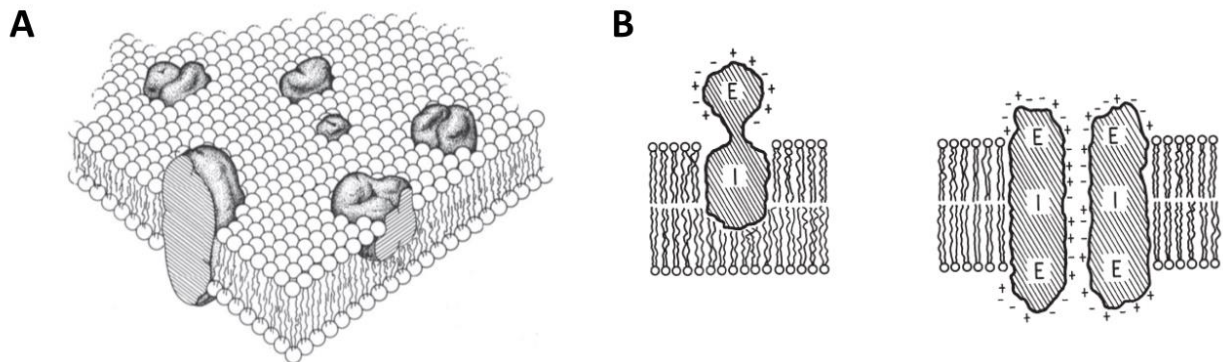
Nous avons exposé dans cette partie un rapide aperçu des propriétés et du comportement en solution aqueuse des structures amphiphiles dibloc. Pour les structures de masse moléculaire beaucoup plus élevée et dont la répartition des groupements hydrophiles et hydrophobes ne correspond pas toujours à une distribution de type bloc, de nouvelles propriétés intéressantes peuvent apparaître et élargir le champ d'application de ces composés.



## *II) EXTRACTION ET PURIFICATION DES PROTÉINES MEMBRANAIRES*

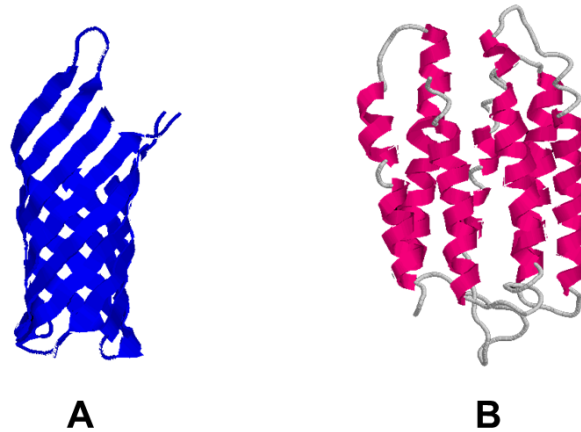
La membrane cytoplasmique est constituée principalement d'une bicouche phospholipidique, c'est à dire d'un assemblage de type vésiculaire. Le modèle le plus reconnu est celui de la mosaïque fluide proposé par Singer & Nicholson en 1972<sup>20</sup> décrivant les membranes biologiques comme des édifices dynamiques au sein desquels chacun des constituants est susceptible de diffuser. Elles se composent de différents phospholipides (phosphatidylcholine, phosphatidyl-éthanolamine...), de stéroïdes (notamment le cholestérol) ainsi que de protéines et glycoprotéines. Ces dernières seront appelées protéines membranaires (PMs).

Les PMs peuvent se trouver partiellement incluses (protéines membranaires extrinsèques) ou entièrement incluses (protéines membranaires intrinsèques ou protéines transmembranaires) dans la membrane cellulaire. Elles y sont maintenues par des interactions électrostatiques et surtout par de fortes interactions hydrophobes. Les sites lipophiles de la protéine sont ainsi contenus dans un environnement hydrophobe constitué par les queues lipophiles des phospholipides (cf. figure 4). Le milieu intra et extracellulaire est constitué en grande partie d'eau.



**Figure 4 :** Modèle de membrane fluide d'après Singer & Nicholson<sup>20</sup>. Vue en perspective (A) ou en coupe transversale (B) des protéines membranaires incluse intégralement ou partiellement dans la bicouche phospholipidique. E et I identifient les domaines en contact avec le milieu extérieur ou avec le feuillet interne et/ou externe de la membrane, respectivement. La partie interne de la bicouche constituée des chaînes grasses des lipides est semblable à un réseau type cristal liquide à l'intérieur duquel les différents constituants diffusent latéralement, les lipides présentant la particularité de pouvoir diffuser aussi transversalement (flip-flop) en passant d'un feuillet membranaire à un autre.

Les PMs sont, comme toute autre protéine, caractérisées par une structure primaire (la séquence d'acides aminés les constituant), une structure secondaire (repliement dans le plan en hélice  $\alpha$  ou en feuillet  $\beta$  des séquences d'acide aminé) et d'une structure tertiaire (ou structure tridimensionnelle correspondant au repliement de la chaîne polypeptidique dans l'espace) voire quaternaire (assemblage de différentes ou de mêmes structures tridimensionnelles appelées sous-unités protéiques) dont va étroitement dépendre son activité biologique (ou sa fonction) (cf. figure 5).



**Figure 5 :** Deux exemples de structure 3D de PMs. **A**/Structure de type tonneau  $\beta$  (résultant du repliement de feuillet  $\beta$ ) de *OmpA* (Outer membrane porine A transmembrane domain), le domaine transmembranaire d'une PM bactérienne, d'après Pautsch & Schulz<sup>21</sup>. **B**/Structure de type hélice  $\alpha$  d'une PM bactérienne, la bacteriorhodopsine (BR) d'après Pebay-Peyroula *et al.*<sup>22</sup>. Les structures ont été reproduites à partir des fichiers téléchargeables sur le site de la Protein Data Bank (PDB) avec le logiciel RasMol.

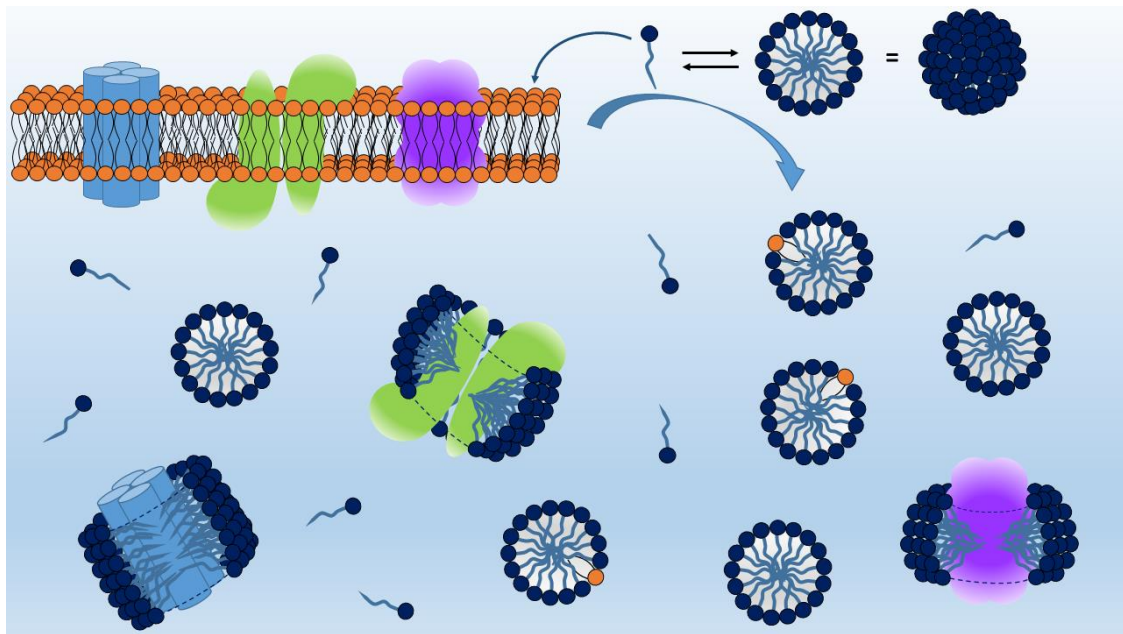
La caractérisation fonctionnelle et structurale d'une PM implique au préalable son extraction. Une PM est soit extraite de son milieu natif soit extraite de la cellule hôte dans laquelle elle a été surexprimée, les biologistes ayant notamment recours à la surexpression lorsque la PM d'intérêt n'est produite qu'en très faible quantité dans son milieu natif. La surexpression aura lieu alors dans un organisme hôte de substitution dont le génome est plus facilement modifiable.

Cet organisme peut être alors un procaryote tel qu'une bactérie et dans ce cas particulier, la PM va essentiellement se retrouver dans le cytoplasme bactérien sous sa forme dépliée et agrégée au sein d'une structure appelée corps d'inclusion<sup>22</sup>. Lorsqu'il s'agira d'une cellule eucaryote (levure, cellule d'insecte, cellule humaine), la PM d'intérêt sera intégrée aux membranes de l'hôte.

Enfin le recours au génie génétique permettra de produire une PM à l'identique de la native ou présentant des modifications (induites par l'expérimentateur) de la séquence en acide aminé (structure primaire). Ces modifications ou mutations pourront concerner certains acides aminés

cibles supposés jouer un rôle clé dans la fonction (activité biologique) et/ou la structure tridimensionnelle de la protéine ou porteront plutôt sur les extrémités *N*- ou *C*-terminales de la PM dans le but de faciliter la purification de cette dernière (*vide infra*).

Pour extraire une PM il faut rompre les interactions protéine-phospholipides sans altérer la structure tridimensionnelle de celle-ci, cette opération devant être effectuée dans un milieu aqueux semblable au milieu physiologique d'origine. Dans ce but les biologistes opèrent dans des milieux aqueux tamponnés et utilisent des tensioactifs appelés « détergents membranaires »<sup>23,24</sup> qui permettent généralement d'extraire la protéine de la membrane plasmique en la conservant sous sa forme native. Les sites lipophiles sont ainsi maintenus dans un espace hydrophobe constitué à la fois de phospholipides et de tensioactifs (cf. figure 6).



**Figure 6** : Schéma simplifié illustrant l'extraction des PMs de leur membrane native par les détergents. Trois PMs intégrales (une forme tétramère, une forme dimère et un monomère) sont initialement incluse dans la bicouche native (partiellement représentée). L'extraction est effectuée à des concentrations en détergent très supérieure à la CMC. Le milieu expérimental obtenu correspond à un mélange de micelles de détergent (vue en coupe et forme pleine), de micelles mixtes phospholipides-détergent (vue en coupe) et des PMs intégrales solubilisées comportant une couronne de détergent (représentation partielle) recouvrant leur domaine transmembranaire hydrophobe.

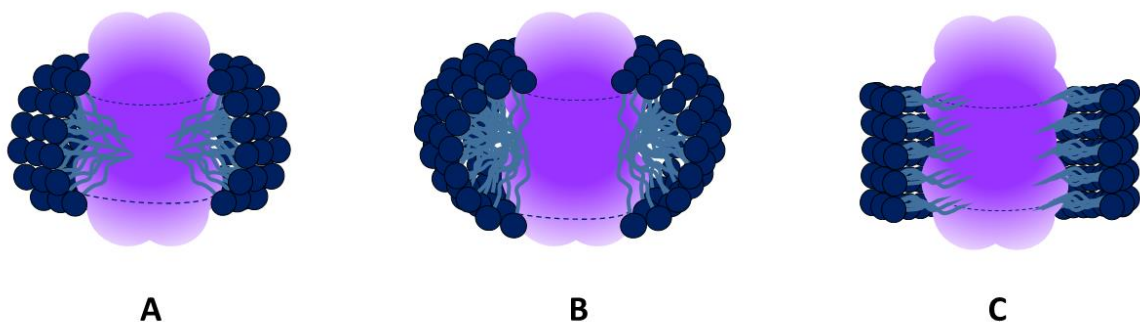
L'extraction et la purification des protéines se décomposent en trois étapes qui sont :

- La décomposition partielle ou totale de la membrane plasmique.
- La solubilisation des protéines dans les micelles mixtes de lipides et de tensioactifs.
- L'élimination du tensioactif et la reconstitution d'une membrane lipidique autour de la protéine.

Les « détergents membranaires » présentent la propriété de déstabiliser les vésicules phospholipidiques qui se décomposent alors en agrégats micellaires mixtes constitués de tensioactifs et de phospholipides provoquant ainsi la dissociation des protéines avec la membrane (cf. figure 6). Cette dissociation doit être maximale sans pour autant entraîner la dénaturation de la protéine lorsqu'il est nécessaire de conserver celle-ci intacte. Dans ce cas le « détergent » employé est dit tensioactif faible. Il permet notamment d'extraire sans les dénaturer des protéines constituées de différentes sous-unités. Dans le cas où le tensioactif est dit fort, il y a dissociation du complexe et altération irréversible de la structure native comme c'est souvent le cas pour un tensioactif chargé tel que le dodécylsulfate de sodium (SDS).

Le détergent permet la solubilisation de la protéine en s'insérant dans la bicouche lipidique de la membrane dont la structure est ainsi déstabilisée. Il est alors possible d'observer des phénomènes de fusion et de lyse membranaire. Les molécules de tensioactif entrent en compétition avec les phospholipides endogènes pour l'occupation des sites hydrophobes externes de la protéine<sup>25</sup>. Lorsque la concentration en tensioactif est proche de la CMC, le taux de molécules de « détergent » inclus dans la membrane atteint sa valeur maximale, il y a rupture de cette dernière et transition d'une phase lamellaire (bicouche) à une phase micellaire<sup>26</sup>, la solubilisation des PMs suit de près cette étape.

Les protéines sont alors incorporées dans des agrégats dont la nature n'est pas tout à fait connue. Il est présumé que ceux-ci peuvent s'apparenter à des micelles de tensioactifs ou encore à un arrangement moléculaire monocouche où chaque site lipophile de la protéine est en contact avec les parties hydrophobes des tensioactifs<sup>27</sup> (cf. figure 7).

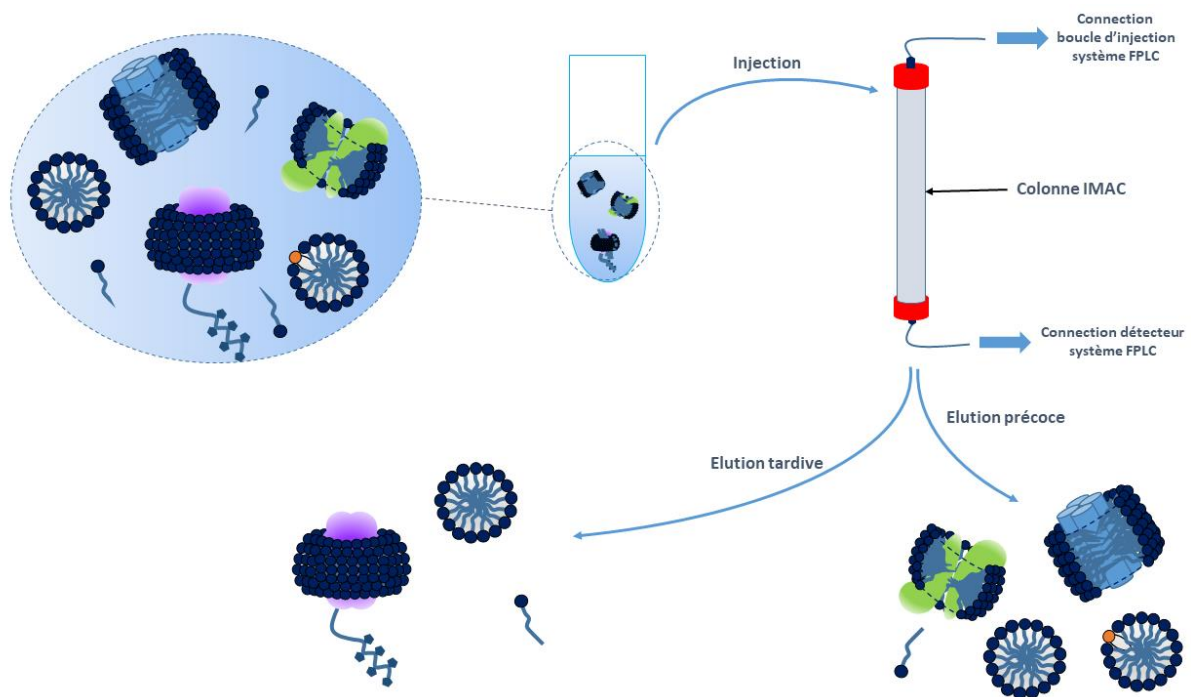


**Figure 7 :** Trois différents modes d'interaction PM-détergent non ionique<sup>27</sup>. **A**/Insertion de la PM dans une couche monomoléculaire de tensioactif formant un système à géométrie prolata. **B**/Insertion de la PM dans une micelle de tensioactif formant un système à géométrie oblate. **C**/ Insertion de la PM dans une bicouche de tensioactif formant un système à géométrie cylindrique.

Les interactions phospholipides-protéine étant très fortes il est souvent nécessaire d'utiliser un large excès de tensioactif pour les rompre. Lorsque la solubilisation est totale il ne subsiste dans le milieu que des micelles mixtes tensioactifs-protéine et tensioactifs-phospholipides.

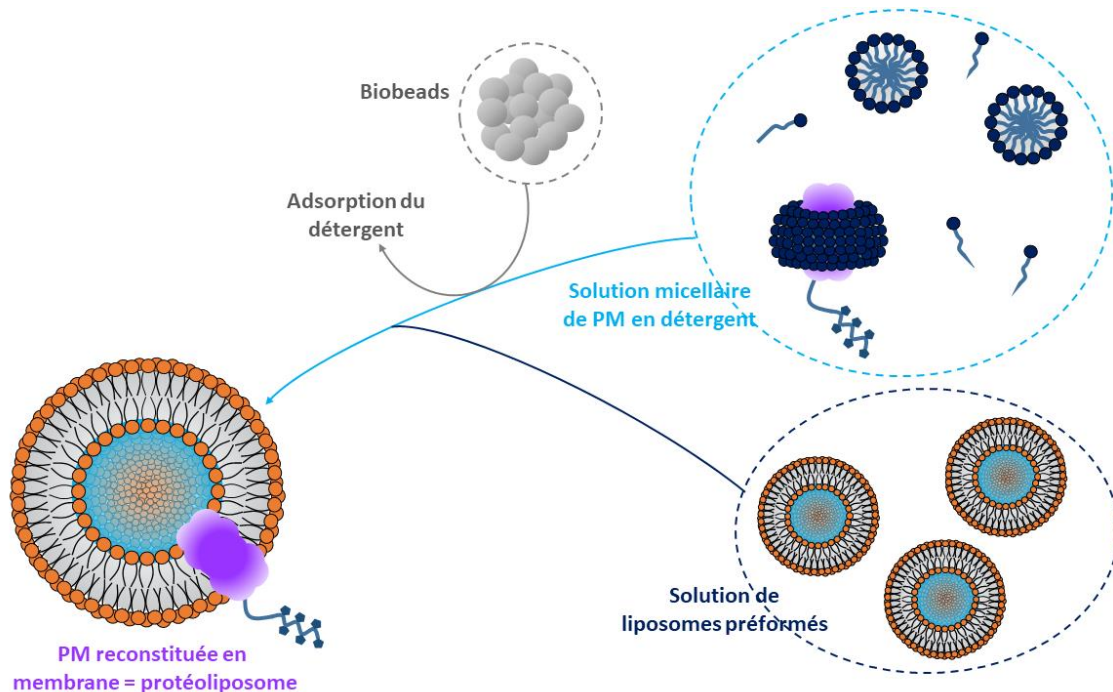
La dernière étape consiste à isoler la PM d'intérêt puis à reconstituer une bicouche lipidique au sein de laquelle sera logée la protéine membranaire. La structure vésiculaire ainsi formée est appelée protéoliposome<sup>28,29</sup>.

La purification de la PM en détergent est effectuée le plus souvent par chromatographie. La méthode peut dans certains cas n'être pas spécifique (chromatographie ionique, chromatographie d'exclusion stérique...) ou plus voire très spécifique (immobilisation puis élution sur colonne d'affinité)<sup>28</sup> (cf. figure 8).



**Figure 8** : Purification d'une PM en détergent. Dans l'exemple choisi, la PM cible a été initialement modifiée (vide supra) pour comporter sur l'une de ses extrémités (*N*- ou *C*-) une étiquette poly(histidine) (hexa ou octahistidine) qui va interagir spécifiquement (complexation) avec la phase stationnaire dopée en ion nickel II d'une colonne IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography)<sup>28</sup>. L'élution est effectuée par gradient avec des tampons de concentrations croissantes en imidazole mais à concentration constante en détergent. En général, la colonne est connectée à un système FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) permettant de détecter et de fractionner automatiquement les échantillons. Les constituants membranaires non marqués seront élués les premiers alors que l'élution de la PM d'intérêt n'interviendra que pour des concentrations élevées en imidazole et sera ainsi sélectivement récupérée.

Une fois la PM cible isolée, elle est alors incubée dans une solution enrichie en phospholipides. Le film phospholipidique est reconstitué au fur et à mesure de l'élimination du tensioactif, suivant le principe inverse à celui de la dissolution (cf. figure 9).



**Figure 9 :** Reconstitution d'une PM en membrane. La solution micellaire de PM est ajoutée à une solution de liposomes préformés (ou dans le cas non illustré, à une suspension de vésicules déstabilisées par l'incorporation de détergent)<sup>29</sup>. Le détergent est éliminé par adsorption sur biobeads (billes de polystyrène présentant une surface poreuse hydrophobe)<sup>29,30</sup> mais peut aussi être éliminé dans certains cas par dilution sous la CMC et dialyse<sup>30,31</sup>, chromatographie par exclusion stérique (SEC)<sup>30</sup> ou par précipitation<sup>31</sup>. L'élimination graduelle du détergent s'accompagne de la reconstitution progressive de la bicouche. Le mécanisme de transfert et l'orientation de la PM dans la bicouche vont dépendre de la nature du détergent utilisé<sup>29</sup>.

Le mécanisme typiquement impliqué va dépendre du détergent et des proportions dans lesquelles il est utilisé<sup>29</sup> et ne sera pas discuté dans cet exposé.

Cependant, malgré toutes les précautions prises, des phénomènes de dénaturation de la protéine peuvent se produire au cours de l'expérience. La perte de la structure native peut être engendrée par exemple, au sein des micelles mixtes, par une fluidité trop importante du cœur micellaire qui influence les vitesses et les amplitudes des fluctuations conformationnelles des protéines<sup>32</sup>. D'autres problèmes peuvent aussi intervenir au niveau des protéoliposomes où quelques molécules de tensioactifs restées piégées au sein de la membrane vésiculaire peuvent affecter grandement ses propriétés physiques telles que la perméabilité à de petites molécules<sup>33</sup> (pour fausser ainsi les

résultats analytiques si l'étude fonctionnelle menée concerne le transport transmembranaire), ou encore compromettre l'homogénéité en taille et forme des liposomes<sup>34</sup>.

Il est donc nécessaire de faire intervenir des techniques complémentaires permettant d'éviter la dénaturation au cours du temps, de la protéine solubilisée.

Les amphipols<sup>7-9</sup> représentent en ce sens une des solutions envisageables. Il a en effet été montré que ces polyacrylates de faible masse moléculaire comportant des chaînes grasses latérales réparties aléatoirement le long de la chaîne polyacrylique et leur donnant un caractère amphiphile, pouvaient s'échanger avec les molécules de tensioactif et former des complexes protéines-amphipols très stables. Les chaînes lipophiles de l'amphipol s'adsorbent à la surface des sites hydrophobes de la protéine et entrent en compétition avec le tensioactif. Après élimination de ce dernier, la protéine membranaire ainsi complexée peut être maintenue sous sa forme active en solution aqueuse durant plusieurs jours voire plusieurs semaines ou mois.

Un des objectifs du présent travail est l'élaboration de nouvelles structures amphiphiles neutres de type polymère pouvant théoriquement présenter les propriétés stabilisantes des amphipols vis-à-vis d'une PM. De telles structures dériveront toutes d'un monomère hydrosoluble : le tris(hydroxyméthyl)acrylamidométhane ou THAM. Ces amphipols neutres doivent être obtenus soit par cotélomérisation du THAM et d'un monomère comportant une chaîne grasse greffée sur une liaison alcool, soit en greffant aléatoirement un certain pourcentage de chaînes sur les fonctions alcool d'un homotélomère. Ce travail est décrit dans le second chapitre de cette thèse.

### ***III) LA VECTORISATION DE PRINCIPES ACTIFS***

Si l'efficacité de certains principes actifs n'est plus à mettre en doute, l'action du médicament est souvent grandement limitée par les nombreux obstacles rencontrés durant son trajet au sein de l'organisme. Cet échec peut être la conséquence d'un métabolisme du médicament par les enzymes endogènes qui provoquent sa désactivation, comme c'est parfois le cas par exemple pour l'arabine cytosine (Ara-C) qui est métabolisé en arabine-uracile (Ara-U) sous l'action des désaminases dans les cellules hépatiques<sup>35</sup>. D'autres mécanismes tels que la séquestration du métabolite actif<sup>36</sup> ou la chimiorésistance<sup>37</sup> peuvent aussi intervenir et compromettre son activité thérapeutique.

La nature même du médicament peut être un facteur limitant. En effet, le milieu physiologique étant un milieu aqueux, le transit d'une substance hydrosoluble y est donc plus aisé que celui d'une substance hydrophobe, cependant cette dernière diffusera plus facilement à travers la membrane cytoplasmique de la cellule cible. La balance hydrophile-lipophile (HLB) du principe actif représente dès lors un des facteurs essentiels de son activité biologique.

En plus de ces problèmes classiques inhérents aux contraintes physiologiques auxquelles doit répondre le principe actif, l'inconvénient majeur souvent rencontré avec certains principes actifs tels que les agents anticancéreux, est leur manque de sélectivité cytotoxique. Le médicament agit indifféremment sur les cellules malades comme sur les cellules saines.

Il est donc tout à fait justifié de chercher à disposer de moyens pouvant assurer d'une part le transport d'un principe actif dans un milieu physiologique en le préservant de toute altération métabolique irréversible et permettant d'introduire une spécificité d'action.

Ces agents de transport sont des systèmes moléculaires (ou macromoléculaires) susceptibles de former des interactions liantes avec le principe actif (liaison covalente, interaction hydrophobe...) non dénaturantes. Ces systèmes sont généralement des structures amphiphiles pouvant ainsi diffuser au travers des différentes barrières naturelles hydrophobes ou hydrophiles. Certaines séquences peptidiques ou glycosidiques greffées sur le vecteur seront spécifiques d'un récepteur membranaire et permettront l'ancrage sélectif du vecteur à la surface des cellules cibles. Enfin, ces molécules sont supposées être biocompatibles et seront dégradées et/ou éliminées par l'organisme au cours du temps.

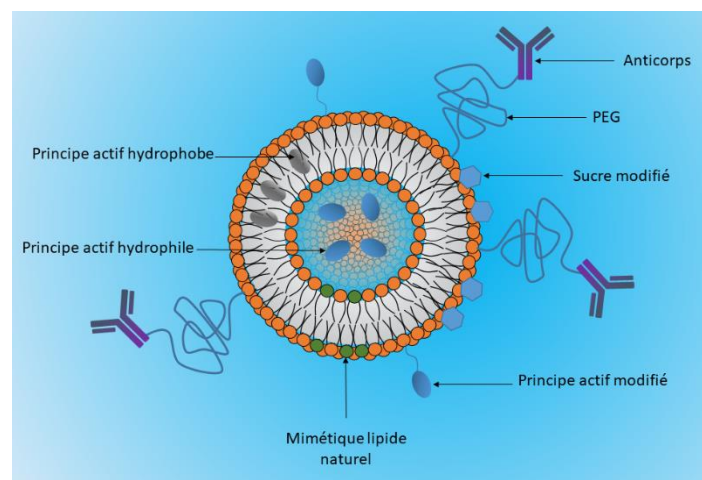


De nombreux travaux ont été réalisés dans l'optique de fournir de nouveaux systèmes vectoriels. Les structures proposées sont nombreuses et nous n'en citerons que quelques-unes.

L'utilisation, par exemple, d'anticorps ou de glycoprotéines<sup>38</sup> sur lesquels sont greffés les principes actifs, semble tout à fait appropriée car le ciblage fait intervenir des mécanismes de reconnaissance membranaire. Cependant, la formation de la liaison covalente vecteur-principe actif peut entraîner la dénaturation de la protéine (anticorps ou glycoprotéine) qui perd son activité antigénique.

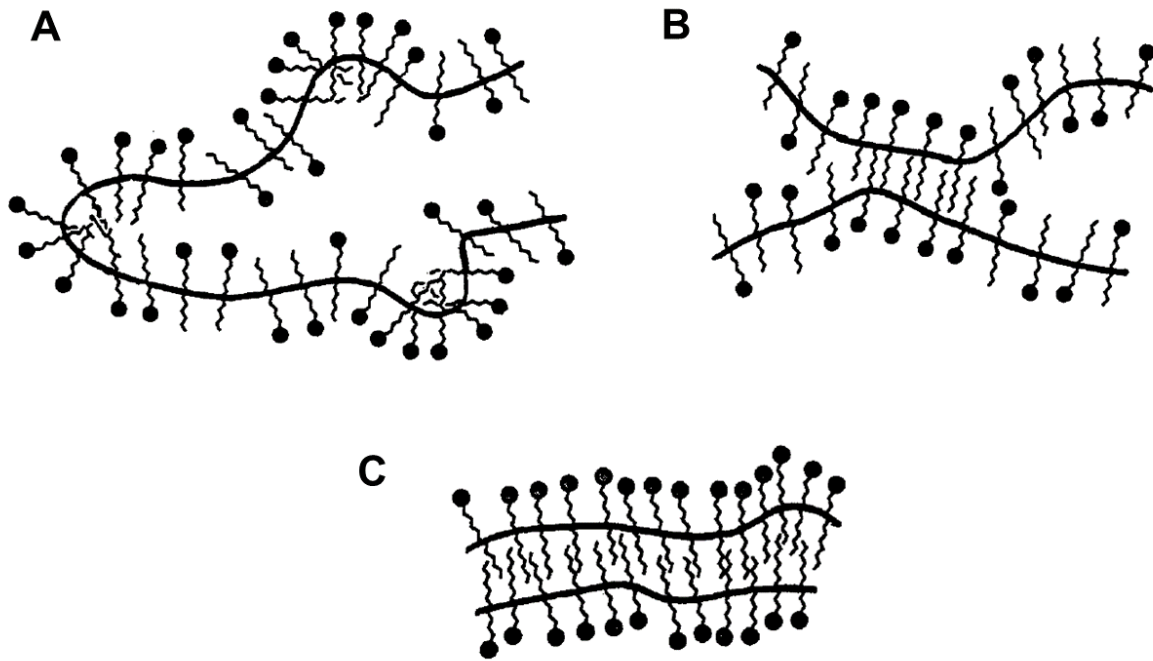
Certaines cellules telles que les érythrocytes<sup>39</sup> peuvent être dopées en principe actif et réintroduites dans l'organisme d'origine. Cependant l'encapsulation d'un soluté dans une cellule reste délicate.

Les liposomes<sup>40</sup> permettant l'encapsulation de principes actifs ont aussi été et sont très utilisés (cf. chapitre III). Les interactions vecteur-protéine sont alors physiques et peu dénaturantes. Les propriétés de ciblage sont conférées au liposome en le dotant d'une séquence spécifique (glucides, anticorps...) <sup>41,42</sup> de certains récepteurs membranaires (cf. figure 10).



**Figure 10 :** Différent modes de fonctionnalisation d'un liposome destiné à la vectorisation de principe actif. Le principe actif hydrophile est incorporé dans le cœur aqueux du liposome ou en contact avec le milieu extra-vésiculaire lorsque fixé à la surface du liposome *via* une liaison covalente avec la tête polaire d'un phospholipide<sup>41</sup>. Le principe actif hydrophobe ou amphiphile (cas d'un dérivé lipidique par exemple<sup>43</sup>) sera incorporé au sein de la bicouche. La vectorisation est assurée par l'adjonction de motifs impliqués dans des mécanismes de reconnaissance spécifique des marqueurs des cellules cibles (infectés, infectueuses ou cancéreuses). Ces motifs sont généralement des peptides, des protéines (ici les anticorps<sup>42</sup>) ou des sucres. De longs poly(éthylène glycol) (PEG) assurent le lien entre les têtes polaires des lipides et les anticorps<sup>42</sup>. Les sucres (acide muramique, glucuronique...) pointant en surface du liposome sont préalablement modifiés par une chaîne hexadécyle qui sert de point d'ancrage dans la membrane liposomale<sup>41,44</sup>.

Les micelles polymérisées<sup>45,46</sup> (cf. figure 11) permettent elles aussi l'encapsulation de substrats. Elles sont obtenues par polymérisation d'un tensioactif à une concentration supérieure à la CMC. Ces micelles sont plus stables que leurs homologues non polymérisés et c'est pourquoi une substance lipophile sera beaucoup mieux maintenue au sein du cœur hydrophobe de la micelle.



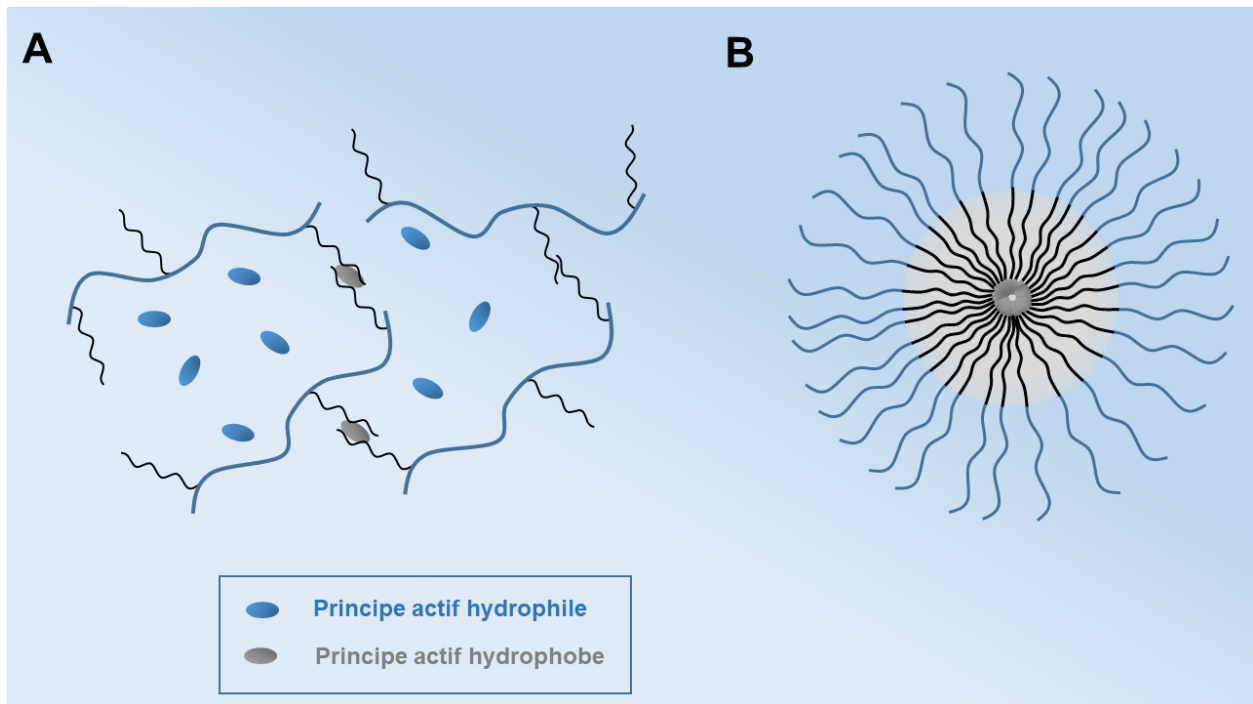
**Figure 11** : Différents types de systèmes associatifs pouvant être formés par interactions hydrophobes intramacromoléculaires des polysavons d'après Anton *et al.*<sup>45</sup>. **A**/ « Micelle locale », une partie seulement des tensioactifs vicinaux s'associent et s'échangent suivant un équilibre dynamique. Ce modèle exige une grande flexibilité de la chaîne macromoléculaire. **B**/ « Micelle régionale », les associations restent partielles mais concernent aussi bien les monomères vicinaux que ceux éloignés dans la séquence du polymère. **C**/ « Micelle moléculaire », tous les monomères sont associés, ce modèle concerne les chaînes macromoléculaires peu flexible. Figure extraite de Anton *et al.*<sup>45</sup> et reprise.

Les vecteurs macromoléculaires tels que les polymères amphiphiles dibloc<sup>2</sup> et les polymères amphiphiles associatifs sont également utilisables.

Les polymères amphiphiles dibloc sont constitués d'une partie hydrophobe et d'une partie hydrophile parfaitement délimitées dans l'espace. Le vecteur et le principe actif sont dans ce cas couplés par liaison covalente (cf. figure 12).

Les polymères amphiphiles associatifs sont constitués de parties hydrophiles et de parties hydrophobes dont il n'y a pas de séparation réellement distincte dans l'espace (cf. figure 12). Les

polymères associatifs hydrosolubles, par exemple, sont constitués d'un squelette hydrophile le long duquel sont répartis aléatoirement des groupements hydrophobes.



**Figure 12 :** Utilisation des polymères amphiphiles dibloc ou à distribution aléatoire comme vecteurs de principe actif. Les parties hydrophiles de chacun des polymères ont été représentées en bleu et se distinguent des parties hydrophobes représentées en noir. **A/**Les polymères amphiphiles associatifs formant des hydrogels peuvent aussi bien renfermer des principes actifs hydrophiles dans les mailles hydrophiles du gel que des molécules hydrophobes dans les microdomaines hydrophobes formés par l'association des chaînes latérales. **B/**Les structures dibloc forment des micelles dont le cœur hydrophobe renferme le principe actif hydrophobe lié par covalence à la partie hydrophobe du polymère. Cette liaison peut intervenir en extrémité de chaîne (cas illustré) ou sur une position latérale de la chaîne.

Dans l'eau, à partir d'une certaine concentration, ces polymères ont la propriété de former des associations intermoléculaires par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes subsistant entre les différents groupements hydrophobes latéraux. Il est alors envisageable de pouvoir solubiliser un substrat lipophile dans les microdomaines hydrophobes ainsi constitués (*vide infra*).

L'utilisation de polymères amphiphiles associatifs hydrosolubles en tant que vecteurs de principes actifs n'est à l'heure actuelle qu'un des projets et une des nombreuses idées et propositions du Professeur H. Ringsdorf<sup>10</sup>. Nous y portons le plus vif intérêt.

Le domaine d'application de ces polymères amphiphiles associatifs ne se limite cependant pas aux applications et études biologiques car le secteur industriel dont une des principales

préoccupations est devenue la préservation de l'environnement, est lui aussi impliqué dans des travaux de développement de nouvelles molécules amphiphiles hydrosolubles biocompatibles.

En effet, les polymères hydrosolubles à haut poids moléculaire encore utilisés dans l'industrie agroalimentaire en tant qu'agents stabilisants, floculants et émulsifiants ou dans l'industrie des peintures pour le contrôle de la rhéologie de solution et suspension aqueuse, ou des cosmétiques en tant qu'agents épaississants, sont souvent des agents polluants. Il est très vite apparu nécessaire de disposer de composés biocompatibles et donc de masse moléculaire beaucoup moins élevée, pouvant présenter des propriétés rhéologiques tout aussi intéressantes (sinon plus) à faible concentration.

Ces propriétés ont pu être généralement observées pour des polymères constitués d'une chaîne macromoléculaire hydrophile contenant une faible proportion de groupes hydrophobes latéraux ou terminaux<sup>47,48</sup> selon le cas. Dans l'eau, les groupements hydrophobes de ces polymères vont, à partir d'une concentration généralement faible, s'associer par interactions intermoléculaires hydrophobes et les macromolécules ainsi liées vont former un réseau tridimensionnel (*vide infra*). Ces assemblages plurimoléculaires s'apparentent à des macromolécules de masses moléculaire très élevée. Ces associations sont parfaitement réversibles et peuvent se rompre sous l'action d'une force appliquée (contrainte de cisaillement par exemple) à la solution pour se reformer lorsque cette dernière n'est plus appliquée.

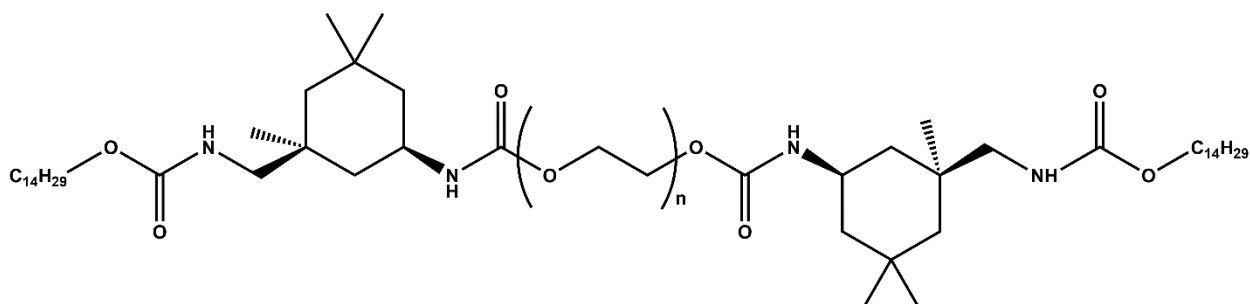
Les polymères associatifs hydrosolubles à faible concentration permettent donc le contrôle des propriétés rhéologiques des solutions aqueuses. Les structures de ces systèmes associatifs sont très variées mais elles sont toutes caractérisées par une même propriété qui est leur pouvoir épaississant.

Nous décrivons dans le troisième chapitre de ce travail la synthèse de polymères hydrosolubles associatifs dérivant du Tris et potentiellement utilisables pour le transport de principes actifs. Mais avant d'entreprendre la synthèse d'un tel transporteur, nous avons dû déterminer par une série d'essais préliminaires, quelle(s) structure(s) étai(en)t la (les) plus apte(s) à assurer l'encapsulation d'un principe actif. Autrement dit, dans un premier temps il nous a paru opportun de nous assurer que les structures polymères préparées conduiraient effectivement à une structure associative. Dans cette optique, plusieurs polymères ont été synthétisés et leurs propriétés associatives étudiées.

#### IV) LES POLYMÈRES AMPHIPHILES ASSOCIATIFS

Le terme de polymère amphiphile désigne toute macromolécule constituée de groupements hydrophiles et de groupements hydrophobes. La structure peut être de type dibloc, tribloc, multibloc ou statistique c'est à dire que les groupements hydrophobes (ou hydrophiles) sont répartis aléatoirement le long d'une chaîne hydrophile (ou hydrophobe). Le polymère n'est pas nécessairement soluble dans l'eau, les ionomères<sup>49</sup> par exemple sont des polymères amphiphiles associatifs en phase organique. Un polymère amphiphile est aussi obtenu par copolymérisation d'un tensioactif polymérisable micellisé et d'un monomère hydrophile, le polymère est alors appelé polysavon<sup>50-52</sup> et forme des micelles polymères en solution aqueuse par interactions hydrophobes exclusivement intramoléculaires.

Comme nous l'avons déjà précisé, les structures hydrosolubles associatives sont assez variées et ont fait l'objet de nombreuses études notamment les polymères associatifs dérivés du poly(oxyéthylène) (POE). Ce sont de longs poly(éthylèneglycol) (PEG) (masse molaire supérieure à 20000 g.mol<sup>-1</sup>) dont une ou les deux extrémités hydroxyle de la chaîne ont été modifiées par greffage de groupements hydrophobes. Les polymères obtenus après modification sont généralement de type di ou tribloc si le PEG de départ a une structure linéaire, ou ramifiée si l'homopolymère présente une structure ramifiée ou branchée<sup>53</sup>. Ces polymères modifiés en bout de chaînes sont dits téléchéliques (cf. figure 13). Les groupements hydrophobes peuvent être introduits par formation de liaisons éther<sup>54-56</sup>, ester<sup>57</sup>, ou uréthane<sup>58-61</sup> et dans ce dernier cas ces dérivés sont appelés "HEUR" pour **H**ydrophobic modified **E**thoxylated **U**rethane. Ces dérivés sont très employés dans les formulations de peintures à l'eau.



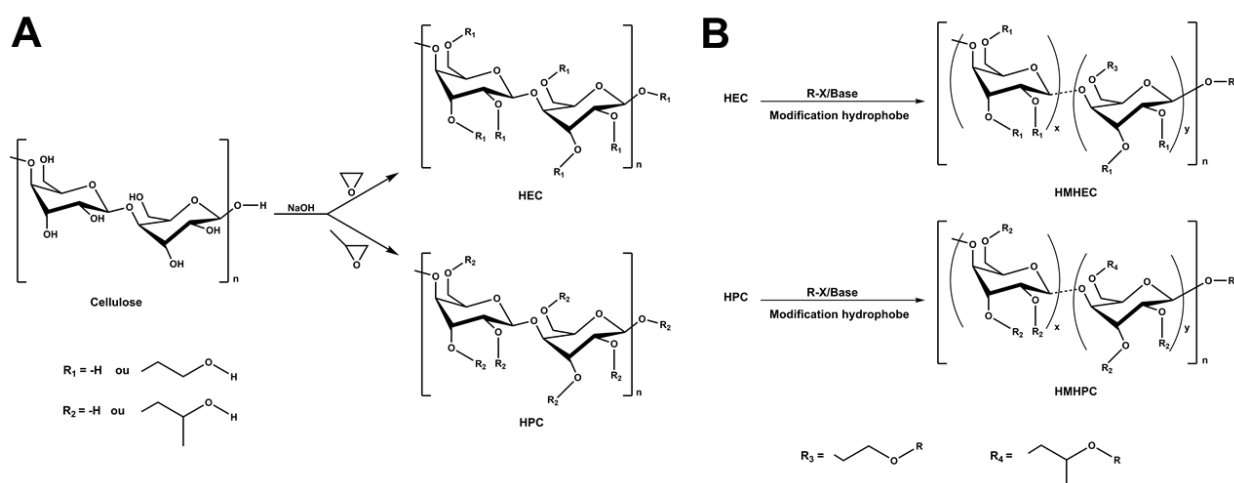
**Figure 13** : Exemple de HEUR (avec  $n \sim 600$ ) d'après Lundberg *et al.*<sup>61</sup>.

Les polymères associatifs dérivés de biomolécules trouvent principalement leurs applications dans l'industrie agroalimentaire et cosmétique. Ces composés sont obtenus par modification

hydrophobe de polysaccharides naturels neutres ou anioniques, la distribution des groupements hydrophobes est statistique.

Les dérivés des polysaccharides neutres sont obtenus par modification hydrophobe de l'hydroxyéthyl cellulose (HEC)<sup>62-64</sup>, de l'hydroxypropyl cellulose (HPC)<sup>62,65-67</sup> (cf. figure 14) ou encore de pullulanes<sup>68,69</sup>. Les groupements hydrophobes peuvent être introduits dans ce cas aussi par formation de liaisons éther, ester ou uréthane suivant différents procédés décrits dans la littérature<sup>62-70</sup>.

Les dérivés des polysaccharides chargés peuvent être obtenus à partir de HEC ou de HPC sur lesquels ont été greffés des groupements carboxylate et des groupements hydrophobes<sup>71</sup> ou après modification hydrophobe de polysaccharides naturels chargés tels que les alginates<sup>72,73</sup>.



**Figure 14 :** Séquence de synthèse des celluloses modifiées. **A**/Synthèse des précurseurs modifiés (HEC et HPC). **B**/Modification hydrophobe des précurseurs. X peut représenter un groupement nucléofuge, un isocyanate ou un ester actif. R est soit une longue chaîne alkyle soit un groupement aryle. Le degré de modification hydrophobe y reste inférieur à 5 %.

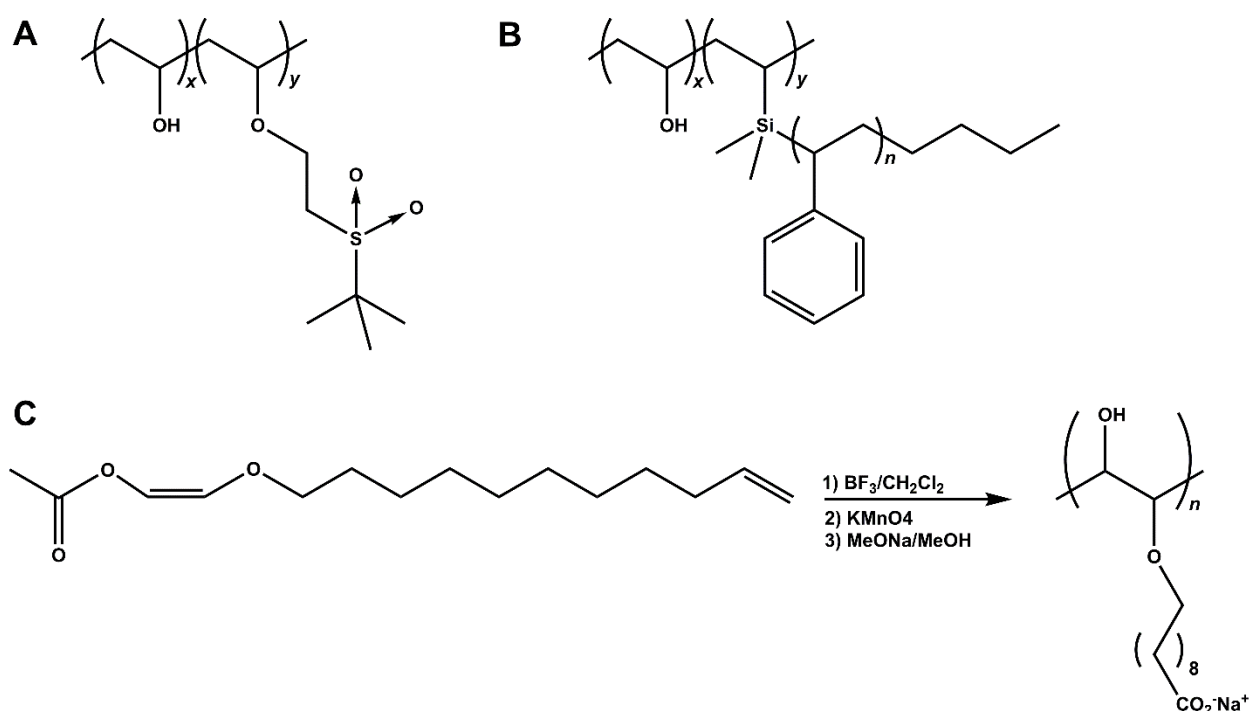
Les polymères associatifs dérivés des polyalcools vinyliques (PVA) sont obtenus par modification hydrophobe du polyol par greffage de groupements hydrophobes sur une certaine proportion des fonctions alcool. Ces groupements hydrophobes sont dans certains cas des polymères hydrophobes tels que les polyacrylates de butyle<sup>74</sup>. La distribution des groupements hydrophobes est statistique. La modification chimique des PVA a fait l'objet de peu de publications dont nous citerons quelques exemples.

Imai *et al.*<sup>75</sup> ont fait réagir un vinyl alkyl sulfoxyde sur une certaine proportion des fonctions alcool d'un PVA par réaction de Michaël en milieu basique (cf. figure 15). Yahya *et al.*<sup>76</sup> traitent

ces PVA par une proportion variable d'urée dans le DMF à ébullition et transforment une partie des fonctions alcool du polymère en groupements uréthane, ils greffent ensuite à l'aide de liaisons ester une certaine quantité de chaînes grasses sur les fonctions alcool non modifiées et encore accessibles. Enfin Seki *et al.*<sup>77-79</sup> ont fixé des groupements azoïques hydrophobes sur le polyol par formation de liaisons ester et ont étudié la réponse photomécanique des gels et des films formés en solution aqueuse.

Les dérivés amphiphiles de PVA ont aussi pu être obtenus par copolymérisation. Tezuka *et al.*<sup>80</sup> ont, par exemple synthétisé un vecteur de principes actifs en copolymérisant l'acétate de vinyle avec un macromonomère de type poly(styrène), l'amphiphilie étant révélée après saponification (cf. figure 15).

Récemment Wulff & Jakoby<sup>81</sup> ont obtenu un PVA modifié hydrophobiquement après une première étape de polymérisation cationique d'un monomère de type acétate de (Z)-2-alkoxyvinyle suivie d'une étape d'oxydation. Après saponification le polymère déprotégé et ionisé a tendance à se comporter comme un polysavon (cf. figure 15).

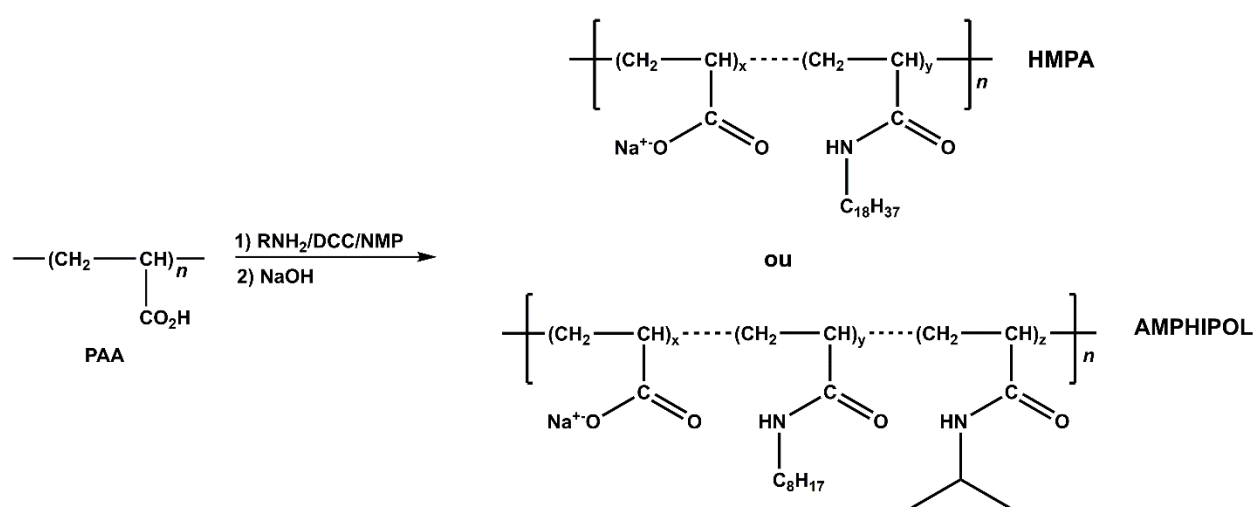


**Figure 15 :** Exemples de PVA modifiés. **A/**Copolymère amphiphile obtenu par modification partielle d'un PVA précurseur<sup>75</sup>. **B/**Copolymère amphiphile obtenu par copolymérisation de l'acétate de vinyle avec un macromonomère dérivant du poly(styrène)<sup>80</sup>. **C/**Polymère amphiphile obtenu après modification de l'homopolymère d'un dérivé de type étheroxyde de l'acétate de vinyle<sup>81</sup>.

Les polymères H.A.S.E. (**H**ydrophobically modified **A**lkali **S**wellable **E**mulsion) sont obtenus par copolymérisation d'un monomère hydrophile (acide acrylique, méthacrylique, maléïque, fumarique), d'un monomère hydrophobe (styrène) et d'un monomère comportant de longues chaînes hydrophobes<sup>82</sup>. Le polymère est soluble dans l'eau seulement pour un pH basique. Ces polyélectrolytes présentent ainsi des propriétés épaississantes en fonction du pH. Cette augmentation de la viscosité est alors due, d'une part à des effets de répulsion de charges qui font que le volume hydrodynamique est plus important, et d'autre part, aux interactions hydrophobes intermoléculaires.

Les dérivés des acides polyacryliques appelés communément HMPA (**H**ydrophobically **M**odified **P**olyacrylic **A**cid) sont obtenus en greffant des chaînes aliphatiques hydrophobes sur une certaine proportion de fonctions acide par l'intermédiaire de liaisons amide<sup>83</sup>. La répartition des chaînes alkyles est statistique et après neutralisation des fonctions acide, le polyélectrolyte obtenu présente les propriétés d'un polymère hydrophile associatif (cf. figure 16). Les propriétés associatives des HMPA et leurs interactions avec des particules colloïdales (micelles, vésicules, silice modifiée) ont été étudiées en détail<sup>84-87</sup>.

Ces composés ont notamment la propriété de former des associations avec des protéines globulaires dotées de sites de liaison hydrophobes<sup>88-90</sup>. Les amphipols<sup>7-9</sup> qui sont des HMPA de faible masse moléculaire (masse moyenne en nombre  $\bar{M}_n \approx 5000$ ) mais de degré de modification élevé (typiquement supérieur à 20 %), ont la propriété de s'associer aux PMs et de les maintenir en solution aqueuse.



**Figure 16** : Schéma de synthèse des HMPAs et exemple de HMPA et d'amphipol obtenus à partir d'un acide poly(acrylique) (PAA) précurseur. Les amphipols se distinguent des HMPAs de par leur taille limitée (degré de polymérisation  $n < 50$ ) et leur degré de modification hydrophobe plus élevé ( $y > 20\%$ ).



Les polymères associatifs dérivés du poly(acrylamide) sont obtenus par copolymérisation d'un monomère hydrophile et d'un comonomère hydrophobe ou amphiphile. La polymérisation peut avoir lieu en milieu homogène.

Hill *et al.*<sup>91,92</sup> ont ainsi copolymérisé de l'acrylamide avec le *N*-phénylacrylamide dans un mélange eau/formamide. Le polymère obtenu présente une distribution statistique des groupements hydrophobes mais aussi un caractère faiblement associatif. La technique est en effet limitée à l'utilisation de monomères hydrophobes ayant suffisamment d'affinité avec un solvant ou un mélange de solvants polaires pour ne pas précipiter dans le milieu réactionnel. Les chaînes latérales, dans ce cas, ne sont donc pas suffisamment hydrophobes pour assurer des associations solides.

Les mêmes auteurs ont rencontré un problème similaire quand ils ont réalisé la copolymérisation en milieu hétérogène. L'équilibre monomère hydrophobe (cristal) en suspension-monomère hydrophobe solvaté est déplacé par l'incorporation de ce monomère au sein du polymère. Le dérivé hydrophobe est donc libéré dans le milieu réactionnel de façon continue ce qui permet d'obtenir un polymère avec une distribution statistique des chaînes latérales. Le monomère utilisé est nécessairement peu hydrophobe et les propriétés associatives du polymère sont pratiquement inexistantes. De même, lorsque le monomère est trop hydrophobe, il est incorporé en quantité trop faible pour conférer à la macromolécule des propriétés associatives.

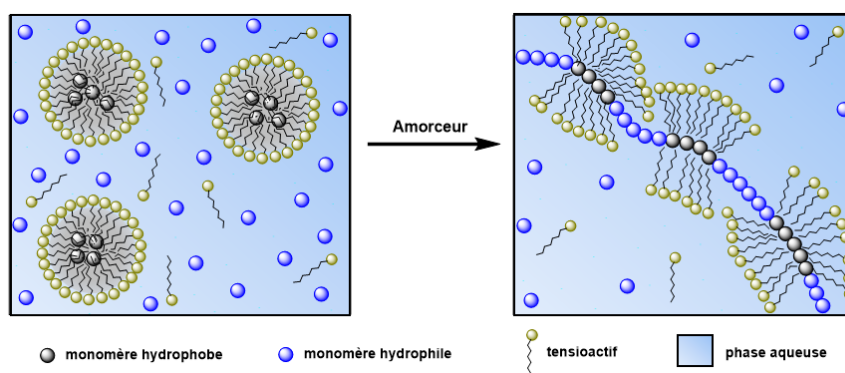
D'autres techniques telles que la copolymérisation en milieu dispersé ont permis d'obtenir des polymères hydrosolubles associatifs. Nous en citerons deux qui sont la copolymérisation micellaire<sup>93</sup> et la copolymérisation en microémulsion inverse mise au point par Candau *et al.*<sup>94-96</sup>.

La copolymérisation micellaire consiste à copolymériser un monomère hydrophile dissous dans l'eau avec un monomère hydrophobe solubilisé dans les micelles d'un tensioactif dont la concentration est supérieure à la CMC (cf. figure 17).

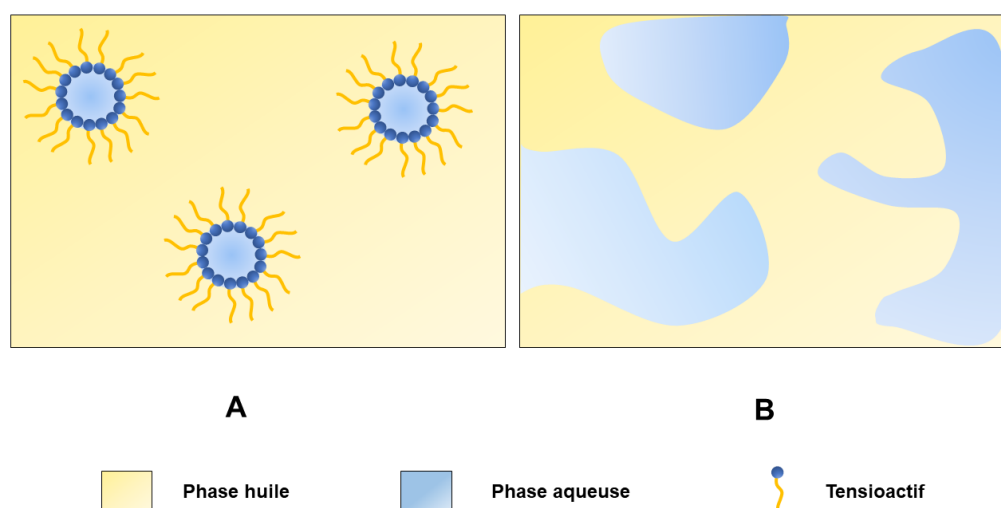
La copolymérisation en microémulsion inverse, quant à elle, consiste à copolymériser un monomère hydrophobe dissous dans une huile avec un monomère hydrophile solubilisé au sein de microparticules constituées de microgouttellettes d'eau stabilisées par un tensioactif approprié.

Nous distinguons la microémulsion inverse globulaire qui se définit comme une dispersion de microgouttellettes d'eau dont le diamètre est compris entre 2 et 10 nm (taille de la micelle inverse)

de la microémulsion inverse bicontinue constituée d'une dispersion continue de la phase aqueuse dans la phase huile (cf. figure 18).



**Figure 17** : Représentation schématique de la copolymérisation micellaire. Figure inspirée par Hill *et al.*<sup>92</sup>. Les monomères hydrophobes sont maintenus au sein du cœur apolaire des micelles de tensioactifs. Après initiation et copolymérisation, la structure obtenue est de type multiblocs. Les blocs hydrophobes sont en interaction avec les chaînes lipophiles du tensioactif.



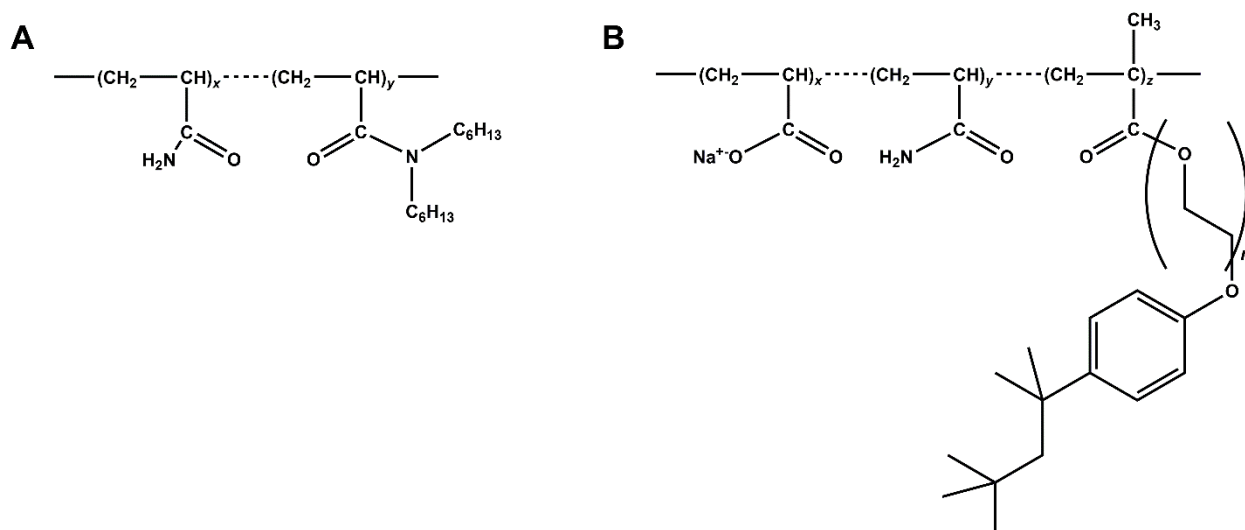
**Figure 18** : Représentation schématique d'une microémulsion inverse globulaire (A) et bicontinue (B).

Cette dernière est obtenue en réduisant le taux de tensioactif et en utilisant une quantité en monomère hydrophile plus importante. Le milieu est parfaitement transparent et après polymérisation, les microparticules dont la taille ne dépasse pas 50 nm (dans le cas de la microémulsion globulaire inverse) ou 100 nm (dans le cas de la microémulsion inverse bicontinue) sont thermodynamiquement très stables. L'amorçage peut avoir lieu dans la phase huile (photoamorçage par irradiation U.V. en présence d'AIBN, utilisation du couple redox liposoluble hydroxyperoxyde de cumène/chlorure de thionyle) ou dans la phase aqueuse (utilisation du couple redox hydrosoluble hydroperoxyde de *ter*Butyle/métabisulfite de sodium). Les masses molaires des polymères obtenus sont souvent très importantes ( $10^6$ - $10^7$ ) mais leur manipulation est aisée

car la viscosité du milieu reste faible, la concentration finale en polymère pouvant dépasser 20 % (cas de la microémulsion inverse bicontinue). Les polydispersités en taille des particules finales (microlatex) sont faibles et de l'ordre de 1,15.

E. Volpert *et al.*<sup>97,98</sup> ont montré que la copolymérisation micellaire de l'acrylamide et d'un monomère *N,N*-dialkylé (*N,N*-dihexylacrylamide) conduisait à la formation d'un polymère multiblocs et homogène en composition, les séquences hydrophobes étant réparties statistiquement le long de la chaîne macromoléculaire et constituées d'un même nombre de groupements hydrophobes.

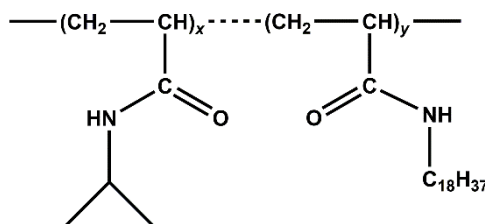
M. Pabon<sup>99</sup> a appliqué la technique de polymérisation en microémulsion inverse à la synthèse d'un terpolymère acrylamide-acrylate de sodium-méthacrylate de *tert*-octylphénoxy-poly(oxyéthylène) dont la structure et les propriétés rhéologiques dépendent étroitement de la localisation des réactifs (monomères, amorceur) dans le milieu réactionnel.



**Figure 19** : Exemples de polyacrylamides modifiés obtenus par copolymérisation micellaire (A)<sup>98</sup> et en microémulsion (B)<sup>99</sup> ( $n \sim 30$ ).

Les dérivés du poly(*N*-isopropylacrylamide) ou poly(NIPAM) quant à eux sont obtenus plus simplement par copolymérisation radicalaire en milieu organique du NIPAM (soluble dans la majeure partie des solvants organiques) et d'un *N*-alkyl (cf. figure 20) ou d'un *N,N*-dialkylacrylamide hydrophobe. Winnik *et al.*<sup>100,101</sup> ont étudié les propriétés de ce type de polymère en utilisant un monomère comportant une sonde fluorescente (dérivé pyrényle ou naphthyle). Ils ont pu ainsi, d'une part mettre en évidence l'existence de microdomaines hydrophobes en solution aqueuse et disposer, d'autre part, d'informations sur la conformation des chaînes

macromoléculaires. Ces polymères amphiphiles présentent la propriété intéressante de s'adsorber à la surface des liposomes et de les stabiliser *in vitro* à température ambiante<sup>102,103</sup>.



**Figure 20** : Exemple de poly(NIPAM) modifié développé par F. Winnik et ses collaborateurs<sup>100,101</sup>.

Ces propriétés associatives sont donc bien adaptées à la stabilisation de dispersions colloïdales. Elles sont cependant très sensibles aux facteurs extérieurs tels que la température par exemple.

Comme les tensioactifs non ioniques, les polymères amphiphiles non ioniques présentent une température critique au-delà de laquelle la solution aqueuse se trouble. Cette température est appelée LCST (**L**ower **C**ritical **S**olution **T**emperature). Le phénomène a été très étudié<sup>104,105</sup>, il aboutit généralement à une séparation de phases. Il se forme en effet une phase riche en polymère au-dessus d'une phase appauvrie en polymère. Bien que l'influence de la masse et de la structure du polymère sur la LCST soit connue<sup>106</sup>, le mécanisme engendrant la ségrégation de phase est assez mal défini.

H. Ringsdorf et F. M. Winnik<sup>100,101</sup> ont étudié le phénomène avec un poly(NIPAM) modifié hydrophobiquement. Ils ont montré qu'en chauffant une solution aqueuse de ce polymère, l'énergie apportée engendre la rupture des interactions eau-polymère (de type liaison hydrogène). La chaîne hydrophile macromoléculaire moins solvatée adopte une conformation plus compacte, les associations hydrophobes intermoléculaires sont détruites et chaque groupement liposoluble est alors contenu dans un microdomaine formé par les repliements de la chaîne macromoléculaire. Il y a séparation de phases à l'échelle macroscopique et à l'échelle moléculaire.

Les applications dans ce domaine sont intéressantes, Miyazaki & Kataoka<sup>107</sup> sont parvenus par exemple, à séparer deux colorants d'affinités différentes pour les milieux polaires dans une solution aqueuse de poly(-*N-N*-diméthylacrylamide)-*co*-(*N*-phénylacrylamide) à une température supérieure à la LCST.

D'un point de vue plus fondamental, les propriétés partiellement hydrophobes conférées aux chaînes macromoléculaires à température élevée ont conduit différents auteurs à élaborer de nouvelles structures associatives telles que les polymères thermo-épaississants. Ces polymères

sont des polyacides acryliques modifiés dont les chaînes latérales sont elles-mêmes soit des polymères hydrosolubles tels que les POE<sup>108</sup>, les poly(NIPAM)<sup>109</sup>, soit des copolymères NIPAM-comonomères hydrophiles (acrylamide, acrylamido-2-méthyl propane sulfonate de sodium) ou NIPAM-comonomères hydrophobes (méthacrylate de butyle)<sup>110</sup>. Lorsque la température augmente et atteint la LCST, les chaînes latérales hydrophiles perdent leur affinité pour l'eau et se comportent comme des chaînes hydrophobes en formant des associations. La viscosité augmente alors en fonction de la température.

Une application biologique de cette propriété est la stabilisation-déstabilisation thermocontrôlée des liposomes<sup>102,103,111</sup>. Lorsqu'un poly(NIPAM) modifié est adsorbé à la surface du lipide, la conformation de la chaîne macromoléculaire aura une influence locale sur la courbure de la vésicule. Plus la conformation est étendue moins la courbure est importante et plus la conformation sera compacte, plus la courbure sera importante. Il est possible de contrôler la taille des liposomes en modulant simplement la température du milieu. En se plaçant avant la LCST du polymère, les vésicules sont stables. Au-delà de la LCST, la bicouche lipidique est à l'état cristallin liquide. Les contractions des chaînes macromoléculaires provoquent de fortes courbures locales de la membrane. Les vésicules ainsi déstabilisées fissionnent. Le processus est réversible. Lorsque la température est de nouveau inférieure à la LCST et que la bicouche lipidique a perdu sa fluidité, les liposomes fusionnent.

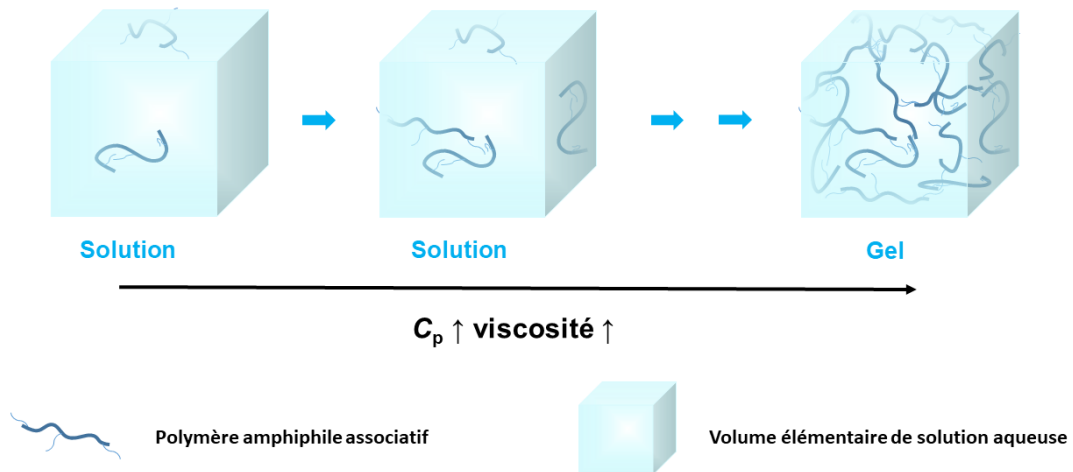
L'influence de la température sur le comportement des polymères associatifs en solution aqueuse a donc été très bien exploitée. Cependant, nous ne pouvons parler des variations des propriétés associatives en fonction des stimuli extérieurs sans décrire quelque peu les méthodes utilisées pour caractériser ces propriétés.

### ***Propriétés physico-chimiques majeures des polymères associatifs.***

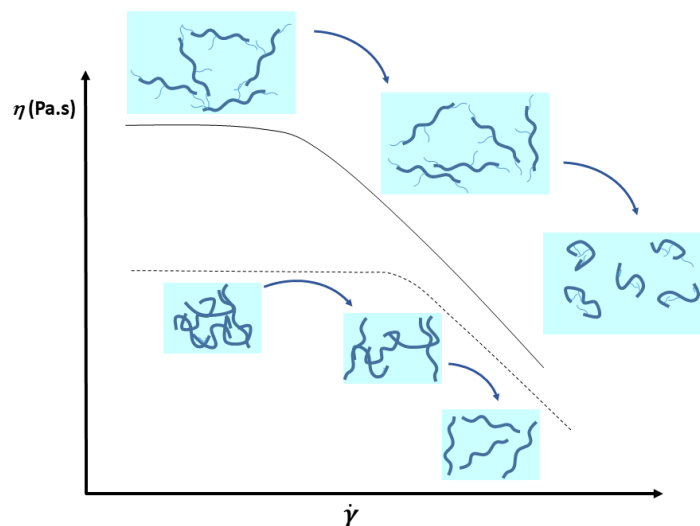
Un polymère associatif est essentiellement caractérisé, comme nous l'avons dit, par ses propriétés épaississantes. Il présente en effet la particularité de former des réseaux tridimensionnels (cf. figure 21) en solution au-delà d'une certaine concentration. Le phénomène se traduit par une forte augmentation de la viscosité et c'est cette évolution de la viscosité de la solution qui est étudiée en fonction de l'influence de différents paramètres.

*L'influence d'une contrainte appliquée à la solution par exemple.* Cette force engendre un cisaillement qui, devenu suffisamment important, provoque la déstructuration du réseau

tridimensionnel et donc une diminution de la viscosité. Les viscosités des solutions de polymères amphiphiles sont généralement beaucoup plus élevées que celles des solutions d'homopolymères précurseurs, à concentration égale. La chute de la viscosité observée lorsque le gradient de vitesse augmente traduit un comportement rhéofluidifiant de la solution de polymère (cf. figure 22). Le processus étant réversible, si le cisaillement n'est plus appliqué, les associations se reforment et la solution retrouve sa viscosité initiale.

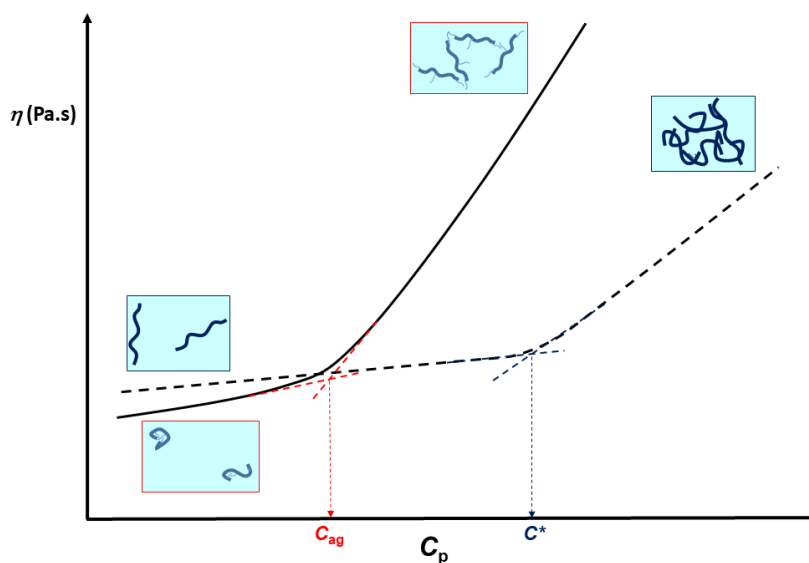


**Figure 21 :** Schéma d'un réseau tridimensionnel formé par interactions hydrophobes de polymères associatifs en solution aqueuse. La viscosité de la solution augmente avec  $C_p$ , la concentration en polymère. Au-delà d'une certaine concentration l'augmentation de la viscosité est liée aux interactions hydrophobes s'établissant entre les chaînes latérales des macromolécules conduisant à la formation d'un réseau tridimensionnel et donc à la gélification de la solution.



**Figure 22 :** Evolution de la viscosité apparente en fonction du gradient de vitesse de cisaillement pour un polymère associatif (—) et l'homopolymère précurseur (---), et schématisation des mécanismes associatifs impliqués.

*L'influence de la concentration en polymère.* La viscosité augmente lorsque la concentration en polymère augmente car le nombre de molécules de soluté augmente. Pour un homopolymère non associatif, une augmentation plus rapide de la viscosité est due à l'enchevêtrement des chaînes macromoléculaires qui intervient à partir d'une concentration critique appelée  $C^*$  ou « C-star ». La viscosité, dans le cas des polymères modifiés (associatifs), va cependant augmenter beaucoup plus vite avec la concentration car les associations hydrophobes vont se former pour des concentrations très faibles, bien inférieures à celle de la concentration critique  $C^*$ . La concentration à laquelle interviennent les phénomènes d'association est appelée concentration critique d'agrégation (cf. figure 22 et 23).

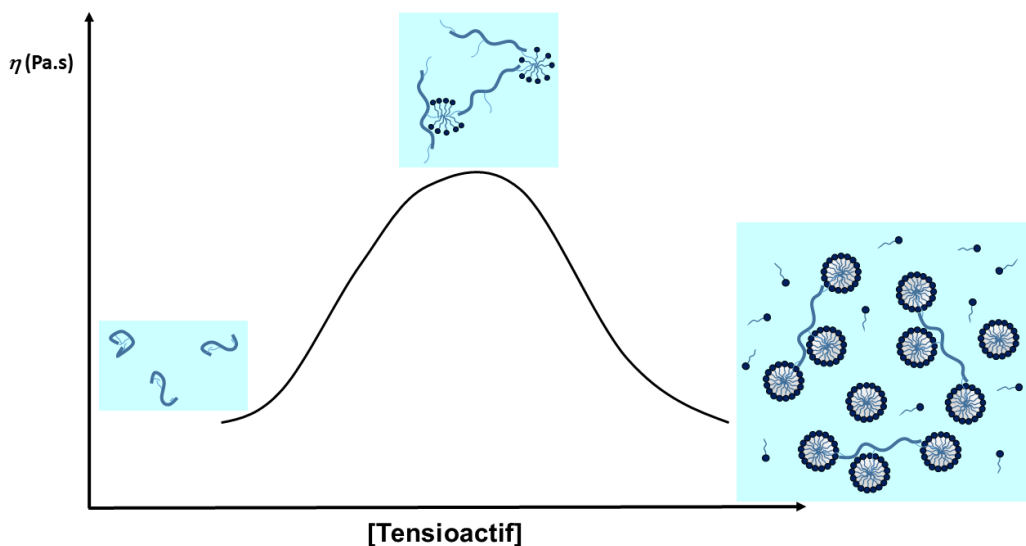


**Figure 23** : Schématisation de l'évolution de la viscosité en fonction de la concentration typiquement observée pour un polymère associatif (—) et l'homopolymère précurseur correspondant (---).  $C_{ag}$  correspond à la concentration critique d'agrégation du polymère associatif. Les états associatifs des polymères ont été illustrés pour chacun des polymères précurseur (encadré bleu) et associatif (encadré rouge) dans le régime dilué et à concentration élevée.

Il faut noter que les solutions diluées de polymères associatifs (dont la concentration est inférieure à la concentration critique d'agrégation), présentent une viscosité souvent inférieure à celle des solutions d'homopolymères précurseurs de même concentration. Ceci s'explique par le fait que les interactions hydrophobes sont de type intramoléculaire lorsque les concentrations sont faibles. Il y a donc contraction de la pelote macromoléculaire et baisse du volume hydrodynamique. Avec l'homopolymère ce phénomène ne se produit pas et la viscosité observée reste, dans ce cas, supérieure à celle de la solution de polymères associatifs (cf. figure 23).

*La présence de tensioactif dans la solution* peut aussi avoir une forte influence sur ses propriétés rhéologiques. En effet, lorsqu'un tensioactif est ajouté en quantité croissante dans une solution de

polymères amphiphiles associatifs, la viscosité augmente fortement pour atteindre un maximum puis baisse au fur et à mesure que la concentration en tensioactif augmente<sup>85</sup> (cf. figure 24). Ce phénomène s'explique par le fait que le tensioactif va former des micelles mixtes avec les groupements hydrophobes latéraux des polymères. Ces micelles mixtes sont très stables et peuvent englober plusieurs groupements lipophiles n'appartenant pas tous à une même et seule macromolécule. Ce mécanisme de pontage inter-chaîne et la stabilité des interactions hydrophobes contribuent à une très forte augmentation de la viscosité pouvant conduire à la gélification du système. Le phénomène intervient pour des concentrations en tensioactif souvent nettement inférieures à sa CMC. Si la concentration en tensioactif augmente, elle peut devenir suffisante pour que chaque micelle mixte n'incorpore qu'un seul groupement hydrophobe, les associations intermoléculaires sont donc rompues et la viscosité chute.



**Figure 24** : Evolution de la viscosité d'une solution de polymère associatif en fonction de la concentration en tensioactif et illustration des mécanismes associatifs impliqués.

*Les variations de température* peuvent avoir une influence sur les propriétés rhéologiques de certains polymères associatifs. Avec les polymères thermoépaississants une augmentation de température entraîne une augmentation de la viscosité. Par contre avec la majorité des polymères associatifs, une augmentation de la température favorise la « solubilisation » des groupements hydrophobes et les associations intermoléculaires diminuant, la viscosité baisse. On observe aussi le cas où la viscosité reste constante malgré l'élévation de température.

*La force ionique du solvant* peut avoir une influence plus ou moins importante sur la viscosité, suivant la nature du polymère.



- Dans le cas d'un polymère neutre, une augmentation de la concentration en sel peut provoquer une diminution de la « solubilisation » des groupements latéraux lipophiles (effet de « salting out ») et donc un renforcement des associations hydrophobes qui entraîne une augmentation de la viscosité. Ce phénomène a été observé pour des polyacrylamides modifiés<sup>112</sup>.

- Dans le cas d'un polyélectrolyte, une augmentation de la concentration en sel est accompagnée d'un écrantage des charges et d'une baisse des répulsions électrostatiques intra et intermoléculaires. La diminution des interactions répulsives intramoléculaires engendre une baisse du volume hydrodynamique de chaque macromolécule et favorise donc une baisse de la viscosité. Cependant, la baisse des interactions répulsives intermoléculaires et l'effet de « salting out » contribuent à la rehausser, les associations hydrophobes intermoléculaires étant alors favorisées. La viscosité de la solution est donc la résultante de ces effets antagonistes.

L'impact de ces polymères associatifs sur la rhéologie des solutions est donc extrêmement important et justifie pleinement les recherches qui sont menées pour la mise au point de nouveaux substrats utilisables dans des secteurs aussi différents que les peintures, l'agroalimentaire, la cosmétologie ou encore les domaines médicaux et biomédicaux. C'est à ce dernier aspect que nous avons porté notre attention et il nous a paru intéressant de développer de nouveaux polymères ou télomères amphiphiles susceptibles de présenter un intérêt pour la stabilisation des protéines hydrophobes en solution aqueuse ou encore pour la modulation des propriétés rhéologiques des solutions utilisables dans le domaine biomédical et le transport de principes biologiquement actifs.

Nous avons donc entrepris la synthèse d'amphipols et de polymères amphiphiles associatifs à partir d'un même synthon polymérisable hydrosoluble très utilisé au laboratoire et présentant une excellente biocompatibilité : le Tris(hydroxyméthyl)acrylamidométhane (THAM).

Ce monomère présente toutefois la particularité de polymériser à des vitesses très élevées dans les solvants polaires (notamment dans l'eau). Cette réactivité pourrait s'expliquer par l'existence d'un processus d'agrégation du monomère dans ces solvants. Il nous a donc paru intéressant, dans un premier temps, de vérifier l'existence de ces agrégats et de déterminer quels sont les principaux facteurs qui interviennent sur la réactivité anormalement élevée du monomère. Nous avons dans ce but procédé à une étude approfondie comparative des cinétiques de polymérisation de ce monomère et de quelques-uns de ses dérivés. Une meilleure connaissance des propriétés du monomère devrait permettre, d'une part, de mieux définir les conditions expérimentales optimales permettant le contrôle de la vitesse de polymérisation et donc des masses des macromolécules

obtenues et, d'autre part, de mieux appréhender l'impact de ces propriétés à l'échelle macromoléculaire.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail préliminaire est reporté dans le premier chapitre.

# **CHAPITRE I**

*Cinétique de polymérisation et de  
télomérisation du  
Tris(hydroxyméthyl)acrylamidométhane  
(THAM) et de ses dérivés.*

## *D) INTRODUCTION*

L'élaboration de structures amphiphiles biocompatibles destinées à diverses applications médicales, biomédicales ou biochimiques représente depuis une quinzaine d'années l'une des activités principales du Laboratoire de Chimie Bioorganique et des Systèmes Moléculaires Vectoriels. Les études qui sont développées dans ce cadre portent essentiellement sur la préparation de tensioactifs non ioniques dérivés, dans la majorité des cas, de synthons naturels tels que les glucides, les peptides ou les acides gras, ou de substrats fortement hydrophiles tels que le Tris(hydroxyméthyl)aminométhane ou Tris.

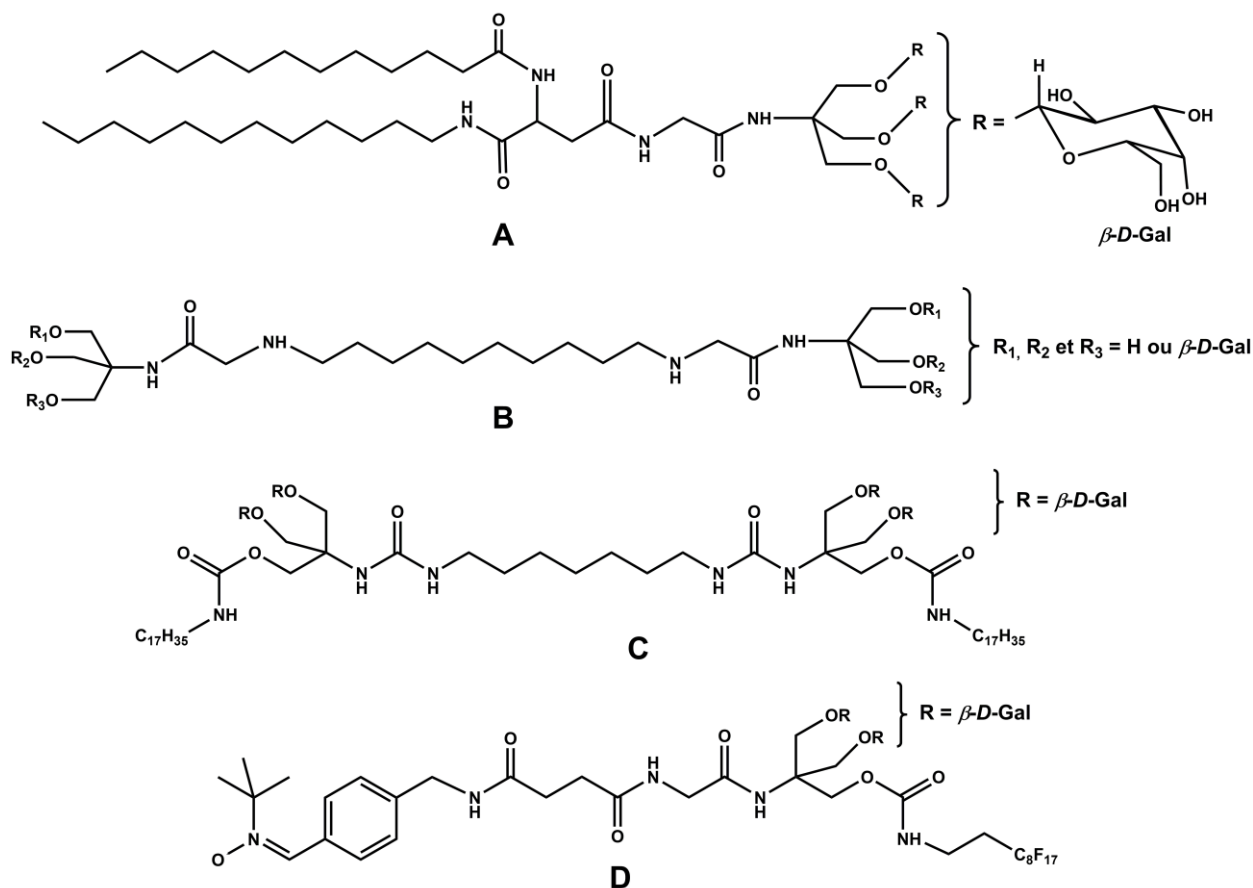
Le Tris est un substrat bien connu des biologistes puisqu'il est couramment employé pour la préparation de solutions tampons. En médecine, il est également utilisé pour traiter les acidoses sanguines du nouveau-né ou des grands brûlés. Ce composé non toxique comporte trois fonctions alcool et une fonction amine particulièrement attrayantes pour le chimiste organicien qui peut dès lors envisager de multiples modifications structurales en fonction de ses besoins ou de ses attentes.

Il est ainsi possible de greffer sur le Tris divers groupements de nature et de taille différentes en jouant sur les différences de réactivité de chacune des fonctions. Par ailleurs, si ces groupements diffèrent aussi par leurs propriétés physicochimiques et notamment par leur caractère lipophile ou hydrophile, une structure amphiphile peut être facilement obtenue (cf. figure 1.1).

Plusieurs structures de ce type déjà synthétisées au laboratoire présentent des applications très variées dans les domaines biologiques et médicaux (cf. figure 1.1).

Certaines d'entre elles sont des composés de nature glycolipidique<sup>113,114</sup>, c'est-à-dire comportant une partie hydrophobe constituée d'une chaîne perhydro ou perfluoroalkyle et d'une partie hydrophile constituée d'un ou plusieurs groupements saccharidiques. Ces glycolipides (cf. figure 1.1, structure **A**), peuvent être utilisés en fonction de la nature de leur partie hydrophobe soit pour l'extraction des protéines membranaires, soit pour former des vésicules biocompatibles utilisables pour l'encapsulation de principes actifs.

Dans ce même but, des composés amphiphiles dérivés du Tris de type bolaforme et gemini<sup>115</sup> (cf. figure 1.1, composés **B** et **C**) ont été synthétisés. Le Tris a également trouvé d'autres applications telles que la synthèse de nitrones glycolipidiques<sup>116</sup> amphiphiles utilisables comme spin-trap *in vitro* et *in vivo* (cf. figure 1.1 composé **D**).



**Figure 1.1** : Exemples de structures amphiphiles dérivées du tris développées au laboratoire<sup>113-116</sup>.

Si le Tris à l'état monomère a permis de disposer de structures amphiphiles variées susceptibles de présenter de multiples applications, il est très vite apparu intéressant de connaître les propriétés que pourrait présenter une molécule comportant de multiples motifs Tris.

Ce composé doté de ses trois fonctions hydroxyméthyle greffées sur un même carbone a donc été abondamment utilisé dans les synthèses d'arborols ou de dendrimères. Rappelons ici que les dendrimères sont des molécules présentant une structure arborescente dont le nombre de motifs constitutifs est connu et parfaitement défini. Les dendrimères du Tris ainsi préparés ont trouvé de nombreuses applications dont l'étude des interactions saccharides-glycoprotéines membranaires<sup>117</sup> ou l'incorporation d'un noyau porphyrine<sup>118</sup>.

Enfin, le greffage sur la fonction amine du Tris d'un groupement acryloyle polymérisable ouvre la voie à la synthèse d'une très grande variété de macrostructures de type télomère, oligomère ou enfin polymère. Le monomère Tris(hydroxyméthyl)acrylamidométhane ainsi synthétisé sera appelé THAM.

Il est en effet possible d'obtenir, après polymérisation par voie radicalaire de ce monomère, un polyTris, molécule théoriquement hydrosoluble et présentant par la même occasion un nombre

important de fonctions alcool et donc de sites d'ancrage potentiels de principes actifs, de groupements hydrophobes, hydrophiles ou autres.

Ainsi, en considérant uniquement le caractère hydrophile de ces polyols, il est apparu rapidement envisageable de disposer d'un tensioactif non ionique comportant une partie lipophile et une partie hydrophile constituée par un polyTRIS de degré de polymérisation moyen en nombre ( $\overline{DP}_n$ ) suffisant pour assurer l'hydrosolubilité de la structure. De telles structures sont aisément obtenues en effectuant la polymérisation du THAM en présence d'un agent de transfert de chaîne de type alkanethiol<sup>119</sup>.

Cet agent de transfert ou télogène limite la taille du macroradical en croissance. Il permet d'obtenir des oligomères ou télomères du TRIS dotés d'une chaîne grasse lipophile. L'ensemble queue hydrophobe-tête hydrophile polyol constitue une structure amphiphile. Ces structures ont été baptisées H-TAC ou F-TAC (TrisAcrylamide Conjugué) suivant que la chaîne hydrophobe est hydrocarbonée ou perfluorocarbonée (cf. figure 1.2, composé **E**). Les tests biologiques réalisés sur ces tensioactifs non ioniques ont montré que les télomères du THAM (et notamment les F-TAC) étaient très peu toxiques et parfaitement biocompatibles<sup>120-123</sup>.

Ces télomères ont depuis trouvé de nombreuses applications en chimie en tant que stabilisants d'émulsion fluorée<sup>124</sup> ou catalyseurs en catalyse micellaire<sup>125</sup> ainsi que dans le domaine biologique où les H-TAC utilisés pour l'extraction et la solubilisation de protéines membranaires se sont révélés au moins aussi efficaces que les détergents classiques tels que le Triton X-100 ou le Tween-20<sup>126,127</sup>. Ces télomères ont aussi montré une bonne aptitude à se fixer sur les récepteurs membranaires<sup>128,129</sup> et à diffuser à travers les membranes biologiques<sup>130</sup> et se sont alors révélés être de parfaits candidats pour la vectorisation de principes actifs tels que l'ara-C<sup>131</sup> (cf. figure 1.2, composé **F**) ou le 5-Fu<sup>132</sup> (cf. figure 1.2, composé **G**).

Enfin, toujours dans le but de disposer de macromolécules aptes à transporter un principe actif, un autre travail a consisté à élaborer des structures dérivées du THAM destinées à former des vésicules polymérisables<sup>133</sup> (cf. figure 1.2, composé **H**) ou non<sup>134</sup> (cf. figure 1.2, composé **I**) en phase aqueuse et susceptibles d'encapsuler le principe actif.

Toutefois, si une quantité importante de travaux couvrant les nombreuses applications potentielles des dérivés du THAM a été réalisée à ce jour, certains aspects fondamentaux concernant ce monomère et sa réactivité, notamment ses constantes cinétiques de polymérisation, restent encore mal connus car peu caractérisés.



Une des interprétations possibles de tels phénomènes pourrait être la formation de fortes liaisons hydrogène intermoléculaires entre fonctions hydroxyle et/ou fonctions amide qui aboutiraient à l'agrégation des monomères entre eux (et/ou avec le macroradical en croissance). Ainsi les centres réactifs très proches les uns des autres présenteraient alors une réactivité sans commune mesure à celles habituellement observée pour d'autres monomères en milieu non organisé.

Actuellement, aucune expérience n'a été menée afin de valider ou d'infirmer de telles hypothèses. Celles-ci semblent à première vue peu recevables, car des solvants polaires tels que l'eau ou le méthanol sont de très bon donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène. Dans ce cas, les molécules de solvants présentes en large excès dans le milieu réactionnel devraient fortement compromettre l'existence de tout phénomène d'agrégation du monomère en phase polaire. Cependant, nous n'avons pas trouvé, en l'état actuel de nos connaissances, de meilleure explication.

Précisons aussi que la présence de trois fonctions hydroxyles sur un même monomère limite son utilisation dans les solvants organiques habituellement utilisés car la macrostructure obtenue particulièrement polaire s'avère insoluble dans le milieu réactionnel. La synthèse de macromolécules dérivant du THAM nécessitera donc souvent l'intervention de protections spécifiques des fonctions alcool de façon à rendre le monomère et surtout le polymère final soluble en milieu organique. De telles protections spécifiques sont également très utilisées lors de la préparation de dérivés du THAM lorsque seulement une ou deux des fonctions hydroxyle sont modifiées.

Il paraît donc utile et nécessaire de préciser dans quelles proportions la vitesse de polymérisation du THAM est modifiée lorsqu'un ou plusieurs de ces groupements protecteurs sont introduits. La connaissance de ces paramètres cinétiques est en effet essentielle et représente une première étape importante si l'on veut par exemple connaître et comprendre la composition d'un copolymère obtenu après copolymérisation de différents dérivés du THAM.

Compte tenu de ces observations, le travail présenté dans le présent chapitre a donc eu pour but, d'une part de préciser l'influence de différents facteurs structuraux sur la réactivité du THAM et de ses dérivés, et d'autre part, de vérifier l'hypothèse selon laquelle le THAM donnerait des agrégats dans les solvants polaires.



Nous avons ainsi effectué une série d'études de cinétiques de polymérisation du THAM et de certains de ses dérivés présentant une, deux ou trois fonctions alcool protégées.

Les résultats obtenus devaient nous permettre d'établir une échelle de réactivité en fonction du nombre de fonctions hydroxyle protégées et/ou de la nature et de la taille du groupement protecteur. Nous devons alors pouvoir de la même façon quantifier l'importance des modifications de la réactivité dues à la présence d'un ou plusieurs groupements protecteurs.

A toute fin utile, nous avons procédé, dans la section suivante, à un bref rappel sur les notions de polymérisation et de télomérisation par voie radicalaire la technique utilisée et les résultats obtenus dans le cadre de ces expériences sont exposés dans les parties subséquentes.

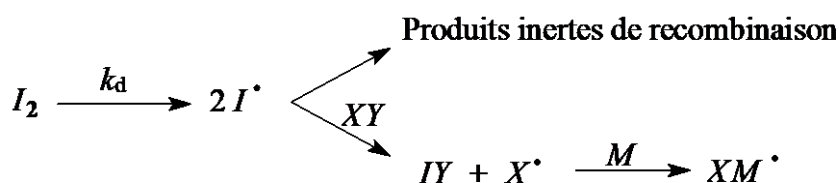
## II) RAPPELS SUR LES NOTIONS DE TÉLOMÉRISATION

La télomérisation radicalaire s'apparente globalement à la polymérisation radicalaire, dans le sens où elle consiste en l'autoaddition d'un monomère insaturé polymérisable  $M$  initié par un amorceur radicalaire. Elle s'en différencie dans le sens où les réactions de terminaison de chaînes par dismutation ou combinaison sont très majoritairement substituées par des réactions de transfert de chaîne à un agent de transfert communément appelé télogène et désigné par les lettres  $XY$ . Les produits de la réaction de type  $X(M)_nY$  sont appelés télomères.

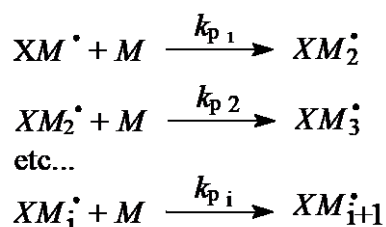
### 1) Description des différentes étapes d'une réaction de télomérisation

Considérons la télomérisation d'un monomère  $M$  en présence d'un agent télogène  $XY$  amorcée par un amorceur  $I_2$ . Les différentes étapes intervenant sont :

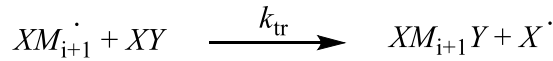
- **l'étape d'amorçage** qui est l'étape durant laquelle une molécule d'amorceur radicalaire se décompose suivant un procédé homolytique pour former deux molécules de radicaux libres. Ces derniers peuvent soit donner des produits inertes de recombinaison, soit amorcer la polymérisation du monomère  $M$ , soit réagir avec l'agent télogène  $XY$  pour conduire à la formation de nouveaux radicaux libres secondaires qui vont alors s'ajouter sur les premières molécules de monomères.



- **l'étape de propagation** où des molécules de monomères s'ajoutent sur le radical  $XM^\bullet$  et contribuent ainsi à la croissance du macroradical formé  $XM_i^\bullet$ .



- **l'étape de transfert** correspondant à l'arrêt de croissance du macroradical  $XM_{i+1}^\bullet$  qui a réagi sur une autre molécule  $XY$  présente dans le milieu réactionnel pour former un nouveau radical  $X^\bullet$ .



Cette réaction de transfert à l'agent télégène limite la masse moléculaire des produits mais n'a aucune influence sur la vitesse de propagation.

Le degré moyen de polymérisation en nombre ( $\overline{DP}_n$ ) à l'instant  $t$  peut être estimé à l'aide de la loi de Mayo<sup>137</sup> qui est une approximation de la loi classique de polymérisation :

$$\frac{1}{\overline{DP}_n} = \frac{1}{\overline{DP}_0} + \sum_i C_i \frac{[TB]}{[M]} \quad (1)$$

où  $\overline{DP}_0$  est le  $\overline{DP}_n$  en absence d'agent de transfert et  $C_i$  est la constante de transfert à un agent de transfert quelconque  $TB$ . Cette constante  $C_i$  est égale au rapport de la constante de vitesse de transfert ( $k_{tr}$ ) du radical polymère à  $TB$  à la constante de vitesse de propagation du radical polymère au monomère ( $k_p$ ).

Le terme  $1/\overline{DP}_0$  et ceux relatifs aux transferts autres que celui à l'agent télégène  $XY$  étant négligeables, on déduit la loi de Mayo utilisable pour la télomérisation :

$$\frac{1}{\overline{DP}_n} = C_T \cdot \frac{[XY]}{[M]} \quad (2)$$

où  $C_T$  est la constante de transfert du télégène  $XY$  au monomère  $M$  et est définie par la relation :

$$C_T = \frac{k_{tr}}{k_p} \quad (3)$$

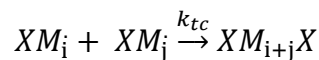
Pour une valeur donnée de  $C_T$ , le rapport  $[XY]/[M]$  détermine le  $\overline{DP}_n$  à l'instant  $t$ .

Si la constante de transfert  $C_T$  est proche de 1, le  $\overline{DP}_n$  du télomère obtenu aura pu être préalablement fixé par le rapport de la concentration initiale en télégène à la concentration initiale en monomère :

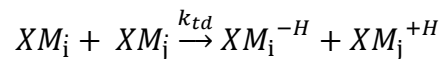
$$\frac{1}{\overline{DP}_n} \approx R_0 = \frac{[XY]_0}{[M]_0} \quad (4)$$

- **l'étape de terminaison** qui est l'étape de la disparition des radicaux, ce phénomène pouvant se produire de deux façons différentes qui sont la recombinaison de deux radicaux et la dismutation.

La recombinaison de deux radicaux implique que deux macroradicaux vont réagir l'un avec l'autre pour former une liaison covalente suivant un mécanisme homolytique.



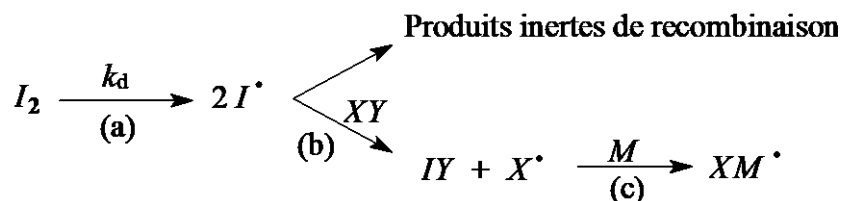
La dismutation correspond à un transfert de protons entre les deux macroradicaux qui conduit à la formation de deux chaînes macromoléculaires dont une comportera une oléfine terminale.



En télomérisation, la longueur de chaîne moyenne est régulée par le transfert au télogène et très peu par ces étapes de terminaison dont l'impact sur la taille du polymère final peut être négligé.

## 2) Expression cinétique des différentes étapes

### 2.1) Étape d'amorçage



Les réactions (b) et (c) mettent en jeu des radicaux très réactifs, leurs vitesses sont donc très élevées. La réaction de décomposition de l'amorceur (réaction (a)) est l'étape lente et détermine la vitesse d'amorçage  $V_a$  qui est définie par :

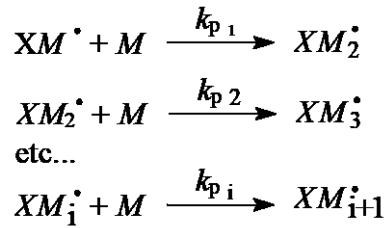
$$V_a = 2fk_d[I_2] \quad (5)$$

où  $f$  est le facteur d'efficacité (la fraction de radicaux, formés par décomposition de l'amorceur, qui prennent effectivement part à l'initialisation de la chaîne) et  $k_d$  la constante de vitesse de décomposition. Cette relation repose sur la supposition que la vitesse d'initialisation est égale à celle de la production des radicaux primaires.

Dans la plupart des cas, cette étape est du premier ordre mais on peut cependant rencontrer des vitesses proportionnelles à  $[I_2]^{3/2}$  notamment avec le peroxyde de benzoyle.

### 2.2) Étape de propagation

D'après Flory, il est permis de supposer que la réactivité d'un radical est indépendante de sa taille lorsque celle-ci est suffisamment importante ( $\overline{DP}_n > 5$ ).

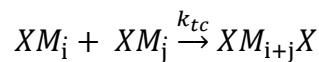


Dans ce cas les constantes de vitesse de propagation  $k_{pi}$  seront toutes égales et la vitesse de propagation est alors définie par la relation suivante :

$$V_p = -\frac{d[M]}{dt} = \sum_i V_{pi} = \sum_i k_{pi} [XM_i^\bullet][M] = k_p [M^\bullet][M] \quad (6)$$

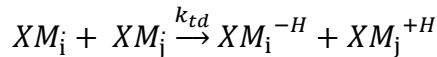
où  $M^\bullet$  représente tous les radicaux en croissance.

### 2.3) Étape de terminaison



La vitesse de terminaison par recombinaison de deux chaînes en croissance est définie par la relation suivante :

$$V_{tc} = 2k_{tc} [M^\bullet]^2 \quad (7)$$



La vitesse de terminaison par dismutation est définie par :

$$V_{td} = 2k_{td} [M^\bullet]^2 \quad (8)$$

La vitesse globale de terminaison s'écrit alors :

$$V_T = 2k_t [M^\bullet]^2 \quad (9)$$

Avec :

$$k_t = k_{tc} + k_{td} \quad (10)$$

Précisons que le facteur 2 précédant la constante de terminaison n'a pas de signification cinétique. En effet, considérons les vitesses de terminaison pour chaque radical d'ordre  $i$  en admettant que leurs constantes de vitesse  $k_t$  sont indépendantes de  $i$ , nous pouvons écrire :

$$V_{ti} = k_t [M_1^\bullet][M_i^\bullet] + k_t [M_2^\bullet][M_i^\bullet] + \dots + k_t [M_i^\bullet][M_i^\bullet] + k_t [M_n^\bullet][M_i^\bullet] \quad (11)$$

$$V_{ti} = k_t [M_i \cdot] \cdot ([M_1 \cdot] + [M_2 \cdot] + \dots + [M_i \cdot] + [M_n \cdot]) \quad (12)$$

$$\text{or } [M \cdot] = [M_1 \cdot] + [M_2 \cdot] + \dots + [M_i \cdot] + [M_n \cdot] \quad (13)$$

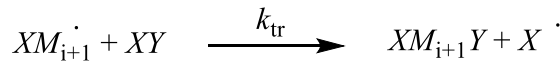
$$V_{ti} = k_t [M \cdot] [M_i \cdot] \quad (14)$$

De la relation (14) est déduite l'expression de la vitesse totale  $V_T$  :

$$V_T = \sum_i V_{ti} = k_t [M \cdot] \sum_i [M_i \cdot] = k_t [M \cdot]^2 \quad (15)$$

Néanmoins ce facteur 2 sera conservé afin d'être en accord avec les conventions généralement adoptées dans la littérature et par analogie avec l'expression de la vitesse d'amorçage.

#### 2.4) Étape de transfert



L'expression de la vitesse de transfert au télomère  $XY$  est donnée par la relation suivante :

$$V_{tr} = k_{tr} \cdot [XM_{i+1} \cdot] [XY] \quad (16)$$

### 3) Évolution des concentrations en réactifs

L'hypothèse de base de la polymérisation est l'établissement d'un état stationnaire de concentrations des centres actifs, admis dans tous les cas de réaction en chaîne. La concentration en radicaux libres est donc estimée constante et très faible car la constante de vitesse de leur disparition ( $k_t$ ) est beaucoup plus grande que celle de leur formation ( $k_d$ ).

Selon O'Brien & Gornick<sup>138</sup> nous pouvons dès lors écrire que la vitesse d'amorçage est égale à la vitesse de terminaison :

$$V_a = V_t \quad (17)$$

soit d'après les équations (5) et (9)

$$2f \cdot k_d \cdot [I_2] = 2k_t (M \cdot)^2 \quad (18)$$

d'où :

$$[M \cdot] = \left( \frac{f \cdot k_d \cdot [I_2]}{k_t} \right)^{1/2} \quad (19)$$

D'après l'équation (6), la vitesse de propagation devient :

$$V_p = k_p \cdot [M] \cdot \left( \frac{f \cdot k_d \cdot [I_2]}{k_t} \right)^{1/2} \quad (20)$$

### 3.1) Évolution de la concentration en amorceur

La vitesse de disparition de l'amorceur  $I_2$  est donnée par la relation suivante :

$$-\frac{d[I_2]}{dt} = k_d \cdot [I_2] \quad (21)$$

L'intégration de cette relation donne l'évolution de la concentration en amorceur en fonction du temps :

$$[I_2] = [I_2]_0 \cdot \exp(-k_d \cdot t) \quad (22)$$

### 3.2) Évolution de la concentration en monomère

En portant l'équation (22) dans l'équation (19), nous obtenons :

$$[M\cdot] = \left(\frac{f \cdot k_d}{k_t}\right)^{1/2} \cdot [I_2]_0^{1/2} \cdot \exp\left(-\frac{k_d \cdot t}{2}\right) \quad (23)$$

La vitesse de disparition en monomère donnée par la relation (6) devient alors :

$$V_p = -\frac{d[M]}{dt} = k_p \cdot [M] \cdot \left(\frac{f \cdot k_d}{k_t}\right)^{1/2} \cdot [I_2]_0^{1/2} \cdot \exp\left(-\frac{k_d \cdot t}{2}\right) \quad (24)$$

L'intégration de cette équation différentielle donne l'évolution de la concentration en monomère en fonction du temps, il s'agit de la relation de Tobolsky<sup>139</sup> :

$$\ln\left(\frac{[M]_0}{[M]}\right) = 2k_p \cdot \left(\frac{f \cdot [I_2]_0}{k_d \cdot k_t}\right)^{1/2} \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{k_d \cdot t}{2}\right)\right] \quad (25)$$

Où  $[M]_0$  et  $[M]$  représentent les concentrations molaires en monomère au temps initial et au temps  $t$ , respectivement.

La cinétique de la réaction en fonction du temps est donc définie par les constantes  $f k_p^2 / k_t$  et  $k_d$ .

### 3.3) Évolution de la concentration en télogène

La vitesse de disparition du télogène est donnée par la relation :

$$-\frac{d[XY]}{dt} = 2 \cdot f \cdot k_d \cdot [I_2] + k_{tr} \cdot [XY] \cdot [M\cdot] \quad (26)$$

Rigaud et al.<sup>140</sup> ont montré qu'à partir de cette équation il était possible d'obtenir la relation suivante donnant l'évolution de la concentration du télogène en fonction du temps :

$$[XY] = [XY]_0 \cdot \exp\left[\frac{2B}{k_d} \cdot \left(e^{-\frac{k_d}{2}t} - 1\right)\right] + \frac{A}{B} \cdot \left[\left(1 + \frac{k_d}{2B}\right) \cdot \exp\left[\frac{2B}{k_d} \cdot \left(e^{-\frac{k_d}{2}t} - 1\right)\right] - \frac{k_d}{2B} - e^{-\frac{k_d}{2}t}\right] \quad (27)$$

Avec  $A$  et  $B$  tels que :

$$A = 2fk_d[I_2]_0 \quad (28)$$

$$B = \sqrt{\frac{f \cdot k_d \cdot [I_2]_0}{k_t}} \cdot k_{tr} \quad (29)$$

### 3.4) Détermination de la constante $fk_p^2/k_t$

Plusieurs méthodes utilisables pour déterminer cette constante ont été décrites dans la littérature :

#### - la méthode traditionnelle

Elle consiste à porter la vitesse de propagation en début de réaction en fonction de la racine carrée de la concentration en amorceur :

$$V_{p0} = \sqrt{\frac{fk_p^2}{k_t}} \cdot [M]_0 \cdot \sqrt{[I_2]} \quad (30)$$

La pente est donc proportionnelle à  $fk_p^2/k_t$ .

#### - la méthode utilisée par Boutevin & Pietrasanta<sup>141</sup>

Elle utilise l'équation de Tobolsky (25) :

$$\ln\left(\frac{[M]_0}{[M]}\right) = 2k_p \cdot \left(\frac{f \cdot [I_2]_0}{k_d \cdot k_t}\right)^{1/2} \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{k_d \cdot t}{2}\right)\right] \quad (25)$$

En portant  $\ln [(M)_0/(M)]$  en fonction de  $[1 - \exp(-k_d \cdot t/2)]$  on obtient une droite dont la pente permet d'accéder à la valeur de  $fk_p^2/k_t$ . (C'est la méthode que nous avons utilisée pour nos expériences de cinétiques).

#### - La méthode dite « dead-end polymerization » développée par Tobolsky<sup>139</sup>

En reprenant la relation (25) sous sa forme logarithmique et en y intégrant deux nouveaux paramètres  $\alpha$  et  $\alpha^*$ , l'équation (25) devient :

$$-\ln \left[ \ln \left( \frac{1-\alpha}{1-\alpha^*} \right) \right] = -\ln 2 + \frac{1}{2} \cdot \ln \left( \frac{f \cdot k_p^2 \cdot [I_2]_0}{k_d \cdot k_t} \right) + \frac{k_d \cdot t}{2} \quad (31)$$

Où  $\alpha$  et  $\alpha^*$  sont respectivement les degrés d'avancement de la réaction à un instant  $t$  et un temps « infini » généralement égal à 10 fois le temps de demi-vie de l'amorceur, et définis comme suit :

$$\alpha = \frac{[M]_0 - [M]}{[M]_0} \quad (32)$$

$$\alpha^* = \frac{[M]_0 - [M]^*}{[M]_0} \quad (33)$$

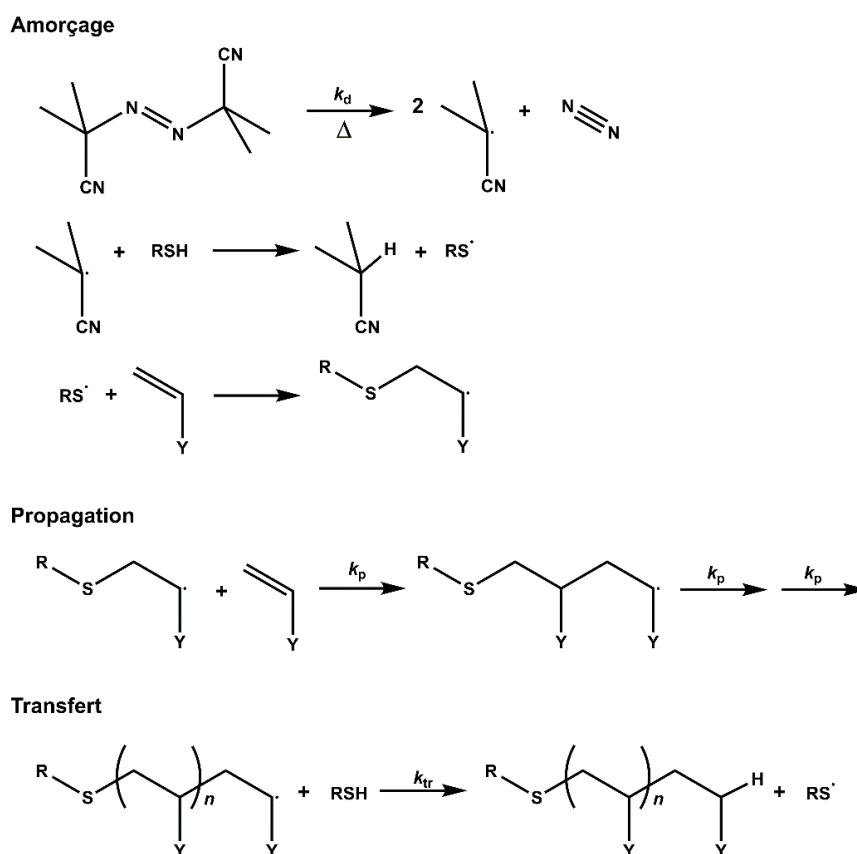


Avec  $(M)_0$ ,  $(M)$  et  $(M)^*$  les concentrations en monomère, respectivement, au début de la réaction, au temps  $t$  et à la fin de la réaction.

En portant  $-\ln \left[ \ln \left( \frac{1-\alpha}{1-\alpha^*} \right) \right]$  en fonction du temps, il est possible d'obtenir une droite dont la pente et l'ordonnée à l'origine permettent de calculer aussi bien le rapport  $fk_p^2/k_t$  que  $k_d$ .

#### 4) Description des réactions de télomérisation des monomères dérivant du THAM

Les réactions de télomérisation du THAM et de ses dérivés ont été souvent décrites dans la littérature<sup>126,127</sup>. Elles obéissent aux mêmes lois que celles explicitées pour la polymérisation radicalaire des monomères vinyliques dans les précédents paragraphes. La séquence réactionnelle type est schématisée dans la figure 1.3 ci-dessous.

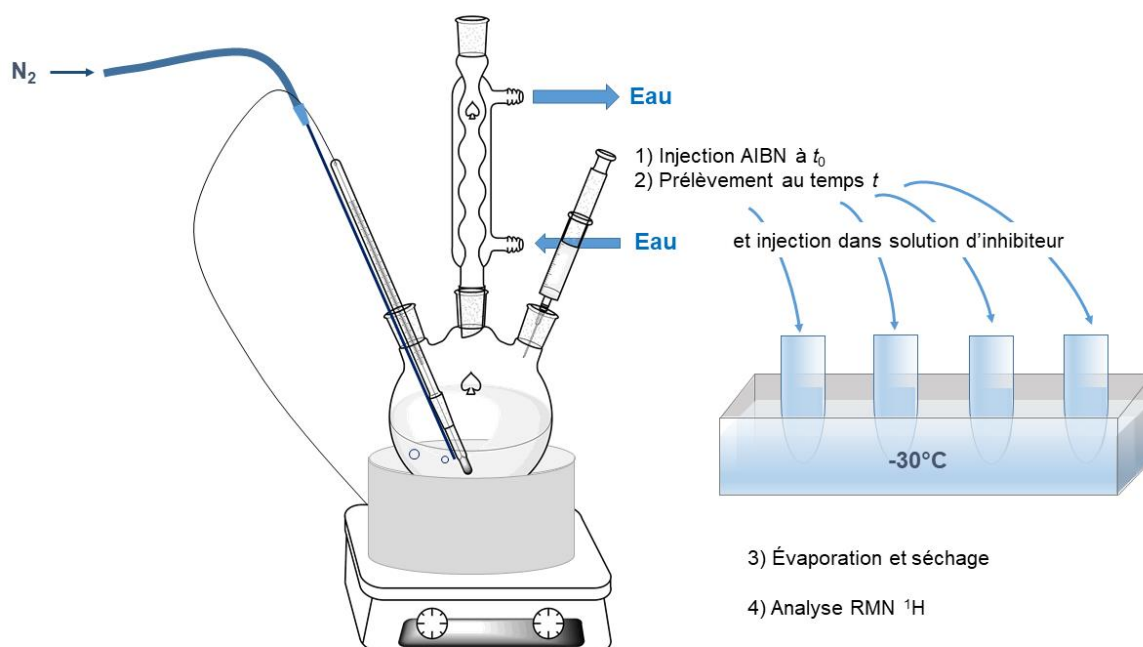


**Figure 1.3** : schéma descriptif des différentes étapes de la télomérisation radicalaire amorcée par l'AIBN du THAM ( $Y = -\text{CONH}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ) et de ses dérivés. L'étape de terminaison influant peu sur la taille du télomère n'a pas été représentée.

### III) PRÉSENTATION DU PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL ET DE LA MÉTHODE SUIVIE

Afin de préciser les valeurs de  $fk_p^2/k_t$  des différents monomères, nous avons effectué des cinétiques de polymérisation et de télomérisation à 65°C dans le méthanol à reflux ou dans l'eau, à 67°C dans le THF à reflux et à 80°C dans l'acétonitrile à reflux.

La procédure expérimentale globale mise en jeu est celle décrite par Pucci *et al.*<sup>135</sup> et illustrée dans la figure 1.4. Une description détaillée de la méthode est donnée dans la partie expérimentale.



**Figure 1.4** : montage et déroulement types d'une expérience de cinétique telle que menée dans le cadre de cette thèse.

Dans le cas des télomérisations nous avons utilisé un agent de transfert hydrophobe qui est le tétrahydro 1H,1H,2H,2H perfluorodécane-thiol. Ce thiol est commercial et possède une masse molaire suffisamment élevée ( $M = 490$  g/mol) pour limiter les erreurs de pesée.

Le rôle de l'agent de transfert est de limiter le  $\overline{DP}_n$  du macroradical en croissance et d'éviter sa précipitation dans le milieu réactionnel qui pourrait alors générer des erreurs de mesure. Comme nous l'avons vu, l'arrêt de la croissance des macroradicaux par transfert de chaînes n'affecte en

rien les constantes cinétiques de polymérisation. L'utilisation d'un agent télégène est donc judicieuse.

De façon à ce que l'hypothèse de Flory soit toujours vérifiée, c'est à dire que les constantes  $k_p$  puissent être considérées constantes, l'expérience acquise avec le THAM nous a conduit à fixer le rapport  $R_0 = [T_0] / [M_0]$  à 0,1 (nous obtenons ainsi un  $\overline{DP}_n$  légèrement supérieur à 10).

La réaction de télomérisation du monomère est amorcée à une température donnée sous atmosphère inerte après injection d'une solution d'amorceur de concentration exacte et connue. Des prélèvements (dix à quinze suivant le cas) du milieu réactionnel sont effectués à intervalle de temps réguliers et la composition du milieu réactionnel est déterminée par analyse RMN du proton après arrêt de la propagation (piégeage des radicaux libres par un inhibiteur).

De cette analyse RMN est déduit le rapport  $[M_0]/[M]$  où  $[M_0]_0$  est la concentration initiale en monomère et  $[M]$  sa concentration à l'instant  $t$ . L'évolution de ce rapport en fonction du temps est donnée par la relation de Tobolsky :

$$\ln \left( \frac{[M]_0}{[M]} \right) = 2k_p \cdot \left( \frac{f \cdot [I_2]_0}{k_d \cdot k_t} \right)^{1/2} \cdot \left[ 1 - \exp\left(-\frac{k_d \cdot t}{2}\right) \right] \quad (25)$$

Les différentes valeurs du rapport  $[M_0]/[M]$  sont portées sous la forme  $\ln([M]_0/[M])$  en fonction de  $[1 - \exp(1 - k_d \cdot t/2)]$  pour obtenir ainsi une droite de pente  $p$  telle que :

$$p = 2k_p \cdot \left( \frac{f \cdot [I_2]_0}{k_d \cdot k_t} \right)^{1/2} \quad (34)$$

La valeur de la pente  $p$  est déterminée graphiquement et le rapport  $f k_p^2 / k_t$  est donné par la relation suivante :

$$\frac{f k_p^2}{k_t} = \frac{p^2 \cdot k_d}{4 [I_2]_0} \quad (35)$$

La constante de décomposition  $k_d$  de l'AIBN choisi comme amorceur dans le méthanol à 65°C ou dans le THF à 67°C n'a pas été mesurée mais cette constante est peu sensible à la nature du solvant. Par analogie avec les valeurs obtenues à 65 °C avec d'autres solvants<sup>142</sup> cette constante est évaluée à  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ .

Précisons enfin que pour s'assurer de la reproductibilité des résultats, nous avons réalisé pour un même monomère deux séries d'expériences avec des concentrations en amorceur différentes.

## ***IV) SYNTHÈSE ET ÉTUDES DES CINÉTIQUES DE TÉLOMERISATION DU THAM ET DE SES DÉRIVÉS***

Compte tenu des buts que nous nous sommes fixés, c'est-à-dire l'étude de l'impact des liaisons hydrogène intra ou intermoléculaires des dérivés du THAM sur leurs constantes cinétiques, deux aspects paraissent a priori intéressants :

- d'une part le rôle des fonctions hydroxyles dans les associations hypothétiques du THAM.
- d'autre part l'impact de la liaison amide et plus précisément du proton amide sur ces liaisons hydrogène.

Nous nous sommes intéressés en premier lieu à l'influence des fonctions hydroxyle du THAM sur la vitesse de polymérisation. L'étude de l'influence du proton amide n'est intervenue qu'ultérieurement.

### **A) Études de l'influence des fonctions hydroxyles sur les cinétiques de polymérisation du THAM**

Compte tenu de l'importance probable de ces fonctions hydroxyles sur les pouvoir d'agrégation du THAM et donc indirectement sur sa cinétique de polymérisation, deux démarches simples paraissent à priori envisageables :

- ces fonctions hydroxyles peuvent être protégées sous forme éther, ester, tetrahydropyranyle ou autres.
- elles peuvent également être éliminées c'est à dire que les groupes hydroxyméthyle peuvent être substitués par des groupes méthyle.

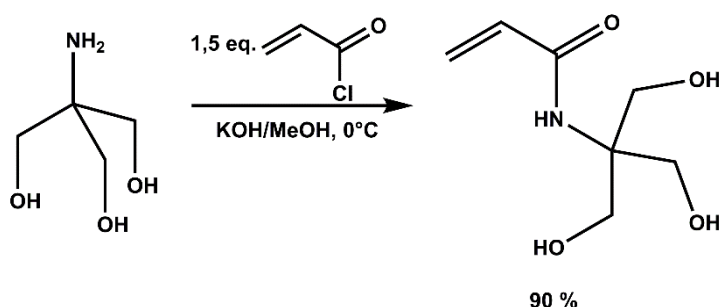
Dans un premier temps, cette deuxième voie a été privilégiée et nous avons effectué une première série d'expérience avec des monomères homologues du THAM comportant deux ou une seule fonction alcool.

La structure de chaque monomère homologue du THAM a été confirmée par analyse RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ .

## 1) Synthèse et études cinétiques du THAM et de ses analogues mono- ou dihydroxylés

### 1.1) Synthèse du THAM

Le THAM est obtenu avec un excellent rendement en faisant réagir à 0°C un excès de chlorure d'acryloyle sur le Tris dans le méthanol. Le pH de la solution est maintenu au cours de la réaction à une valeur comprise entre 7 et 9 par ajout d'une solution de potasse méthanolique. Après élimination des sels et recristallisation dans le méthanol, le THAM est obtenu pur sous forme cristalline avec un rendement supérieur à 93 % (cf. figure 1.5).



**Figure 1.5** : schéma de synthèse du THAM.

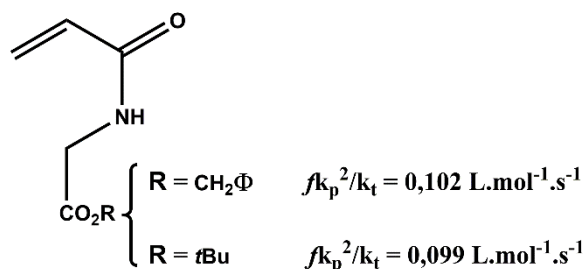
### 1.2) Cinétique de polymérisation du THAM

Nous voulions déterminer la valeur du rapport  $fk_p^2/k_t$  pour le THAM dans le méthanol et dans l'eau qui est un solvant généralement utilisé pour la polymérisation de l'acrylamide. Nous pouvions ainsi établir la différence de réactivité des deux monomères dans l'eau.

#### 1.2.1) Cinétique de télomérisation du THAM dans le méthanol

La valeur du rapport  $fk_p^2/k_t$  a déjà été déterminée<sup>135</sup>. Ce rapport a été évalué à  $fk_p^2/k_t = 11,0 \pm 0,1 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$  dans le méthanol à ébullition, valeur très nettement supérieure à celle attendue pour un groupe acrylamide. Il faut également noter qu'après substitution du groupe acrylamide par un groupement de type méthacrylamide la valeur de  $fk_p^2/k_t$  ( $0,01 \pm 0,005 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ) était pratiquement divisée par un facteur 100.

La vitesse de polymérisation du THAM est donc assez élevée si on la compare à celle d'autres dérivés de type acrylamide tels que certains *N*-acryloylglycinates dont la valeur du rapport  $fk_p^2/k_t$  a également été évaluée dans l'acétonitrile à 80 °C<sup>143</sup> (cf. figure 1.6).



**Figure 1.6** : structure et réactivité de deux esters de la *N*-acryloylglycine.

Nous pouvons également noter que la taille du groupement protecteur a eu peu d'influence sur la vitesse de polymérisation des *N*-acryloylglycines. Les valeurs ainsi obtenues étaient nettement plus conformes à celles habituellement rencontrées avec des dérivés de type acrylamide.

### 1.2.2) Cinétique de polymérisation du THAM dans l'eau

Le THAM a été polymérisé dans l'eau bi-distillée à 65 °C. Des essais préliminaires effectués avec deux amorceurs qui sont l'AIBN et l'ACVA (cf. Figure 1.7) se sont soldés par des échecs.

En effet, l'amorceur a été prélevé et injecté en solution aqueuse, or la quantité d'amorceur pouvant être solubilisée dans l'eau pure était trop faible pour pallier les problèmes d'inhibition radicalaire couramment observés dans l'eau. Ce solvant dissout en effet très bien l'oxygène et malgré un fort dégazage du milieu réactionnel sous atmosphère d'azote, il a été encore possible d'observer une période d'inhibition.

De plus nous ne possédions pas toutes les données qui nous auraient permis de calculer une valeur suffisamment précise de la constante de décomposition de l'ACVA à 65°C dans l'eau.

Dans ces conditions, nous avons choisi d'utiliser un autre amorceur qui était le dichlorhydrate de 2,2'-azobis(*N,N'*-diméthylèneisobutyramide) (cf. figure 1.7). Cet amorceur est un dérivé diazo comportant deux noyaux 4,5-dihydroimidazole protonés. Ce composé était parfaitement hydrosoluble, sa solubilité dans l'eau étant de l'ordre de 35 g.L<sup>-1</sup>. Par ailleurs, sa constante de vitesse de décomposition dans l'eau à 67 °C pouvait être aisément calculée.

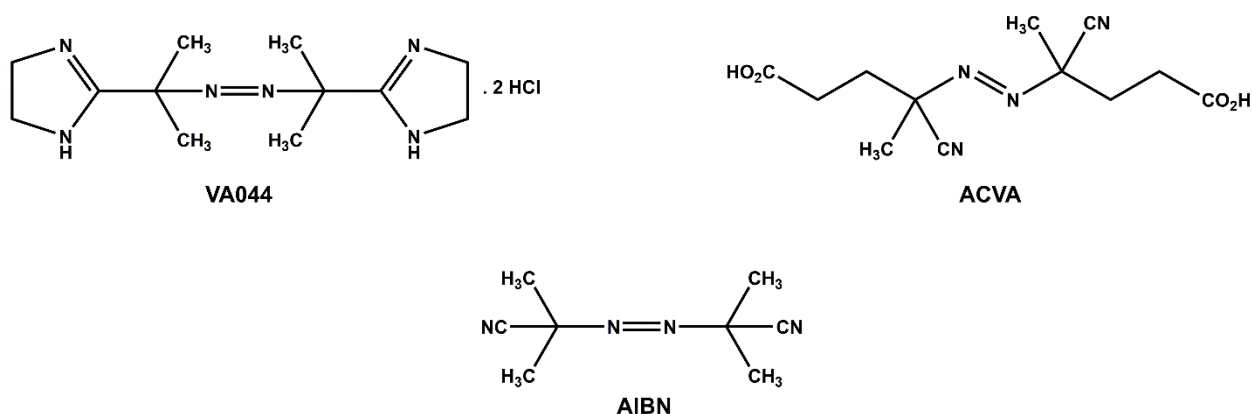
En effet, comme toute constante de vitesse,  $k_d$  pouvait être exprimée en fonction de l'énergie d'activation  $E_a$  et de la température absolue  $T$  suivant la relation :

$$k_d = A \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (36)$$

A est une constante et correspond au facteur de fréquence. Les valeurs de  $k_d$  à 40, 50 et 60 °C étaient connues et nous disposons aussi de la valeur de l'énergie d'activation  $E_a = 108,0 \text{ kJ.mol}^{-1}$ . Il était ainsi possible de déterminer la valeur de  $k_d$  à n'importe quelle température en utilisant la relation suivante :

$$\ln k_{d2} = \ln k_{d1} - \frac{E_a(T_2 - T_1)}{RT_1 T_2} \quad (37)$$

A 65 °C la constante de vitesse de décomposition est assez importante et devient  $k_d = 23,2 \times 10^5 \text{ .s}^{-1}$ , soit plus de neuf fois supérieure à celle de l'AIBN à la même température.



**Figure 1.7** : structure chimique des différents amorceurs radicalaires utilisés dans le cadre de nos expériences de cinétique. VA-044 ou 2,2'-azobis(*N,N'*-diméthylèneisobutyramidine) dihydrochloride, ACVA ou 4,4'-azobis(acide 4-cyanopentanoïque) ou 4,4'-azobis(acide 4-cyanovalérique), AIBN ou 2,2'-azo-bisisobutyronitrile.

Les temps d'inhibition dans l'eau ont pu être réduits de cinq à trois minutes en utilisant une quantité d'amorceur suffisante, cependant comme nous pourrions l'observer par la suite, la réaction de polymérisation du THAM dans l'eau est très rapide et, aux concentrations en amorceur employées, six à huit minutes de réaction ont été suffisantes pour parvenir à des taux de conversion de l'ordre de 90 %.

L'intervalle de temps séparant deux mesures ne devait donc pas dépasser 15 secondes de façon à suivre correctement l'avancement de la réaction. Il était bien évident que, dans de telles conditions, les résultats obtenus ne pouvaient représenter qu'une évaluation très approximative de la valeur réelle des constantes de vitesses.

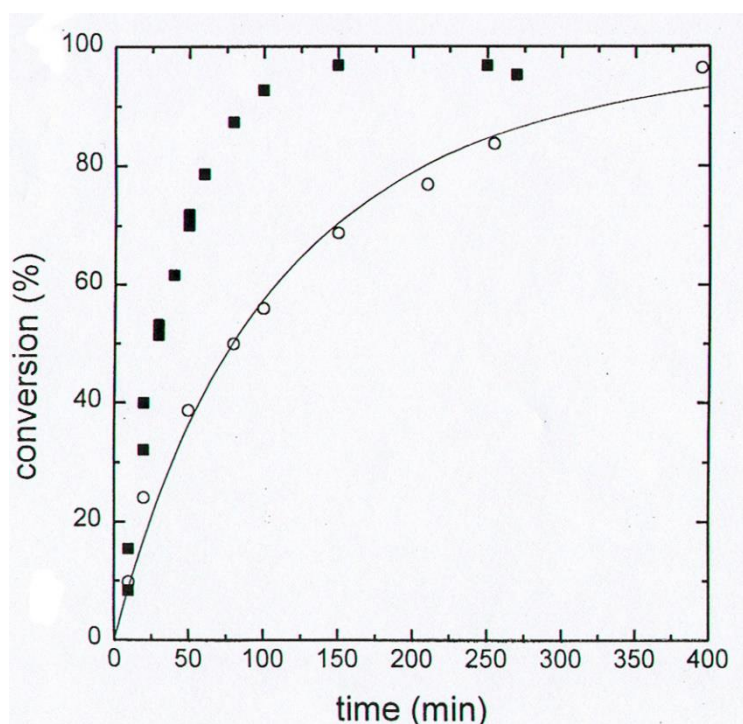
En effet, nous n'avons pu établir une valeur précise du rapport  $fk_p^2/k_t$ , les résultats ayant été peu reproductibles. Les valeurs obtenues regroupées dans le tableau 1.1, bien qu'approximatives, rendent cependant compte d'une réactivité « anormalement élevée » du THAM dans l'eau.

penste	R <sup>2</sup>	Nb. Points	[Amorceur] (mol.L <sup>-1</sup> )	$fk_p^2/k_t$ (L.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
38,063	0,9816	5	0,000436	192
51,814	0,975	6	0,000446	349

**Tableau 1.1** : résultat des cinétiques de polymérisation du THAM dans l'eau à 67 °C.

La valeur du rapport  $fk_p^2/k_t$  était donc très élevée dans l'eau. Plusieurs autres expériences qui n'apparaissent pas dans cet exposé ont été effectuées et les résultats obtenus ont donné des valeurs aléatoires généralement comprises entre 150 et 300 L.mol<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>.

Nous n'avons à notre disposition aucune information sur les grandeurs de vitesse de polymérisation des acrylamides dans l'eau à 65 °C. Nous savons que le rapport  $fk_p^2/k_t$  avait été estimé, pour l'acrylamide<sup>144</sup>, à 22,3 L.mol<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> dans l'eau à 25 °C et que sa vitesse de polymérisation à 50 °C dans ce même solvant était deux fois et demi inférieure à celle du THAM dans les mêmes conditions de température et de concentration<sup>145</sup> (cf. figure 1.8). Le THAM avait donc, quoiqu'il en soit, une réactivité supérieure à celle de l'acrylamide.



**Figure 1.8** : Degré de conversion du THAM(■) et de l'acrylamide (O) en fonction du temps dans l'eau à 50 °C (polymérisation initialisée par le persulfate de potassium) d'après Stälher *et al.*<sup>145</sup>.

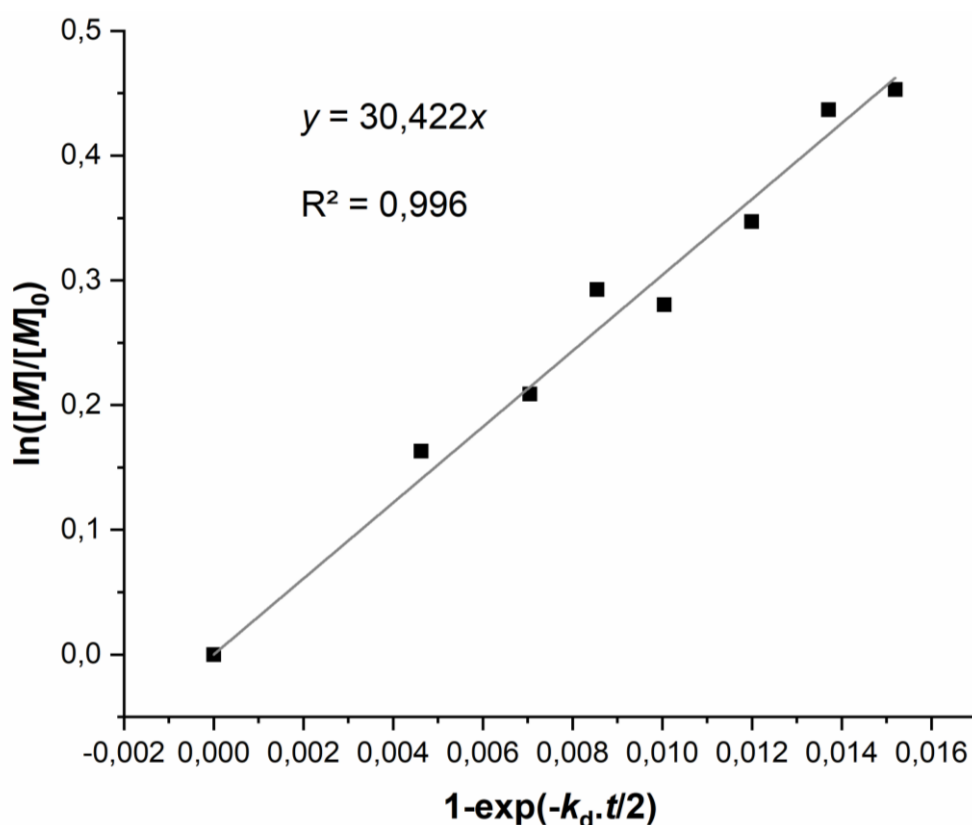
Afin de mesurer l'impact de la solvation sur ces cinétiques, nous nous sommes alors intéressés à l'évolution du rapport  $fk_p^2/k_t$  dans un mélange méthanol-eau, riche en méthanol. Nous avons choisi de travailler avec un mélange méthanol/eau 8/2.



Les résultats obtenus (cf. tableau 1.2 et figure 1.9) montraient nettement que le monomère s'avérait au minimum cinq fois plus réactif dans un mélange méthanol/eau 8/2 qu'il ne l'était dans le méthanol pur.

pente	R <sup>2</sup>	Nb. Points	[Amorceur] (mol.L <sup>-1</sup> )	$fk_p^2/k_t$ (L.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
30,422	0,996	8	0,000991	54,2
41,867	0,9733	9	0,00141	72,1

**Tableau 1.2** : résultats des cinétiques de polymérisation du THAM dans le mélange méthanol/eau 8/2 à 65°C.



**Figure 1.9** : courbe obtenue pour la cinétique de polymérisation du THAM effectuée dans le mélange méthanol/eau 8/2 à 65°C et à la concentration en amorceur  $[I_2]_0 = 0,000991$  M.

Si l'on admettait l'hypothèse selon laquelle dans un solvant la vitesse de polymérisation d'un monomère donné était étroitement corrélée à l'accessibilité du centre réactif, autrement dit à l'accessibilité de la double liaison sujette à l'action des radicaux, on pouvait concevoir qu'une forte solvation (du monomère et/ou du macroradical en croissance) limitait cette vitesse alors qu'inversement un phénomène d'agrégation du monomère l'augmentait.

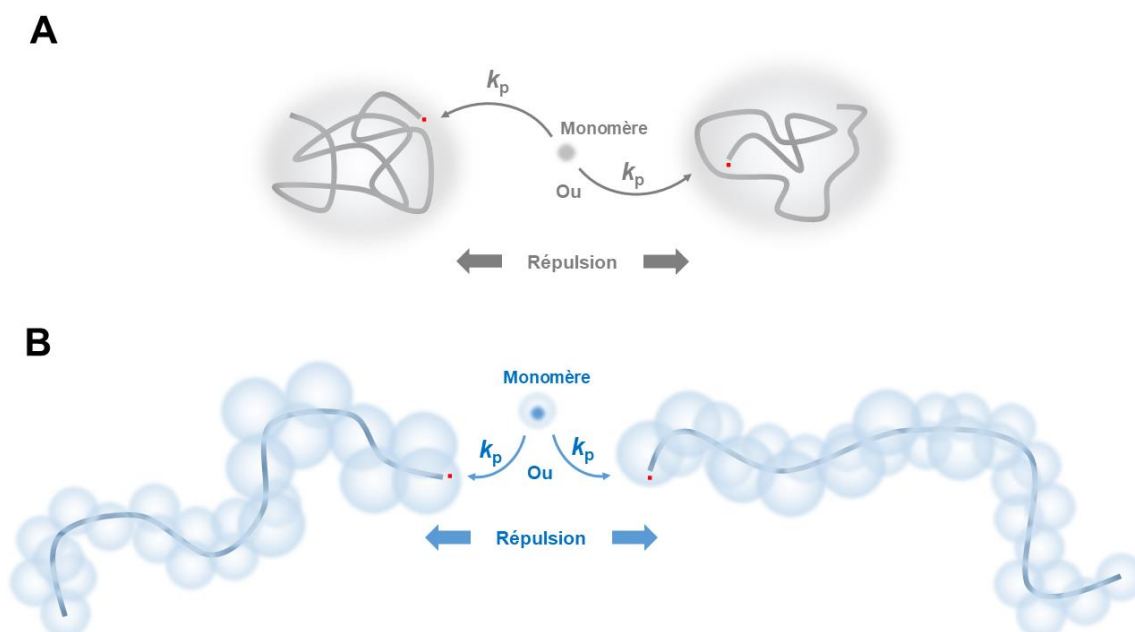
Avec le THAM, il semblait donc que les vitesses de diffusion des réactifs ou bien les agrégations, si elles existaient, étaient plus importantes dans l'eau que dans le méthanol. L'écart

des vitesses de diffusion des réactifs dans différents solvants serait vérifié de la même manière avec tous les monomères de type acryloyle et non seulement pour le THAM. Ce facteur ne pouvait donc être pris en compte pour interpréter pleinement le comportement de ce monomère.

Des effets de solvant comparables ont déjà été observés avec l'acide acrylique<sup>146-148</sup> ou le méthacrylate de méthyle<sup>149</sup> et ont été interprétés de différentes façons.

Nandi *et al.*<sup>149</sup> ont proposé un modèle faisant intervenir la solvation du macroradical en croissance. Ils ont montré que l'enrichissement en eau du milieu réactionnel (*tert*-butanol) induisait une forte augmentation de la réactivité du monomère qu'ils imputaient à un repliement particulier des chaînes macromoléculaires hydrophobes en formation, ce repliement rendant les centres réactifs moins accessibles et contribuant à réduire significativement la vitesse de terminaison (cf. figure 1.10.A).

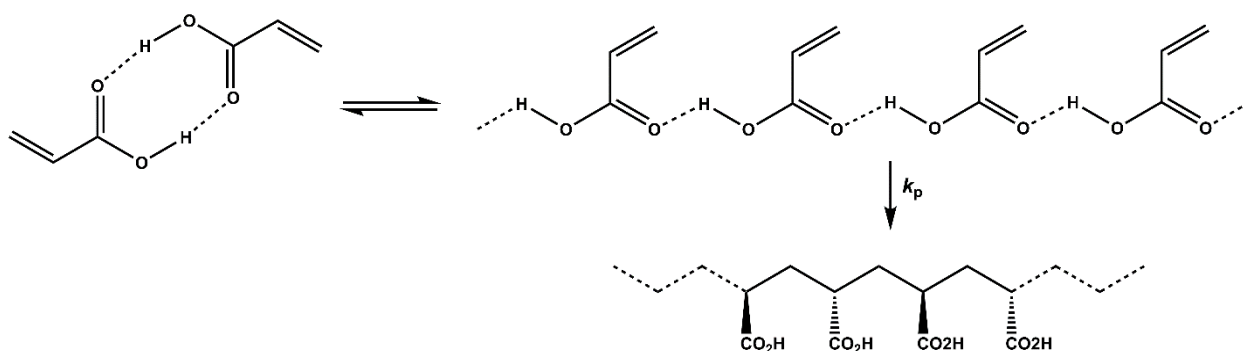
Loubat *et al.*<sup>148</sup> ont interprété ces résultats en faisant aussi intervenir l'encombrement stérique mais en considérant que les processus de terminaison étaient plutôt compromis par les molécules d'eau qui formaient de volumineuses cages de solvation autour des centres réactifs (cf. figure 1.10.B).



**Figure 1.10 :** illustration des mécanismes impliquant l'encombrement stérique comme principal facteur influençant le rapport  $fk_p^2/k_t$ . **A/Mécanisme** proposé par Nandi *et al.*<sup>149</sup>. La présence d'eau contribue à diminuer la qualité du solvant pour les chaînes macromoléculaires qui ont tendance à se replier. Les volumes d'exclusions (sphère grise) générés rendent les centres réactifs accessibles seulement aux petites molécules peu encombrées telles que les monomères. **B/Mécanisme** proposé par Loubat *et al.*<sup>148</sup>. La gêne stérique est ici occasionnée par une forte hydratation des chaînes macromoléculaires dotées alors de volumineuses cages de solvation (sphères bleues) limitant l'approche des macroradicaux tout en permettant au processus de propagation de se poursuivre.

Gal'Perina *et al.*<sup>147</sup> ont relié la décroissance de la réactivité de l'acide acrylique observées lorsque les réactions de polymérisation étaient effectuées dans l'eau, le formamide et le diméthylsulfoxyde (DMSO), à des effets donneurs du solvant complexant le centre radical et réduisant ainsi sa réactivité en le stabilisant. Le DMSO étant donc le plus stabilisant des trois solvants.

Enfin, Chapiro<sup>146</sup> a relié les différences de réactivité de l'acide acrylique aux différences de tacticité du polymère observées dans l'eau et les solvants organiques. Il a mesuré les viscosités de diverses solutions aqueuses ou organiques de même concentration en ce monomère, et a montré que les réactivités les plus élevées étaient obtenues pour les solutions les plus visqueuses. Il en a déduit que l'augmentation de réactivité observée résultait de la formation, *via* l'établissement de liaisons hydrogène, d'agglomérats de monomères qui, contre toute attente, ne se formaient pas dans les solvants apolaires. La formation de ces agrégats linéaires caractérisés par un temps de vie assez court, obéissait à un équilibre dynamique (cf. figure 1.11).



**Figure 1.11 :** illustration schématique du mécanisme d'agrégation de l'acide acrylique pur ou dilué dans les solvants polaires, à l'origine des réactivités élevées du monomère et de la syndiotacticité des homopolymères formés dans ces mêmes conditions<sup>146</sup>.

Ainsi, nous pouvons constater que les effets de solvants observés sur les cinétiques de polymérisation du THAM pouvaient s'interpréter au moins de trois façons différentes parfaitement cohérentes et recevables et qui n'étaient pas complètement contradictoires les unes avec les autres.

Il était en effet facile de concevoir que les macroradicaux du THAM puissent être particulièrement solvatés et que les processus de terminaison soient de ce fait compromis par l'encombrement stérique des centres réactifs.

Il était tout autant possible que le méthanol (plus basique et nucléophile que l'eau) puisse représenter un milieu plus stabilisant pour les radicaux que ne l'est l'eau.

Enfin, bien qu'étant un monomère comportant quatre sites protiques (trois hydroxyles et une fonction amide secondaire) apparemment désignés à interagir fortement avec les solvants protiques, le THAM pouvait former des agrégats dans l'eau.

Nous pouvions dès lors envisager que le THAM était moins solvatoé dans l'eau que dans le méthanol et de ce fait concevoir que les phénomènes d'agrégation et donc de proximité des monomères fussent plus importants dans l'eau.

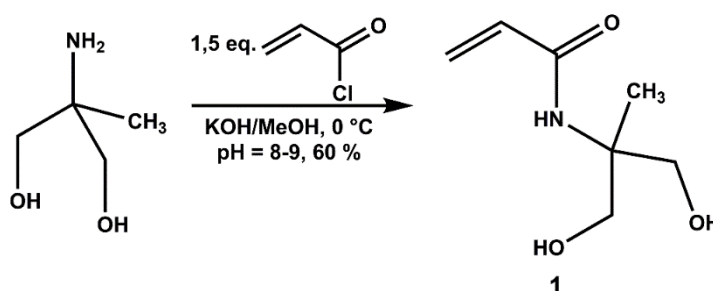
Nous avons fait apparaître ici un problème important qui est celui de l'effet de solvant. Nous n'en avons pas tenu compte dans le cadre des expériences suivantes où nous avons utilisé dans tous les cas le même solvant (le méthanol) en nous intéressant spécifiquement à l'influence des fonctions hydroxyle sur la vitesse de polymérisation du THAM.

Nous avons ainsi choisi d'étudier les cinétiques de polymérisation de deux homologues du THAM pour lesquels une ou deux fonctions alcool avaient été remplacées par des hydrogènes.

### 1.3) Synthèse et étude cinétique du bis(hydroxyméthyl)méthylacrylamidométhane (BHAM) **1**

#### 1.3.1) Synthèse du BHAM **1**

La méthode de synthèse du BHAM consiste à traiter le 2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol par le chlorure d'acryloyle dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour la synthèse du THAM (cf. figure 1.12).



**Figure 1.12** : schéma de synthèse du composé **1**.

Le composé **1** a été obtenu pur cristallisé avec un rendement de 60 %.

### 1.3.2) Études cinétiques du BHAM 1

Nous avons effectué des cinétiques de polymérisation dans le méthanol en présence d'AIBN. L'utilisation d'un agent télogène ne s'est pas révélée nécessaire dans ce cas, la macromolécule formée étant parfaitement soluble dans le solvant utilisé.

Deux séries de mesures ont été effectuées, l'une avec une concentration en AIBN de  $10^{-3}$  M et l'autre avec une concentration en amorceur de  $5 \cdot 10^{-4}$  M (cf. tableau 1.3).

pente	R <sup>2</sup>	Nb. Points	(Amorceur) mol.L <sup>-1</sup>	$f k_p^2/k_t$ (l.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> .)
17,827	0,9908	9	0,0005	3,97
27,769	0,9733	10	0,001	4,82

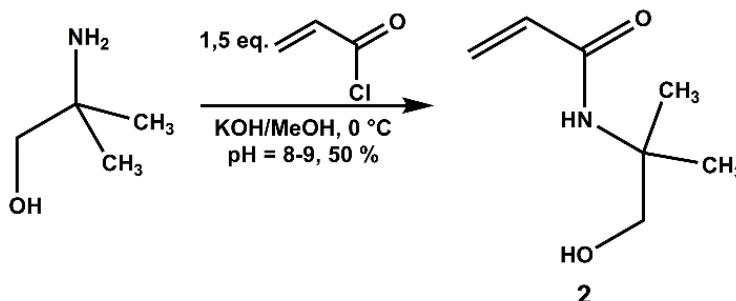
**Tableau 1.3** : résultats des cinétiques de polymérisation du BHAM 1 dans le méthanol à 65°C

La valeur du rapport  $f k_p^2/k_t$  a été estimée à  $4,4 \pm 0,4$  L.mol<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>. L'élimination d'une fonction hydroxyle semblait donc affecter significativement la réactivité du groupe acryloyle. Il est apparu dès lors nécessaire de vérifier comment évoluait la réactivité pour un monomère ne comportant qu'une seule fonction hydroxyle.

### 1.4) Synthèse et études cinétiques du 2-méthyl-2-acrylamido-1-propanol (MAP) 2

#### 1.4.1) Synthèse du MAP 2

Le MAP a été obtenu avec un rendement de 50 % en faisant réagir le chlorure d'acryloyle sur le 2-méthyl-2-amino-1-propanol, dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites pour la synthèse du THAM et du BHAM (1) (cf. figure 1.13).



**Figure 1.13** : schéma de synthèse du composé 2.

### 1.4.2) Études cinétiques du MAP 2

Du fait de la très bonne solubilité de l'homopolymère du MAP dans le méthanol, l'étude cinétique a été menée, dans ce cas aussi, en absence de télogène. Deux séries de mesures ont été réalisées à des concentrations en AIBN de  $10^{-3}$  M et de  $5.10^{-4}$  M.

Précisons que l'intégration du signal des groupements hydroxyméthyle (-CH<sub>2</sub>O-) qui a été prise comme intégration de référence (cf. annexe I) lors des expériences de cinétique du THAM et du BHAM, n'a pu être exploitée car les signaux des groupements hydroxyméthyle du polymère n'apparaissent pas sur le spectre RMN <sup>1</sup>H. Nous observons en effet, au cours de l'expérience, un rapport constant et égal à 2/3 entre l'intégration du signal des hydroxyméthyles et celle des pics des protons acryliques.

Nous avons pu cependant estimer le rapport  $fk_p^2/k_t$  à  $2,3 \pm 0,2$  L.mol<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> en prenant l'intégration du signal des deux méthyles repéré à 1,2 ppm (si RMN <sup>1</sup>H effectuée dans le DMSO deutéré) comme nouvelle référence (cf. tableau 1.4).

peste	R <sup>2</sup>	Nb. Points	[Amorceur] mol.L <sup>-1</sup>	$fk_p^2/k_t$ (L.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
14.235	0.9908	8	0.0005	2.53
18.733	0.9733	10	0.001	2.19

**Tableau 1.4** : résultats des cinétiques de polymérisation du MAP effectuées dans le méthanol.

Nous vérifions donc que la vitesse de réaction diminuait en réduisant le nombre de fonctions alcool présentes sur le monomère. Ces fonctions hydroxyle avaient donc une influence marquée sur la vitesse de réaction et il était très certainement probable qu'elles interviennent dans des mécanismes d'agrégation.

L'intervention d'un processus de solvation particulier du macroradical en croissance (tel qu'évoqué en fin de paragraphe 1.2) contribuant à favoriser la propagation, restait plausible car la diminution du nombre de fonction hydroxyle s'accompagnait inévitablement de la diminution du nombre de liaison hydrogène pouvant s'établir entre le solvant (méthanol) et les solutés (macroradicaux, polymère et monomère).

Cependant, le méthanol pouvant établir plus facilement que l'eau, d'autres types d'interactions que les seules liaisons hydrogènes avec les solutés, il ne semblait pas envisageable de considérer que la solvation globale du soluté fût uniquement fonction du nombre de fonctions hydroxyle présentes sur le monomère.

Ceci était en parfaite adéquation avec les observations rapportées par Saito *et al.*<sup>150</sup> à l'échelle des poly(acrylamides) hydroxylés (poly(tris) inclu) pour lesquels la multiplication des fonctions hydroxyles sur la chaîne macromoléculaire contribuait à diminuer l'hydrophilie en favorisant l'établissement de liaisons hydrogène intramoléculaires plutôt que les interactions avec l'eau.

Par conséquence, l'agrégation du monomère semblait être la seule explication recevable que nous puissions fournir à ce phénomène.

Il était difficile de concevoir une structure pour ces systèmes associatifs qui pouvait s'apparenter à celle proposée par Chapiro<sup>146</sup> (cf. section 1.2, figure 1.11) ou s'organiser de façon différente et inconnue.

Pour pouvoir la caractériser nous aurions certainement dû effectuer et/ou développer différents types d'expériences impliquant un équipement et des compétences spécifiques dont nous ne disposions pas au laboratoire.

Nous avons ainsi préféré orienter la suite de nos travaux dans la continuité des études de cinétique de polymérisation des dérivés du THAM visant à connaître l'évolution des vitesses de réaction après introduction de groupements protecteurs masquant les fonctions hydroxyle.

## **2) Synthèses et études cinétiques de monomères dérivés du THAM**

Les résultats précédemment obtenus démontrent très clairement l'importance de l'influence des fonctions hydroxyle sur la réactivité globale du THAM. Il paraît dès lors intéressant de préciser l'impact que peut avoir la suppression du proton des hydroxyles, susceptibles de participer aux liaisons hydrogène, autrement dit de mesurer l'impact d'une transformation de ces groupements alcool en d'autres fonctions telles que des groupements éther, ester, acétal...etc... Dans cette optique, plusieurs dérivés du THAM présentant une, deux ou trois fonctions alcool protégées ont été synthétisés.

Les groupements protecteurs utilisés (acétylène, isopropylidène, tétrahydropyranyle...) n'ont pas été choisis arbitrairement car les monomères protégés correspondent à des monomères couramment utilisés au laboratoire pour la synthèse de cotéromères. L'étude des cinétiques de polymérisation de ces dérivés devait aussi apporter des informations supplémentaires quant à la plausible intervention d'autres paramètres dans les processus de propagation.

Par exemple, en raison d'un certain mimétisme de structure du tétrahydropyranyle avec les motifs pyranose, l'étude des cinétiques de polymérisation des dérivés tétrahydropyranylés devrait

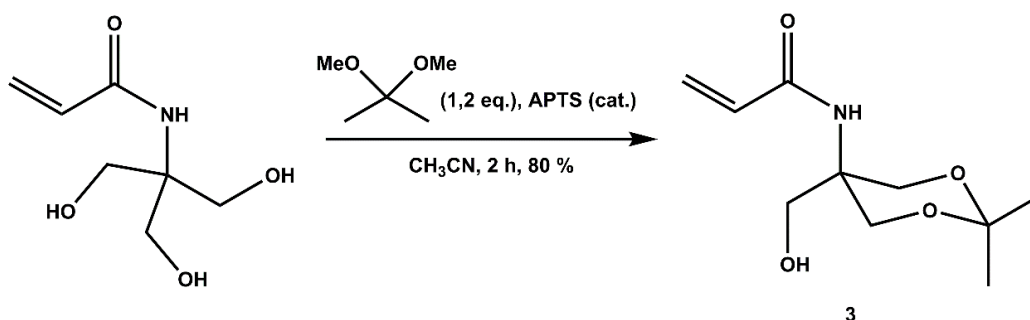
permettre de mettre en évidence, s'il y a lieu, l'influence de l'encombrement stérique des motifs glycosidiques sur la réaction de polymérisation des dérivés glycosylés du THAM.

## 2.1) Synthèse des monomères

### 2.1.1) Synthèse des dérivés protégés par cétylisation

#### 2.1.1.1) Synthèse du THAM isopropylidène **3**

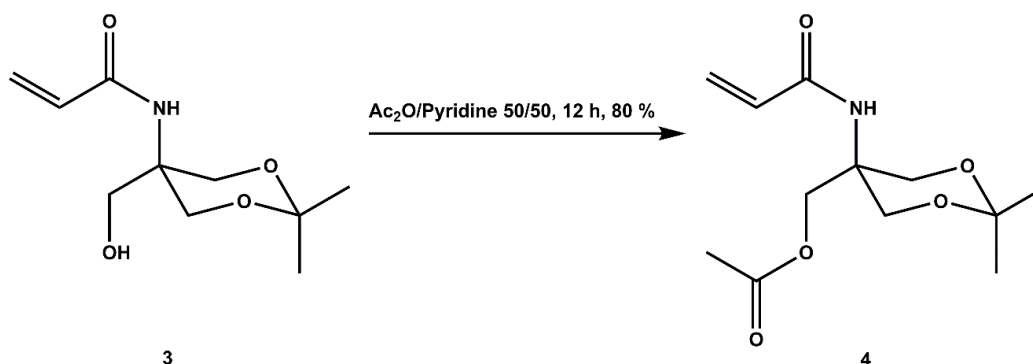
Le THAM isopropylidène a été obtenu en faisant réagir un léger excès (1,2 eq.) de 2,2-diméthoxypropane sur une suspension de THAM dans l'acétonitrile en présence d'une quantité catalytique d'acide *p*-toluène sulfonique (APTS). Le dérivé **3** attendu a été isolé pur cristallisé avec un rendement de 80 %.



**Figure 1.14** : schéma de synthèse du THAM isopropylidène **3**.

#### 2.1.1.2) Synthèse du THAM isopropylidène acétylé **4**

L'acétylation du THAM isopropylidène **3** a été effectuée dans un mélange 50/50 anhydride acétique/pyridine et a conduit au THAM isopropylidène acétylé **4** avec un rendement de 80%.



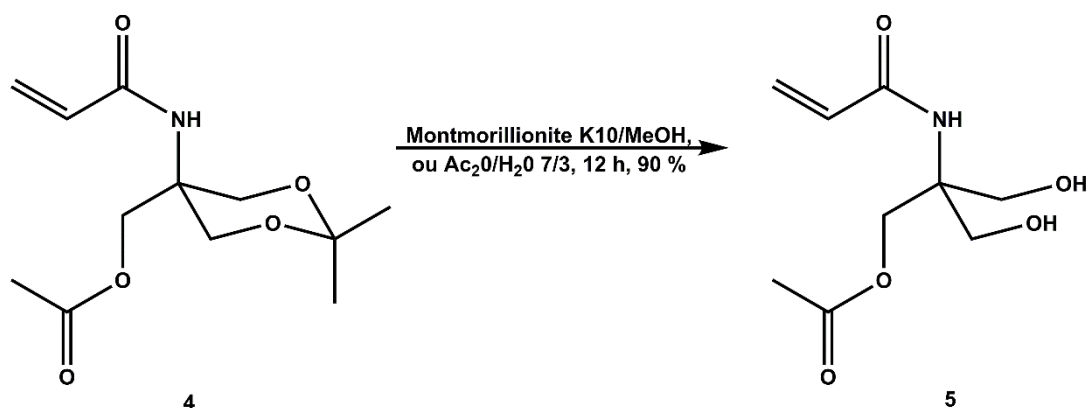
**Figure 1.15** : schéma de synthèse du THAM isopropylidène acétylé **4**.



## 2.1.2 Synthèse des composés protégés par acétylation

### 2.1.2.1) Synthèse du dérivé monoacétylé 5

Le dérivé monoacétylé 5 est obtenu après hydrolyse acide de la fonction cétal du composé 4. Cette hydrolyse peut s'effectuer dans un mélange acide acétique/eau 7/3 ou dans le méthanol en présence de montmorillonite K10.



**Figure 1.16** : schéma de synthèse du THAM monoacétylé 5.

La montmorillonite K10<sup>151-153</sup> est un catalyseur d'origine minérale (silicate hydraté d'aluminium et magnésium). C'est une argile acide dopée aux ions ferriques ( $\text{FeCl}_3$ ) pouvant se comporter comme un cation radical, un acide de Bronsted ou un acide de Lewis. Elle a été très utilisée en tant que catalyseur des réactions de type Diels-Alder ou des réactions de réarrangement sigmatropique.

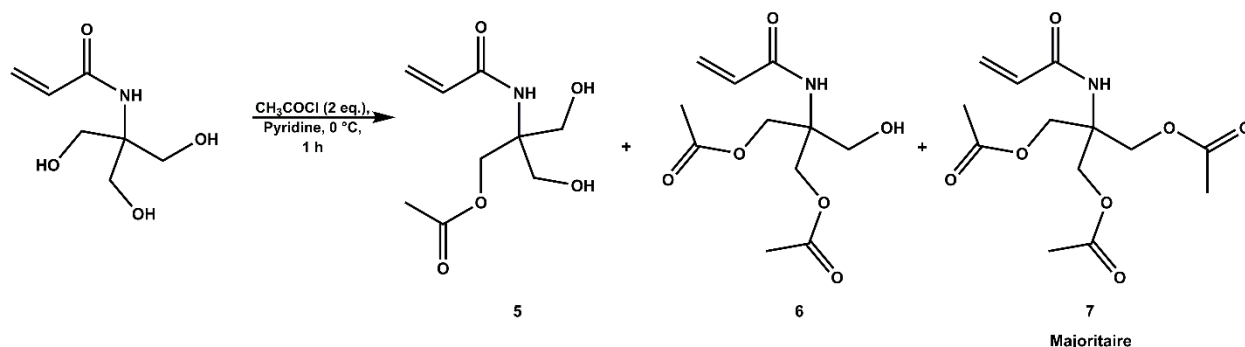
En utilisant un tel catalyseur, nous voulions éviter de travailler en milieu aqueux afin de réduire les temps et la température d'évaporation du solvant. Nous limitons ainsi les risques de polymérisation (se produisant assez fréquemment) du monomère dans le brut.

Quel qu'ait pu être le réactif utilisé, nous obtenions généralement le composé attendu 5 avec 90 % de rendement après purification sur colonne de silice suivie d'une recristallisation.

### 2.1.2.2) Synthèse du dérivé diacétylé 6

Ce dérivé n'a pu être obtenu quantitativement en dépit des différentes méthodes de synthèse utilisées.

La méthode de préparation directe consistant à traiter le THAM dissous dans la pyridine par deux équivalents de chlorure d'acétyl, conduit au composé attendu avec seulement 5 % de rendement. En effet la réaction étant peu sélective, nous avons obtenu en grande partie le dérivé triacétylé (cf. figure 1.17).



**Figure 1.17** : schéma de synthèse du THAM diacétylé **6**. Ce première essai a consisté en une tentative de diacétylation directe du THAM ayant conduit à la formation d'un mélange contenant les trois dérivés acétylés, le composé **7** étant celui très majoritairement obtenu.

Ce problème est tout à fait général lorsque l'on travaille avec les dérivés du Tris. Il est en effet très difficile de modifier quantitativement et sélectivement, une ou deux des trois fonctions hydroxyle sans passer préalablement par une étape de protection des fonctions ne devant pas réagir, et ceci quel que soit le réactif utilisé.

Ceci est certainement essentiellement dû à la solubilité partielle du THAM dans la plupart des solvants organique à froid. Le produit issu de la première modification des fonctions alcool passe en solution et réagit plus facilement que le monomère de départ (restant en grande partie en suspension) avec l'excès de réactif.

On pouvait dès lors admettre que le dérivé monoacétylé formé intermédiairement au cours de la réaction était plus réactif que le THAM lui-même et réagissait pour former le dérivé diacétylé qui, lui-même plus réactif que le THAM, réagissait à son tour avec le chlorure d'acyle pour donner le THAM triacétylé **7**.

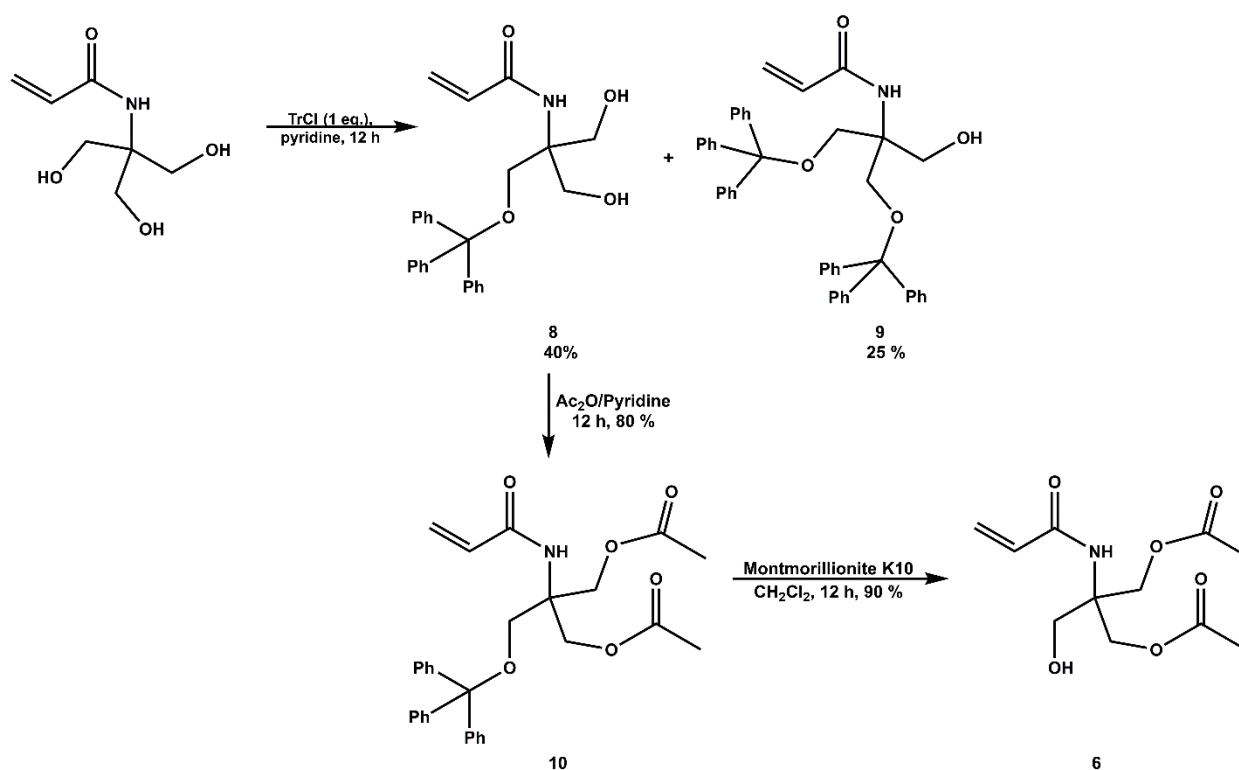
Si l'on admettait l'hypothèse précédente, le dérivé diacétylé pouvait être obtenu avec un rendement convenable en introduisant au préalable, sur une seule des fonctions hydroxyle du THAM, un groupement protecteur encombrant.

Ce groupement encombrant devait d'une part permettre de disposer d'un précurseur parfaitement organosoluble et d'autre part, la gêne stérique induite par celui-ci devait inhiber la fixation d'un deuxième groupe et donc favoriser la formation du composé mono *O*-substitué.

L'acétylation suivi de la déprotection du monomère obtenu devait conduire au composé diacétylé **6** avec un rendement acceptable.

Dans cette optique, nous avons choisi d'utiliser des groupements de type trityle. Ces groupements sont très encombrés et peuvent être facilement éliminés par hydrolyse acide à température ambiante, conditions dans lesquelles les groupes acétyle sont stables. Nous pouvons ainsi disposer d'un système de protections parfaitement orthogonales.

La trytilation a été réalisée en faisant réagir le THAM solubilisé dans la pyridine avec un équivalent de chlorure de trityle. Le dérivé monotritylé **8** a été obtenu avec un rendement de 40 %. Il était bien le produit majoritaire de la réaction mais il était accompagné d'une petite quantité du dérivé ditritylé que nous avons pu isoler et caractériser (cf. figure 1.18). Nous verrons d'ailleurs plus loin dans ce chapitre, qu'il a été possible d'obtenir le THAM tritrylé.



**Figure 1.18** : schéma de synthèse du THAM diacétylé **6**. Ce deuxième essai a consisté en une synthèse effectuée en trois étapes. La première correspondait à une monotritylation du THAM puis le dérivé monotritylé **8** a été acétylé pour conduire au dérivé monotritylé diacétylé **10** qui après déprotection a conduit au THAM diacétylé **6** attendu avec un rendement global de 29 %.

L'hypothèse établie précédemment était donc vérifiée, nous avons effectivement partiellement inhibé la formation du diadduit en introduisant une forte gêne stérique au niveau des fonctions hydroxyle.

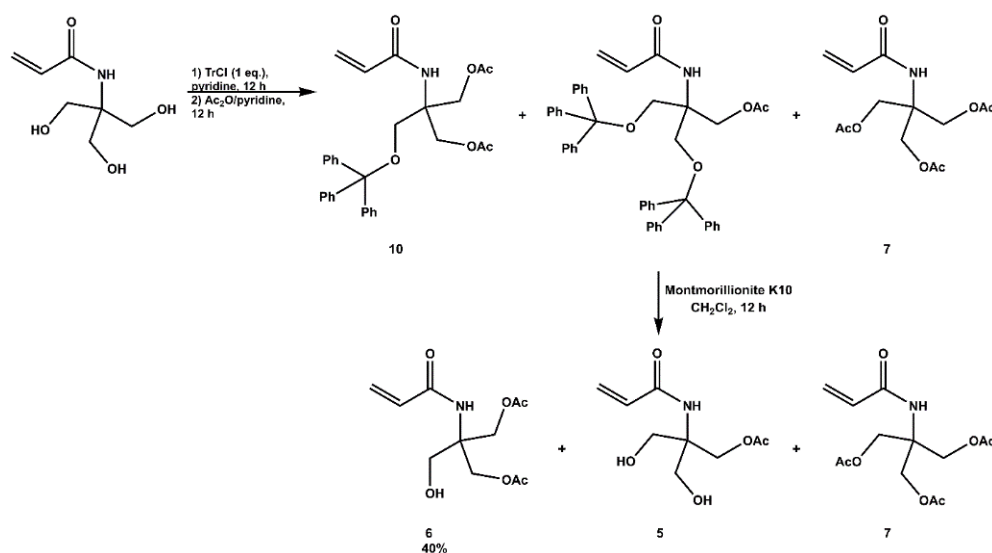
L'acétylation du composé **8** a alors été réalisée avec un rendement de 80% dans le mélange anhydride acétique/pyridine (cf. figure 1.18).

Bien que nous connaissions plusieurs méthodes de déprotection du groupe trityle<sup>154</sup> (dont la plus classique est l'utilisation du mélange acide acétique/eau), nous avons préféré utiliser la montmorillonite K10. Nous avons pu vérifier que cette résine avait la propriété d'hydrolyser les éthers de trityle. L'inconvénient de cette méthode était que la réaction de clivage ne devenait totale qu'en présence d'un large excès de résine (3 g par millimole de produit à déprotéger).

La réaction a été effectuée dans le dichlorométhane à température ambiante et a conduit au composé **6** après 12 h d'agitation avec 90 % de rendement (cf. figure 1.18).

Nous avons donc obtenu un rendement global de 29 % qui pouvait paraître assez faible mais qui nous a permis de disposer assez rapidement du composé **6** en quantité non négligeable. Précisons que la purification du composé **8** n'est absolument pas nécessaire et n'a été effectuée qu'une seule fois afin d'isoler et de caractériser les composés **8** et **9**.

En effet la tritylation et l'acétylation se faisant dans le même solvant, il a été possible d'éviter la première étape d'isolement du dérivé monotritylé et d'acétyler directement le brut réactionnel en ajoutant de l'anhydride acétique au milieu de réaction.



**Figure 1.19** : schéma de synthèse du THAM diacétylé **6**. Ce troisième essai a consisté en une synthèse effectuée en deux étapes. La monotritylation puis l'acétylation du THAM ont été réalisées successivement dans le même mélange réactionnel pour conduire à un mélange de trois composés. Après purification sommaire, ce mélange a été soumis à l'action de la montmorillonite K10 pour obtenir le THAM diacétylé **6** attendu avec un rendement global de 40 % après purification par chromatographie sur gel de silice.

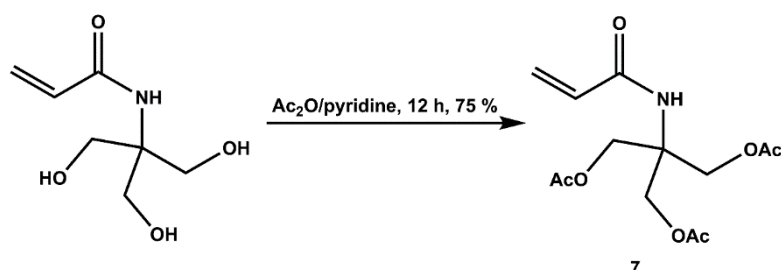
Les trois produits acétylés ainsi formés ont été précipités puis traités, sans purification intermédiaire, par la montmorillonite K10 pour conduire enfin à un mélange des trois dérivés acétylés du THAM. Ces différents composés ont été séparés sur colonne de silice et le composé **6** a été obtenu, dans ces conditions, avec un rendement global de 40 % (cf. figure 1.19).

Il faut préciser ici que le THAM diacétylé étant un produit très hygroscopique, il nous a été impossible de le cristalliser. Nous sommes parvenus à le faire précipiter mais le précipité formé, une fois filtré, s'est révélé instable à l'atmosphère et s'est liquéfié très rapidement au contact de l'humidité de l'air.

De ce fait, nous avons envisagé d'utiliser ce composé potentiellement contaminé par les impuretés résiduelles que nous n'aurions éventuellement pu éliminer par simple chromatographie. Il était opportun d'en tenir compte lors des études cinétiques de polymérisation.

### 2.1.2.3) Synthèse du dérivé triacétylé **7**

Le THAM triacétylé est aisément obtenu en solubilisant le THAM dans un mélange anhydride acétique/pyridine 50/50. Après douze heures d'agitation à température ambiante, le composé **7** est obtenu avec un rendement de 75 % (cf. figure 1.20).



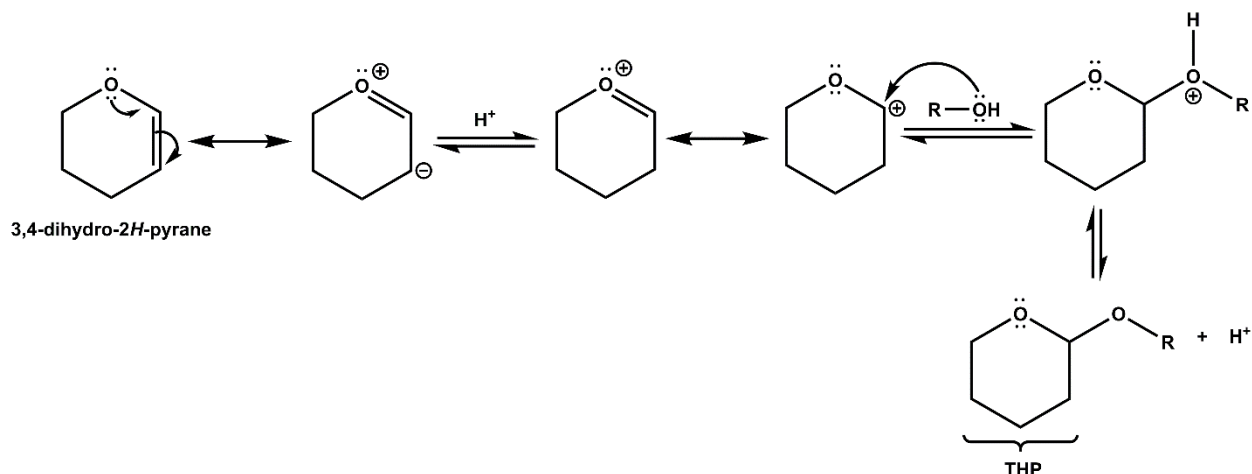
**Figure 1.20** : schéma de synthèse du THAM triacétylé **7**.

### 2.1.3 Synthèse des dérivés protégés par acétalisation

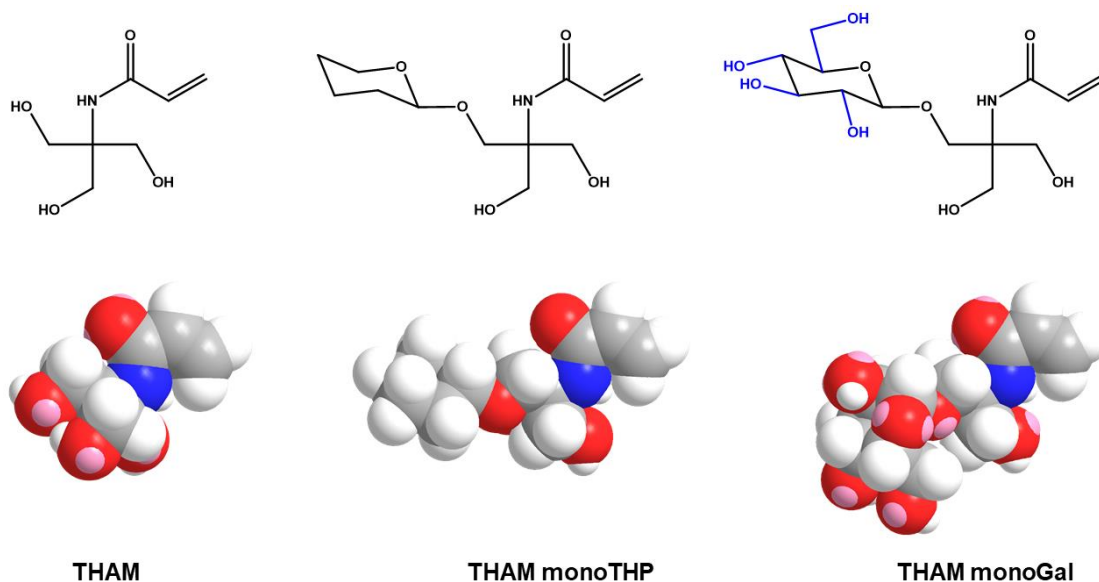
Nous avons ici pour objectif de fixer des motifs tétrahydropyranyle (THP) sur les fonctions alcool du THAM.

Ces groupements sont généralement introduits en faisant réagir le 3,4-dihydro-2H-pyrane (DHP) sur un alcool en milieu légèrement acide, le catalyseur employé étant le plus souvent l'acide *p*-toluènesulfonique.

La première étape de la réaction correspond à la protonation du carbone en position 3. L'éther d'énol cyclique utilisé présente en effet deux formes mésomères et le déplacement électronique implique une forte densité électronique sur le carbone 3 où s'effectuera le plus facilement la protonation. Il se forme alors un intermédiaire réactionnel très réactif qui présente lui-même deux formes mésomères : une forme carbocation et une forme oxonium. Cet intermédiaire va rapidement réagir avec un nucléophile, en l'occurrence l'alcool ajouté au milieu réactionnel, pour former un acétal cyclique et régénérer le catalyseur (cf. figure 1.21).



**Figure 1.21** : schéma du mécanisme réactionnel de formation des éthers de tétrahydropyranyle (THP).



**Figure 1.22** : comparaison des structures bidimensionnelles et tridimensionnelles du THAM et de ses dérivés monotétrahydropyranyle éther (THAM monoTHP) et monogalactosylé (THAM monoGal). Le THAM monoTHP et le THAM monoGal ne se différencient que par la présence des hydroxyles (en bleu). Les modèles 3-D ont été obtenus par modélisation moléculaire (champs de force MM2, logiciel Chem3D) à l'état gaz. Les structures obtenues au premier puit de potentiel illustrent l'encombrement croissant (de la gauche vers la droite) des monomères sans pour autant impliquer l'intervention de gêne stérique au niveau de la liaison vinylique.

Ce type de protection est très utilisé en chimie de synthèse<sup>155,156</sup> notamment lorsque les conditions de préparation (formation et condensation de carbanion) nécessitent des groupements protecteurs pouvant résister à des conditions de basicité extrême (en milieu anhydre).

L'intérêt que nous avons porté à ce type de protection a été tout autre et résidait dans le fait qu'en substituant les fonctions alcool du Tris par de tels groupements nous pouvions disposer d'information sur l'influence que pouvait avoir l'encombrement stérique sur la vitesse de polymérisation. Nous devions ainsi avoir une idée approximative de l'évolution de la vitesse de réaction lorsque nous utilisons par exemple un dérivé mono-, di ou triglycosylé ; le squelette cyclique du galactose par exemple étant identique à celui du tétrahydropyranyle (cf. figure 1.22).

#### 2.1.3.1) Synthèse du dérivé monotétrahydropyranyle (THAM monoTHP) **11**

La synthèse de ce dérivé aurait théoriquement nécessité une étape de protection de deux fonctions alcool du THAM pour ne faire réagir par la suite qu'une seule fonction hydroxyle avec le DHP et nous ne disposions pas au laboratoire de dérivés du THAM permettant d'obtenir sélectivement le composé **11**.

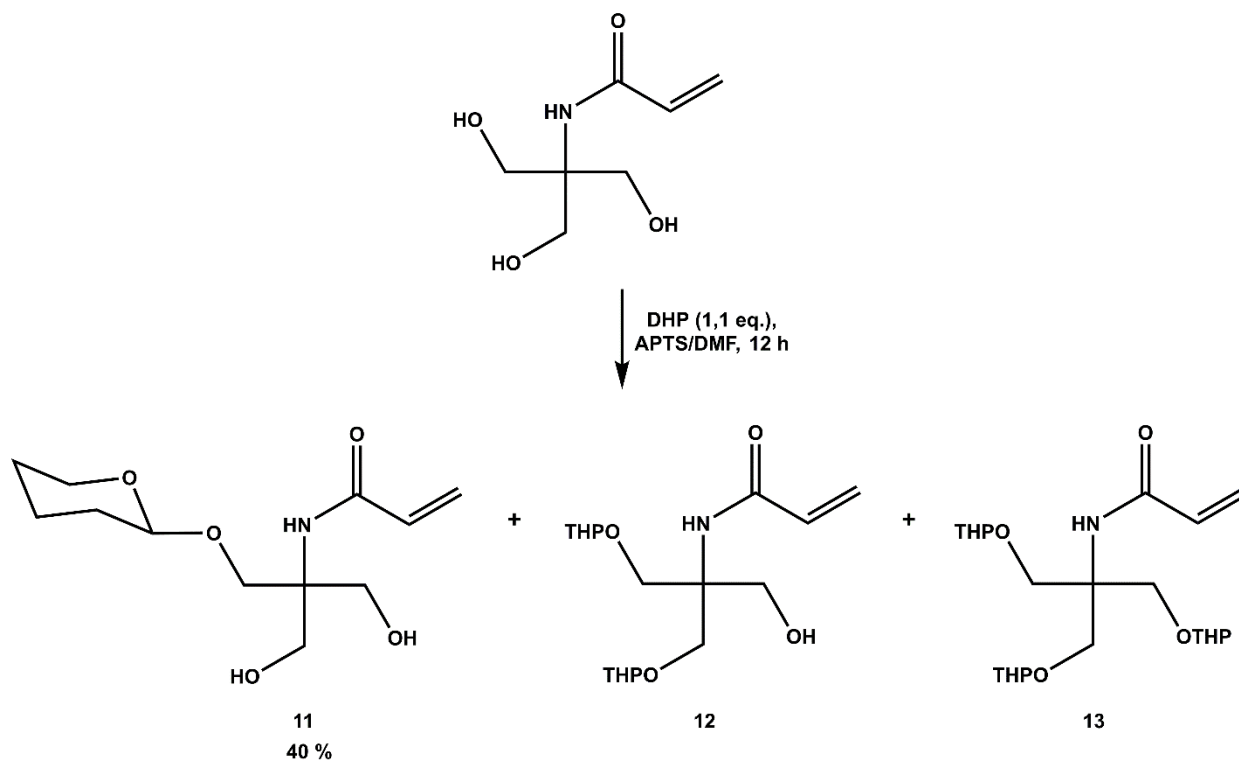
En effet, précisons que le THAM isopropylidène est un dérivé comportant deux fonctions hydroxyle protégées et que sa réaction avec le DHP en présence de catalyseur acide devait très certainement conduire à l'intermédiaire attendu (THAM isopropylidène-*O*-THP). Il n'était cependant pas envisageable de l'utiliser comme précurseur car l'hydrolyse acide de la fonction isopropylidène visant à conduire à la formation du THAM monoTHP, aurait provoqué également celle du groupe THP. Nous avons donc opté pour une synthèse directe du composé **11**.

Comme nous l'avons vu précédemment (cf. Synthèse des composés **5** et **6**), il est difficile de modifier directement une seule fonction alcool du THAM sans faire réagir les deux autres, même avec un large excès de THAM. La réaction a été effectuée dans le DMF qui est un bon solvant du THAM. Le DHP a été ajouté goutte-à-goutte à 0 °C à cette solution en présence d'une quantité catalytique d'acide *p*-toluènesulfonique (cf. Figure 1.23).

Le monomère **11** attendu a été obtenu avec un rendement de 40 %. La très lente réaction est restée peu sélective et a conduit en fait, à un mélange des dérivés mono-, di- et tri-OTHP (composés **11**, **12** et **13** respectivement) qui ont pu être isolés et caractérisés.

La méthode présentait l'inconvénient d'imposer l'utilisation d'un solvant peu volatil éliminé par distillation sous vide et en chauffant le milieu réactionnel à une température (50 °C) où

l'amorçage thermique de la polymérisation devenait alors possible. Nous avons alors essayé de synthétiser le monomère **11** à partir d'un monomère déjà modifié et plus soluble que le THAM dans des solvants peu polaires.



**Figure 1.23** : schéma de synthèse du THAM monoTHP **11** effectuée en une étape avec un rendement de 40 %.

Le THAM monoacétylé **5** a été choisi comme réactif de départ, la réaction pouvait dès lors avoir lieu dans le dichlorométhane anhydre pour conduire à la formation du composé **14** avec un rendement de 40% (cf. figure 1.24).

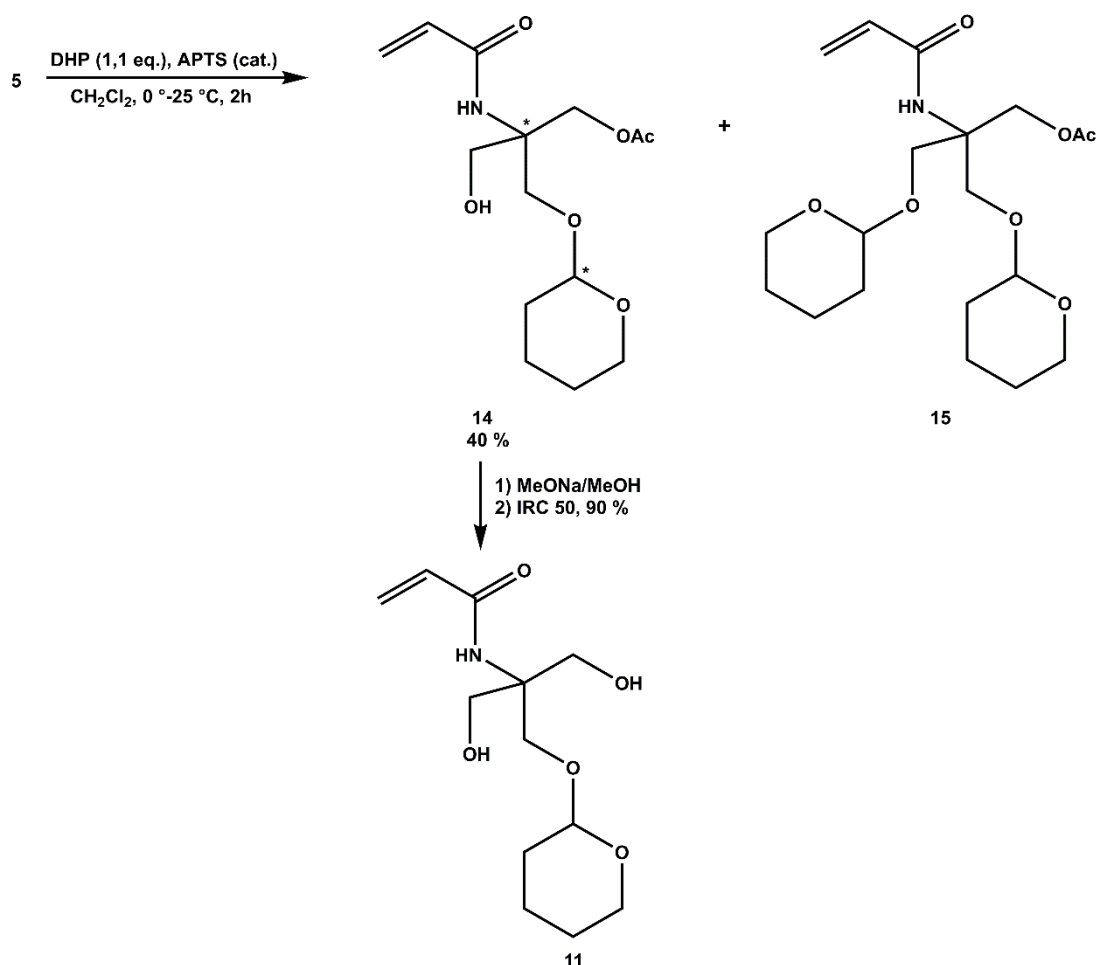
Nous avons pu montrer, après l'avoir isolé et caractérisé, qu'il se formait aussi une petite quantité de dérivé **15** résultant d'une diaddition.

La RMN  $^1\text{H}$  du composé **14** a permis de mettre en évidence la présence de deux diastéréoisomères dans les proportions 50/50 dont les signaux caractéristiques apparaissaient sur le spectre sous la forme de deux singulets à 6,74 et 6,51 ppm pour les deux protons amide et de deux triplets correspondant aux signaux de deux protons alcool à 5,00 et 4,76 ppm.

La fonction alcool acétylée du composé **14** a ensuite été déprotégée après méthanolyse effectuée en milieu basique pour obtenir le composé **11** attendu avec un rendement de 90 %, soit un rendement global de 36 % (cf. figure 1.24).



Cette deuxième voie s'est donc globalement avérée plus longue et moins intéressante que la synthèse directe du monomère **11** et a été par la suite abandonnée.



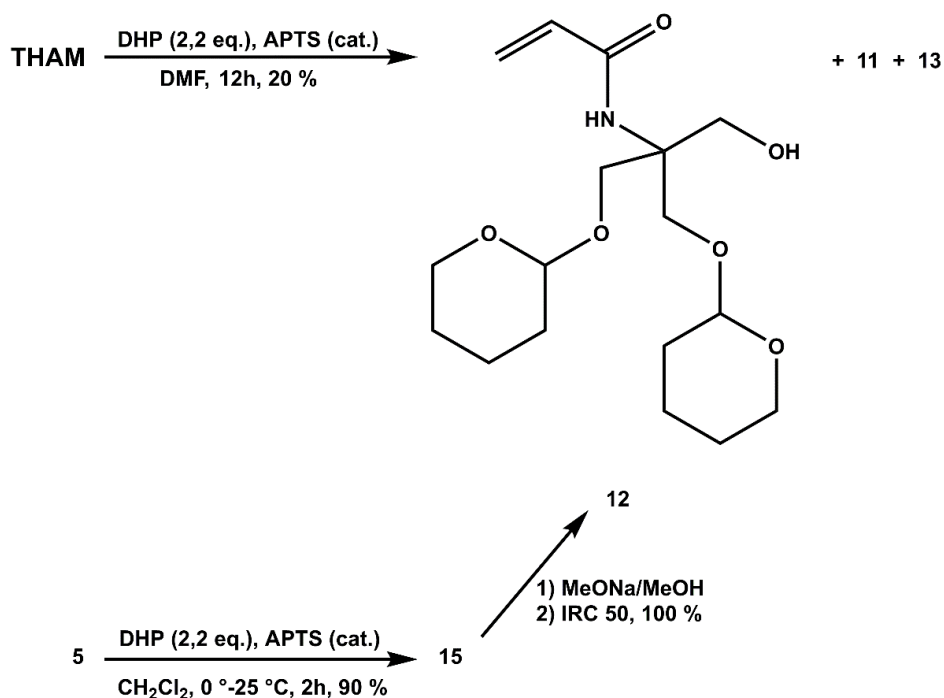
**Figure 1.24** : schéma de synthèse du THAM monoTHP **11** effectuée en deux étapes avec un rendement de 46 %.

### 2.1.3.2) Synthèse du dérivé ditétrahydropyranylé (THAM diTHP) **12**

Ce composé a pu être obtenu suivant les deux méthodes similaires à celles précédemment décrites pour la synthèse du monomère **11**. Le composé **12** a ainsi été obtenu avec un rendement de 20 % après avoir traité le THAM dissous dans le DMF par deux équivalents de DHP alors que la tétrahydropyranylation du THAM monoacétylé **5** suivi de la méthanolyse du THAMdiTHP acétylé **15** a permis d'obtenir le monomère **12** attendu avec un rendement global de 58 % (cf. figure 1.25).

La première méthode est restée peu sélective et a conduit à la formation des trois dérivés tétrahydropyranylés alors que la seconde méthode, plus longue mais parfaitement sélective, a permis d'obtenir le composé **12** avec un meilleur rendement global.

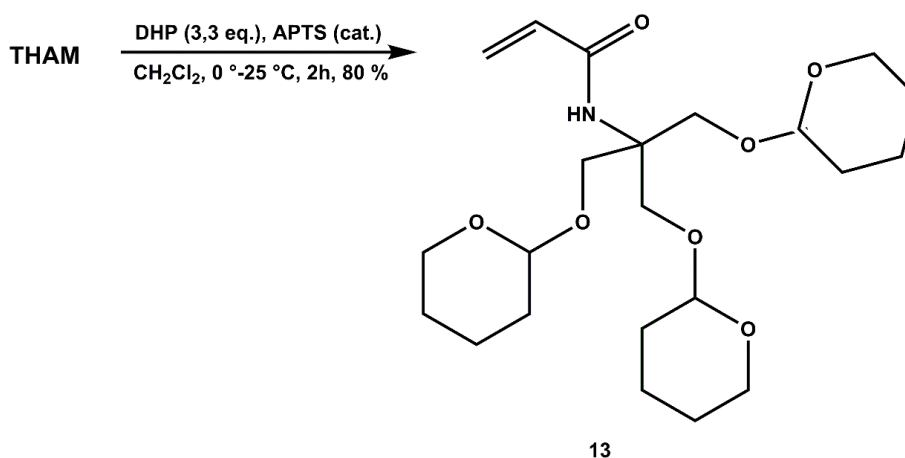
Ce monomère ne cristallisant pas et formant une huile insoluble dans le méthanol, nous avons donc choisi de ne pas effectuer de mesures de cinétique sur ce dérivé.



**Figure 1.25** : schéma de synthèse du THAM diTHP **12** effectuée en une seule étape à partir du THAM ou en deux étapes à partir du THAM monoacétylé **5**. Les rendements obtenus ont été respectivement de 20 et 56 % en considérant le THAM comme précurseur commun aux deux voies de synthèse.

### 2.1.3.2) Synthèse du dérivé tritétrahydropyranylé (THAM triTHP) **13**

Le monomère **13** a été très facilement obtenu en faisant réagir un excès de DHP sur le THAM en suspension dans le dichlorométhane.



**Figure 1.26** : schéma de synthèse du THAM triTHP **13** effectuée en une seule à partir du THAM.

Bien que le THAM ne soit pas soluble dans ce solvant, les traces infimes de monomère solubilisé ont réagi avec le gros excès de DHP. Le monomère modifié est alors resté en solution pour réagir à son tour avec le DHP. L'équilibre s'est ainsi déplacé pour conduire à la conversion quasi-totale du THAM en dérivé **13** après douze heures de réaction (cf. figure 1.26). Le composé **13** a ainsi été obtenu pur après cristallisation avec un rendement de 80 %.

## 2.2) Études des cinétiques de polymérisation des monomères dérivés du THAM

Nous avons effectué les cinétiques de polymérisation des différents monomères dans le méthanol à ébullition en suivant le protocole déjà décrit. Les résultats obtenus ont été répertoriés dans les tableaux 1.5 et 1.9.

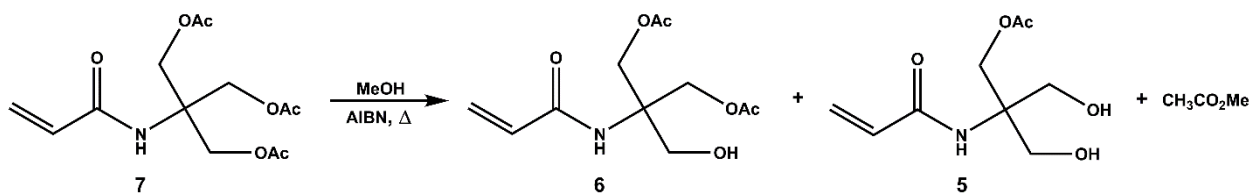
Avant de s'intéresser à l'interprétation des résultats obtenus, nous devons préciser que nous avons rencontré certains problèmes avec les monomères di et triacétylés (**6** et **7**).

Il nous a été en effet impossible, après de nombreux essais, de déterminer une valeur du rapport  $fk_p^2/k_t$  pour le monomère **6**. Les CCM et les RMN indiquent que même après 2h d'ébullition dans le méthanol en présence d'AIBN, la réaction de polymérisation reste inhibée par un facteur qui nous est resté inconnu.

Monomère	Pente	R <sup>2</sup>	Nombre de points	[AIBN] <sub>0</sub> (en mol.L <sup>-1</sup> )	$fk_p^2/k_t$ (en L.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
<b>3</b>	12,845	0,987	8	0,0005	2,06
	17,113	0,9913	9	0,0009	<b>2,04 ± 0.01</b> 2,03
<b>4</b>	17,345	0,9926	8	0,0005	3,76
	19,824	0,994	8	0,001	<b>3,1 ± 0.7</b> 2,39
<b>5</b>	26,391	0,9865	5	0,0005	8,7
	35,465	0,9901	6	0,001	<b>8,3 ± 0.4</b> 7,9
<b>7</b>	22,841	0,9846	8	0,0005	6,52
	31,71	0,9783	9	0,001	<b>6,4 ± 0.1</b> 6,29
<b>11</b>	13,522	0,9966	9	0,0005	2,24
	20,337	0,9922	9	0,001	<b>2,4 ± 0.2</b> 2,57
<b>13</b>	4,0083	0,9929	7	0,0005	0,193
	5,6014	0,9906	10	0,001	<b>0,194 ± 0,02</b> 0,196

**Tableau 1.5** : Récapitulatif des résultats des cinétiques de polymérisation des monomères dérivés du THAM.

Nous avons aussi rencontré des problèmes de déprotection des groupements acétyle dans le méthanol avec le monomère **7**. Il s'agissait vraisemblablement d'une réaction de transestérification restituant partiellement les monomères **5** et **6** (cf. Figure 1.27).



**Figure 1.27** : schéma illustrant la méthanolysse observée du composé 7 à chaud et en présence d'AIBN.

Nous avons pu observer en effet l'apparition, en RMN <sup>1</sup>H dans le DMSO deutéré (cf. spectres RMN figure 1.28), d'un dédoublement des protons acryliques, d'un triplet mal résolu à 5,1 ppm pouvant correspondre à un proton d'une fonction hydroxyle ainsi que d'un pic à 3,7 ppm correspondant certainement à des signaux de protons méthyléniques appartenant aux groupements hydroxyméthyle CH<sub>2</sub>OH du Tris.

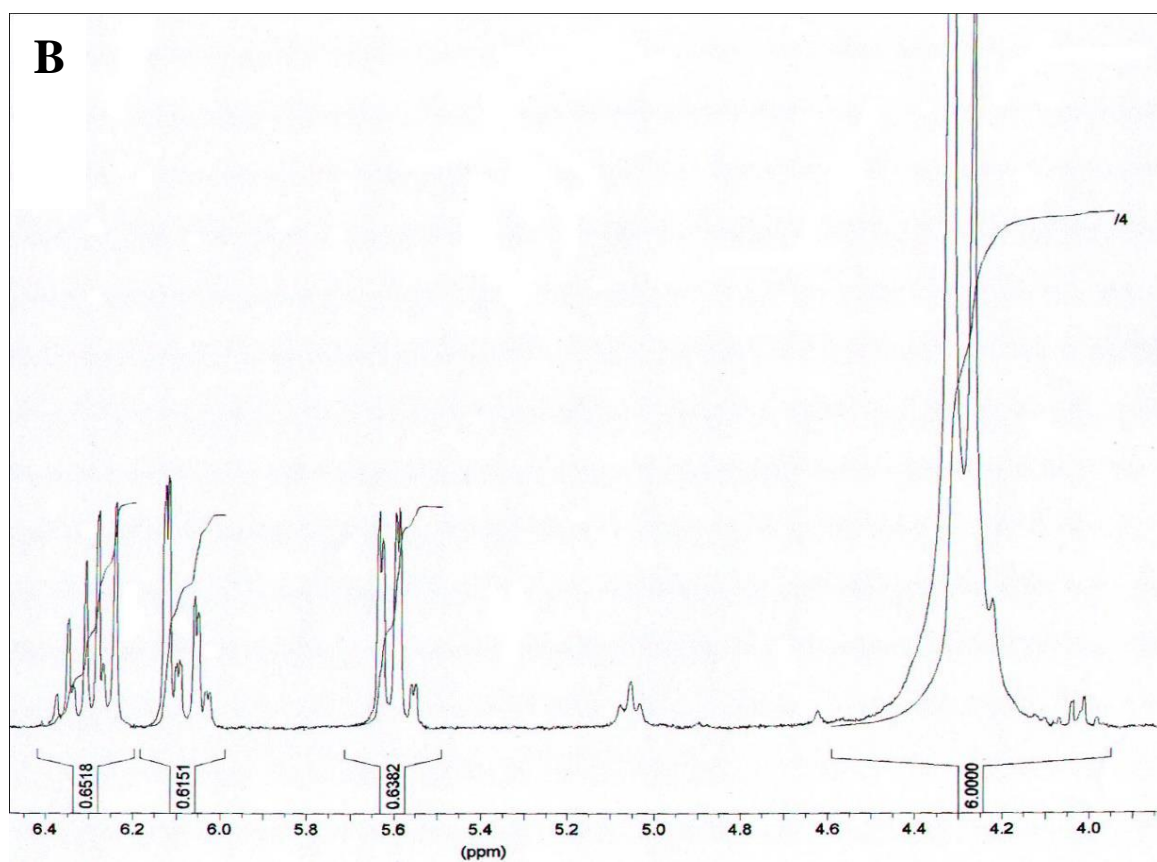
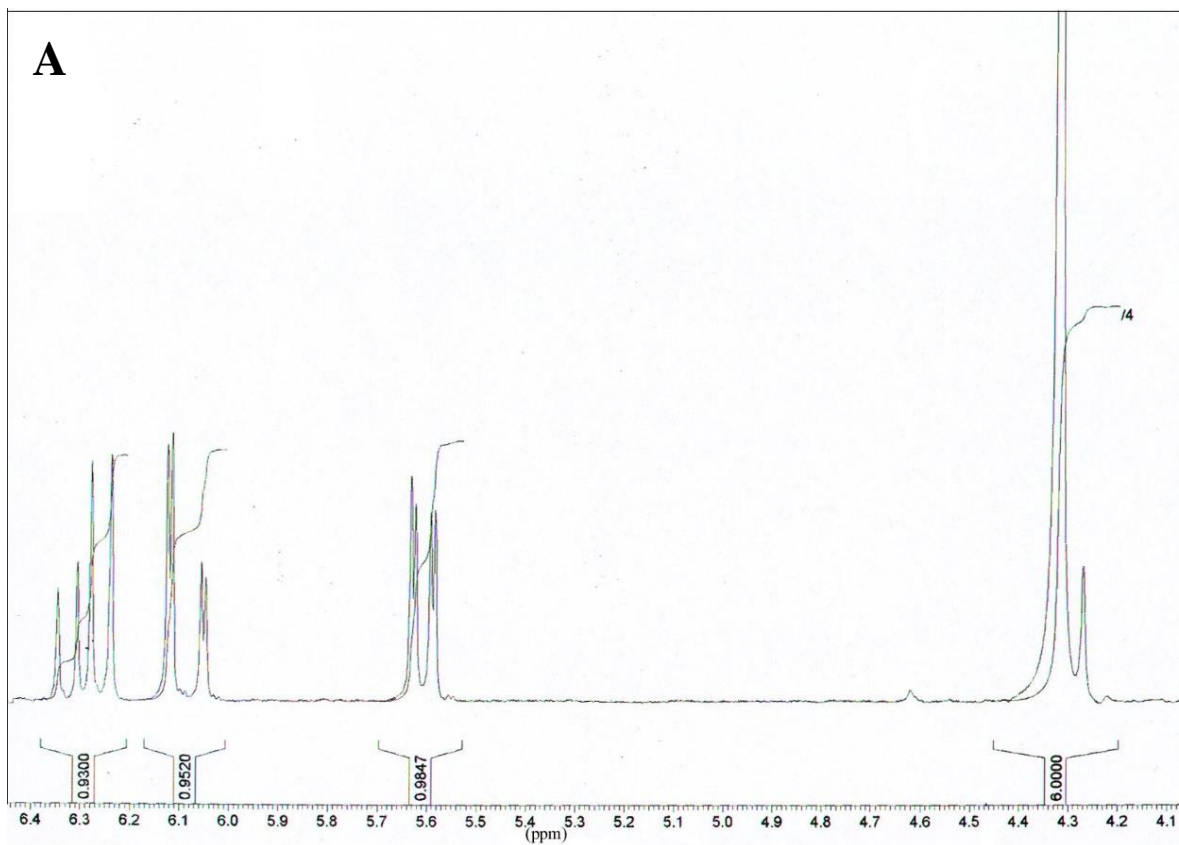
De plus l'observation en CCM de trois taches absorbant en U.V. dont les *R<sub>f</sub>* étaient similaires à ceux des monomères monoacétylé, diacétylé et triacétylé confirmait qu'il s'agissait d'une réaction de déprotection des acétyles.

Par contre, il faut signaler que les intégrations des protons acryliques diminuaient au cours du temps. Les réactions de déprotection et de polymérisation n'interféraient donc pas et un monomère partiellement ou entièrement déprotégé pouvait réagir et polymériser.

Nous avons essayé de comprendre le mécanisme d'un tel phénomène en réalisant une série d'expériences.

Dans un premier temps, nous avons effectué une réaction de polymérisation du THAM triacétylé dans le méthanol et nous avons pu vérifier que le phénomène se produisait aussi en absence d'agent télégène (alcanethiol). La présence du télégène n'avait donc aucune influence sur la réaction de déprotection.

Dans l'expérience suivante, nous avons porté à reflux une solution méthanolique 0,1 M de monomère triacétylé sous atmosphère inerte. Une heure après la mise à ébullition nous avons prélevé 2 ml de solution que nous avons injectés aussitôt dans une solution d'hydroquinone dans l'éther. L'analyse RMN dans le DMSO-*d*<sub>6</sub> et une CCM de l'échantillon n'ont révélé aucune trace de monomères déprotégés.



**Figure 1.28** : suivi de l'évolution en fonction du temps d'une solution méthanolique décimolaire de monomère **7** portée à ébullition en présence d'AIBN: **A**/t = 0 s, **B**/t = 2713 s.

Une quantité d'AIBN a alors été injectée dans le milieu réactionnel dans des proportions telles que la concentration initiale en amorceur ait été de l'ordre de  $5 \times 10^{-4}$  M. Puis nous avons réalisé deux prélèvements à 10 minutes d'intervalle.

Les analyses RMN et la CCM de ces deux nouveaux échantillons ont mis en évidence la présence de monomères issus de la déprotection du monomère triacétylé, comportant une ou deux fonctions hydroxyle libres. Deux autres expériences similaires réalisées avec des concentrations en amorceur différentes ( $10^{-3}$  M et  $2 \times 10^{-3}$  M) ont abouti aux mêmes résultats.

Il semblait donc que le facteur limitant de ce type de réaction parasite était l'absence d'AIBN dans le milieu réactionnel.

Lorsque ces différentes expériences ont été réalisées dans l'acétonitrile ou le THF nous n'avons observé aucune anomalie et le monomère a polymérisé normalement sans réaction parasite de déprotection. Les réactions de déprotection n'étaient donc observables que dans des solvants de type alcool tel que le méthanol.

Afin d'éviter toutes conclusions hâtives concernant ce phénomène, nous avons essayé d'inhiber cette réaction parasite.

Nous avons établi l'hypothèse qu'au cours de la réaction de polymérisation il se formait un produit de dégradation aux propriétés basiques susceptible d'engendrer des réactions de transestérification.

Nous avons en effet pu vérifier l'action efficace d'un catalyseur basique tel que la TEA, en portant à ébullition le THAM triacétylé solubilisé dans le méthanol en présence d'une quantité catalytique de TEA pendant 12 heures. Nous avons ainsi observé (par RMN  $^1\text{H}$ ) une réaction de méthanolyse lente et incomplète des groupements acétyles.

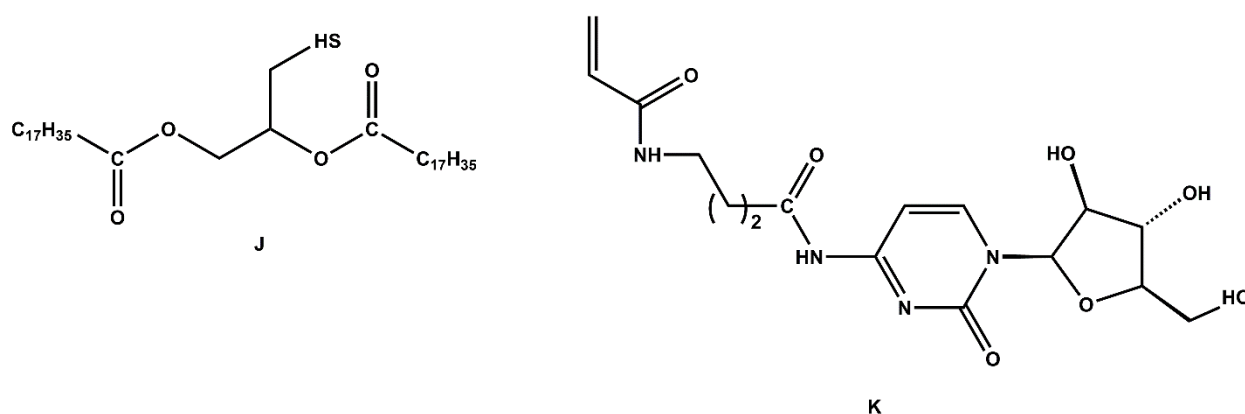
Nous avons alors réalisé une dernière expérience dans laquelle nous avons acidifié légèrement ( $\text{pH} = 6$ ) le solvant en début de réaction par ajout d'une goutte de TFA dans le milieu réactionnel. Cette précaution a effectivement suffi à faire disparaître ces problèmes de déprotection comme ont pu le montrer les analyses RMN et les CCM de deux prélèvements effectués respectivement 10 minutes et 30 minutes après injection d'une solution d'AIBN dans le solvant à reflux. Aucune réaction parasite n'a été observée dans ces conditions.

Il ne nous a pas été loisible de caractériser ce phénomène correctement (il aurait été en effet intéressant de savoir pourquoi nous n'avons pas observé ces réactions de déprotection sur les autres monomères acétylés), mais l'hypothèse selon laquelle il y aurait formation d'un produit aux propriétés basiques catalysant des réactions de transestérification paraissait confirmée par les résultats de nos expériences. Cette réaction parasite se rencontrera encore dans les sections suivantes où nous nous sommes contentés de la signaler.

Précisons cependant que de telles réactions parasites d'hydrolyse de groupements acétyle, ont pu être mises en évidence au laboratoire avec d'autres composés.

L. Moreau et A. Polidori<sup>157</sup> ont montré que de la même façon les liaisons esters mises en jeu dans le composé **J** se dégradent dans des solvants tels que le méthanol, l'éthanol ou le monoglyme lorsqu'une faible quantité d'AIBN était introduite dans le milieu réactionnel (cf. figure 1.29).

C. Contino-Pépin<sup>158</sup> a observé le même phénomène avec le composé **K** dont la liaison amide formée entre la fonction acide de l'acide  $\gamma$ -butyrique et la fonction amine de l'Ara-C était clivée dans le méthanol à ébullition en présence d'AIBN (cf. figure 1.29).



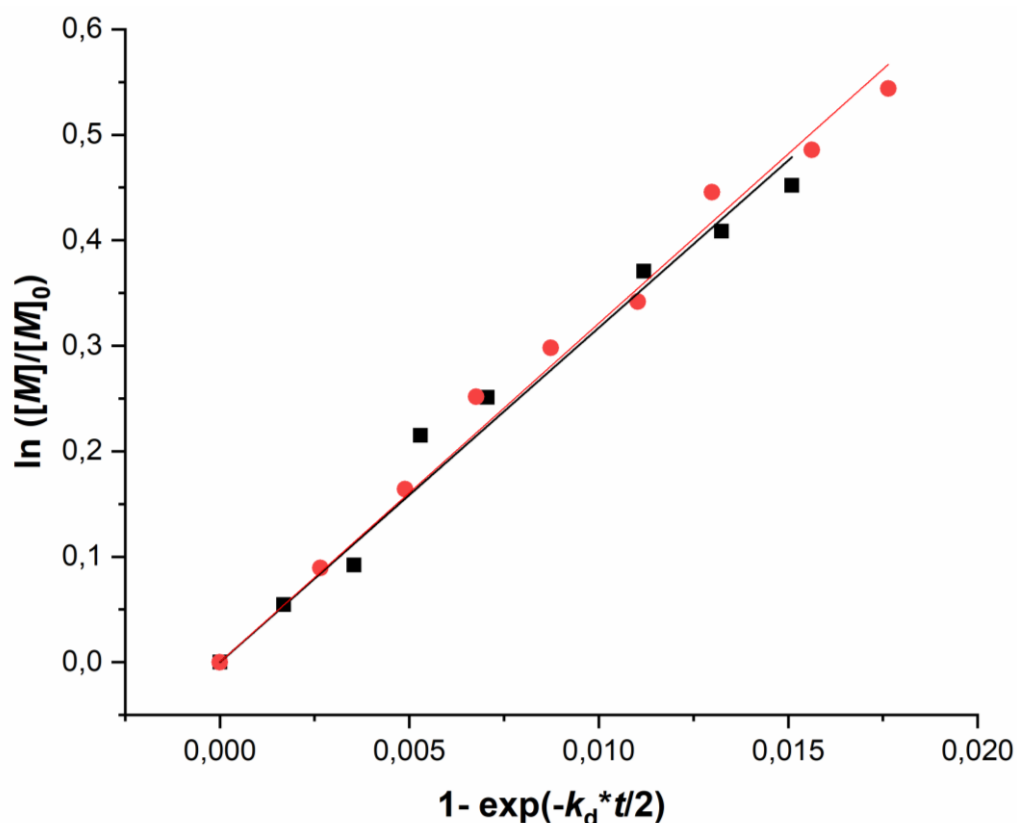
**Figure 29** : structure des composés J et K.

Nous avons donc réalisé nos expériences de cinétique avec deux concentrations différentes parfaitement définies en TFA de façon à s'assurer que la concentration en acide n'intervienne pas sur la cinétique de polymérisation et nous avons pu vérifier qu'elle n'avait aucune influence sur la vitesse de polymérisation du monomère **7** (cf. Figure 1.30 et tableau 1.6).

Dès lors, en portant notre attention sur les résultats des cinétiques obtenus, nous pouvions observer que les dérivés acétylés conservaient une très forte réactivité, la valeur du rapport  $fk_p^2/k_t$  ayant été en effet estimée à  $6,4 \pm 0,1 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$  pour le monomère triacétylé **7** et  $8,3 \pm$

0,4 L.mol<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> pour le monomère monoacétylé 5. Nous assistions donc bien à une baisse de la réactivité en fonction du nombre d'hydroxyle protégés mais cette baisse était peu significative.

De plus, les réactivités de ces deux monomères étaient plus élevées que celle du monomère 1 (BHAM) comportant deux fonctions hydroxyle libres, il semblait donc que les groupements acétyle avaient une influence sur la réactivité des monomères. Ceci était confirmé pour le THAM isopropylidène acétylé 4, plus réactif que le THAM isopropylidène 3.



**Figure 1.30** : Influence de la concentration en TFA sur la vitesse de polymérisation du monomère 7 étudiée sur deux cas à concentration d'AIBN identique (0,001 M) et à concentration en TFA différente, [TFA] = 0,001 M (●) et [TFA] = 0,002 M (■).

Pente	(TFA) mol.L <sup>-1</sup>	(AIBN) mol.L <sup>-1</sup>	$fk_p^2/k_t$
32,12	0,001	0,001	6,45
31,713	0,002	0,001	6,29

**Tableau 1.6** : influence de la concentration en TFA sur la vitesse de polymérisation du monomère 7.

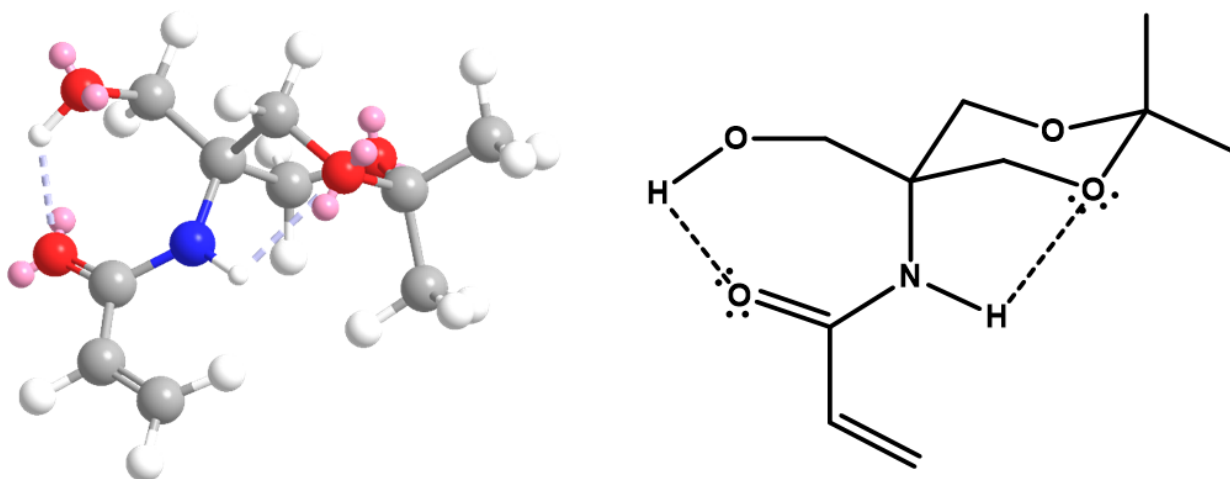
Il semblait donc que l'acétylation des groupements acétyle n'induisait qu'une perte superficielle de la réactivité initiale du THAM. L'introduction du groupement carbonyle C=O, permettait de masquer les fonctions hydroxyle et générant parallèlement de nouvelles interactions intermoléculaires suffisamment importantes pour activer le monomère (et/ou le macroradical en



croissance). On pouvait imaginer que des liaisons hydrogène se formaient avec les protons des fonctions amides, ce que nous avons vérifié ultérieurement (*vide infra*).

La réactivité du THAM isopropylidène a été estimée légèrement inférieure à celle du MAP. Cette perte de réactivité pouvait être due à l'encombrement stérique introduit par le cycle 2,2-diméthyl-1,3-dioxane et pouvait également s'interpréter en supposant que la fonction hydroxyle du THAM isopropylidène **3** était impliquée partiellement dans des interactions intramoléculaires.

En effet le spectre RMN  $^1\text{H}$  dans le chloroforme deutéré du composé **3** montre une conformation bloquée du cycle dioxa et un triplet à 5.07 ppm dont le déplacement chimique reste inchangé en fonction de la concentration. Des expériences de modélisation ont montré que la conformation est stabilisée par l'existence de liaisons hydrogène s'établissant entre la fonction hydroxyle et la fonction carbonyle d'une part, et entre un des oxygènes du cycle dioxane et le proton amide d'autre part (cf. figure 1.31).



**Figure 1.31** : représentation des liaisons intramoléculaires observées par RMN  $^1\text{H}$  et modélisation moléculaire (à gauche) du monomère **3**. La modélisation a été effectuée avec le logiciel Chem-3D en appliquant le champ de force MM2 et en imposant différentes valeurs d'angles dièdre sur le modèle. Le minimum d'énergie de contrainte ( $\sim 63$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) a été obtenu pour des valeurs permettant l'établissement des deux liaisons hydrogènes (figurées par deux tirets gris).

Bien que le méthanol soit, contrairement au chloroforme, un solvant polaire protique, il n'était pas interdit de penser que ces interactions intramoléculaires pouvaient intervenir aussi dans ce solvant. Il était possible qu'un équilibre s'installait entre les fonctions hydroxyle solvatées et les fonctions hydroxyles impliquées dans les liaisons hydrogène intramoléculaires, ceci tendant à limiter l'agrégation du monomère.

Cette hypothèse était intéressante, d'autant que les différentes expériences de minimisation d'énergie effectuées par la suite sur le THAM et certains de ses dérivés (*vide infra*) ont conduit aux conformères pour lesquels s'établissaient ces interactions intramoléculaires. Cependant, notre manque d'expertise dans ce domaine nous a obligé à rester prudents et à nous limiter à ces quelques commentaires.

Le THAM mono-*O*-tétrahydropyranyle **11** présentait de même une réactivité identique au MAP **2** et nettement inférieure à celle du BHAM **1**. La réactivité avait diminué de façon significative bien que le monomère comportait deux fonctions hydroxyle libres. Les résultats obtenus avec le THAM tri-*O*-tétrahydropyranyle ( $f k_p^2/k_t$  évalué à 0,194 L.mol<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) ont permis d'attribuer une telle désactivation à l'encombrement apporté par le groupement tétrahydropyranyle.

Ces résultats ont permis de montrer que, pour une même catégorie de groupements protecteurs, la réactivité du monomère évoluait suivant le nombre de fonctions hydroxyle protégées et que la nature et la taille du groupement protecteur avait aussi une forte influence sur la réactivité.

En effet, l'encombrement stérique contribue à réduire la vitesse de polymérisation soit en gênant l'approche du monomère et du macroradical, soit en limitant les possibilités d'agrégation des monomères.

D'autre part, des groupements protecteurs tels que les acétyles semblaient être impliqués dans des systèmes d'association dont nous ignorions la nature (mais probablement imputables à des liaisons hydrogène avec les fonctions amide). Il fallait donc tenir compte du fait que si la protection d'une fonction alcool permettait d'éliminer un site donneur de liaison hydrogène, elle pouvait également, suivant le type de protection utilisé, devenir un site accepteur de liaison hydrogène ou intervenir dans un autre type de processus activateur de la propagation. La réactivité globale du monomère résultait donc d'une superposition de ces différents phénomènes complexes.

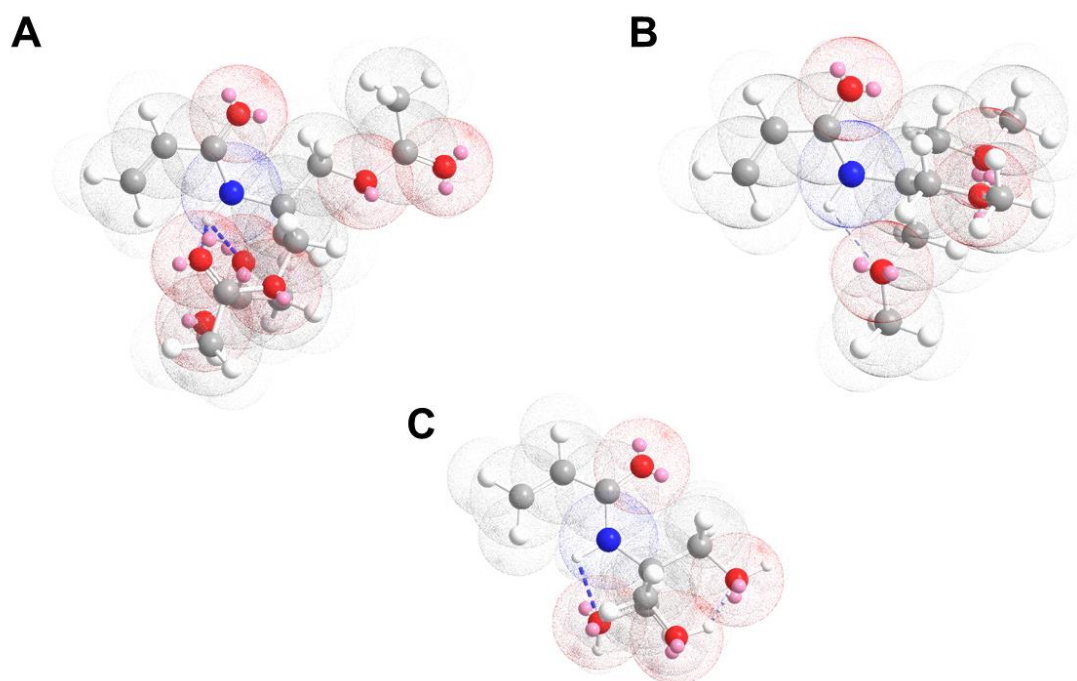
Dans le but de compléter nos recherches, nous avons envisagé de protéger irréversiblement les fonctions alcool du THAM en introduisant sur celles-ci un groupement parfaitement stable. Les monomères ainsi protégés ne devaient être impliqués dans aucun processus association particulier et les groupements protecteurs devaient être de taille la plus réduite possible de façon à limiter les effets de l'encombrement stérique.

Nous avons ainsi synthétisé le THAM triméthoxylé et nous avons effectué des mesures de cinétique de polymérisation de ce monomère.

### 3) Synthèse et études cinétiques du THAM triméthoxylé **16**

En utilisant des groupements protecteurs tels que les méthyles nous pensions disposer d'un monomère peu encombré ou du moins dont l'encombrement était certainement comparable à celui du THAM triacétylé.

Nous avons eu recours à la modélisation pour nous assurer que cela était au moins vérifiable visuellement à l'état gaz (cf. figure 1.32).



**Figure 1.32** : modèles moléculaires obtenu après optimisation à l'état gaz sous Chem 3-D (champs de force MM2) du THAM triacétylé **7** (A), du THAM triméthoxylé **16** (B) et du THAM (C). Le volume occupé par le monomère **16** est supérieur à celui occupé par le THAM et inférieur (mais du même ordre de grandeur) que celui occupé par le monomère **7**. Les liaisons apparaissant en tiret font état de l'existence de liaisons hydrogène intramoléculaires faisant intervenir dans chacun des trois cas le proton de la fonction amide.

#### 3.1) Synthèse du THAM triméthoxylé

Ce composé a pu être obtenu de deux façons différentes.

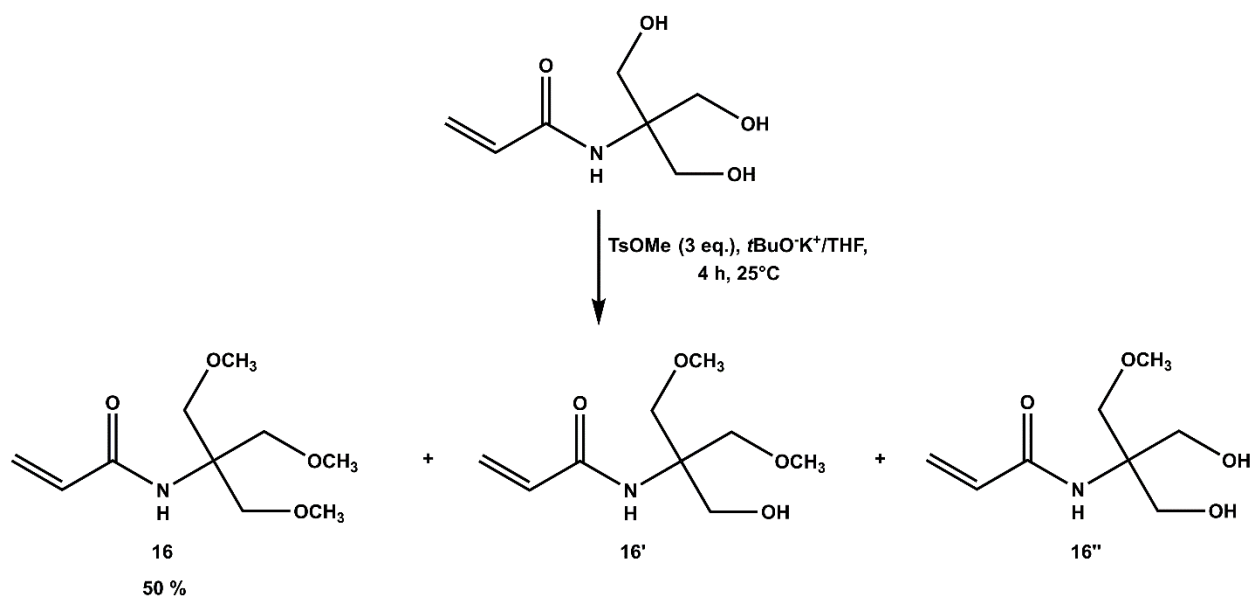
Nous avons procédé à un premier essai en effectuant une réaction de type Williamson sur le THAM solubilisé dans le DMF et traité par un excès d'hydrure de sodium et d'iodure de méthyle. Le composé **16** a ainsi été obtenu avec un rendement de 40 % et malgré l'excès de base et d'agent

méthylant nous avons obtenu deux sous-produits **16'** et **16''** qui correspondaient respectivement aux dérivés di- et monométhylé (composés isolés et caractérisés).

La méthode utilisée nous a permis d'accéder au composé **16** attendu avec un rendement non négligeable. Cependant, comme nous le montrerons ultérieurement, malgré une purification par chromatographie sur colonne de silice suivie d'une cristallisation, le produit semblait contaminé par une impureté qui ralentissait et parfois inhibait la réaction de polymérisation. Nous avons attribué ce problème à la présence d'iode ou d'un de ses dérivés qu'il était difficile d'éliminer.

Un autre agent méthylant et une base organique ont alors été choisis. Nous avons pu obtenir de nouveau le composé **16** en faisant réagir un excès de tosylate de méthyle sur une suspension de THAM dans le THF anhydre en présence de *ter*-Butylate de potassium.

Le composé **16** a été obtenu avec un meilleur rendement (50 %) et parfaitement pur mais la méthylation n'était cependant pas totale et nous avons de nouveau observé la formation des sous-produits **16'** et **16''** (cf. figure 1.33).



**Figure 1.33** : schéma de synthèse du THAM triméthoxylé **16**.

Quoiqu'il en fut, nous avons trouvé le moyen d'écartier tout risque de contamination de ce composé par des impuretés inhibitrices des réactions radicalaires. Il nous a alors été possible d'effectuer des cinétiques de télomérisation de ce monomère.

### 3.2) Cinétique de polymérisation du THAM triméthoxylé **16**

Un exemple des premiers résultats obtenus avec le monomère préparé selon la première méthode (en présence d'iodure de méthyle) est donné dans le tableau 1.7. Nous avons observé effectivement une vitesse de polymérisation faible ou parfois nulle.

pente	R <sup>2</sup>	Nombre de points	(AIBN) mol.L <sup>-1</sup>	$fk_p^2/k_t$ (L.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
12,383	0,9864	9	0,001024	0,934

**Tableau 1.7** : résultat d'une cinétique de polymérisation du monomère **16** obtenu avec la méthode utilisant l'iodure de méthyle.

Après avoir changé de méthode de synthèse nous avons recommencé les expériences et obtenu des résultats parfaitement reproductibles (cf. tableau 1.8).

Monomère	Pente	R <sup>2</sup>	Nombre de points	[AIBN] <sub>0</sub> (en mol.L <sup>-1</sup> )	$fk_p^2/k_t$ (en L.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
<b>16</b>	15,536	0,9848	9	0,0005	2,99
	22,203	0,9847	9	0,001	<b>3,04 ± 0,05</b> 3,09

**Tableau 1.8** : résultats des cinétiques de polymérisation du monomère **16** obtenu par la méthode utilisant le tosylate de méthyle.

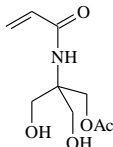
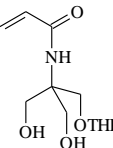
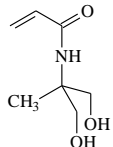
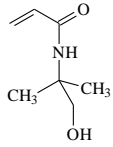
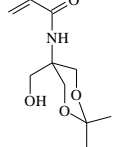
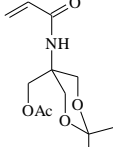
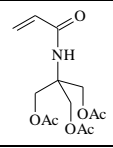
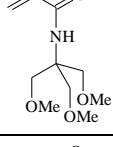
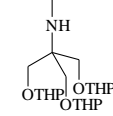
La vitesse de polymérisation du THAM triméthoxylé était donc inférieure à celle du THAM triacétylé, bien que ce dernier présentait un encombrement stérique supérieur. Il devenait donc évident que le THAM triacétylé était impliqué dans des processus (d'agrégation) particuliers favorisant la propagation, les fonctions acétoxy pouvant donc induire de fortes interactions entre monomères ou permettant un autre type de mécanisme inconnu.

La vitesse de polymérisation mesurée avec les dérivés triméthoxylés reste cependant relativement importante. Cet aspect est pratiquement généralisable à tous les monomères étudiés dérivant du THAM.

## 4) Conclusion

L'accroissement de la vitesse de polymérisation du THAM par rapport aux dérivés acrylamide classiques est très probablement imputable à la présence des groupements hydroxyméthyle

capables de donner des liaisons hydrogène intermoléculaires fortes et donc responsables de la formation d'agrégats.

MONOMERES	FORMULE	$fk_p^2/k_t$ (L.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
THAM		11,00 ± 0,05
5		8,3 ± 0,4
11		2,4 ± 0,16
1		4,4 ± 0,4
2		2,3 ± 0,2
3		2,04 ± 0,01
4		3,1 ± 0,7
7		6,4 ± 0,1
16		3,04 ± 0,05
13		0,19 ± 0,04

**Tableau 1.9** : récapitulatif des valeurs du rapport  $fk_p^2/k_t$  obtenues pour les différents monomères **1** à **16** dans le méthanol à reflux.

Cependant, la valeur des vitesses de polymérisation des dérivés sur lesquels ces fonctions hydroxyle sont protégées reste dans certains cas toujours assez importante (cf tableau récapitulatif 1.9).

Par ailleurs, nous avons pu vérifier que cette vitesse de polymérisation était réduite de façon plus efficace en éliminant une fonction alcool plutôt qu'en la protégeant. Un facteur chimique autre que les seules fonctions hydroxyle doit donc intervenir et cumuler son effet avec ces dernières.

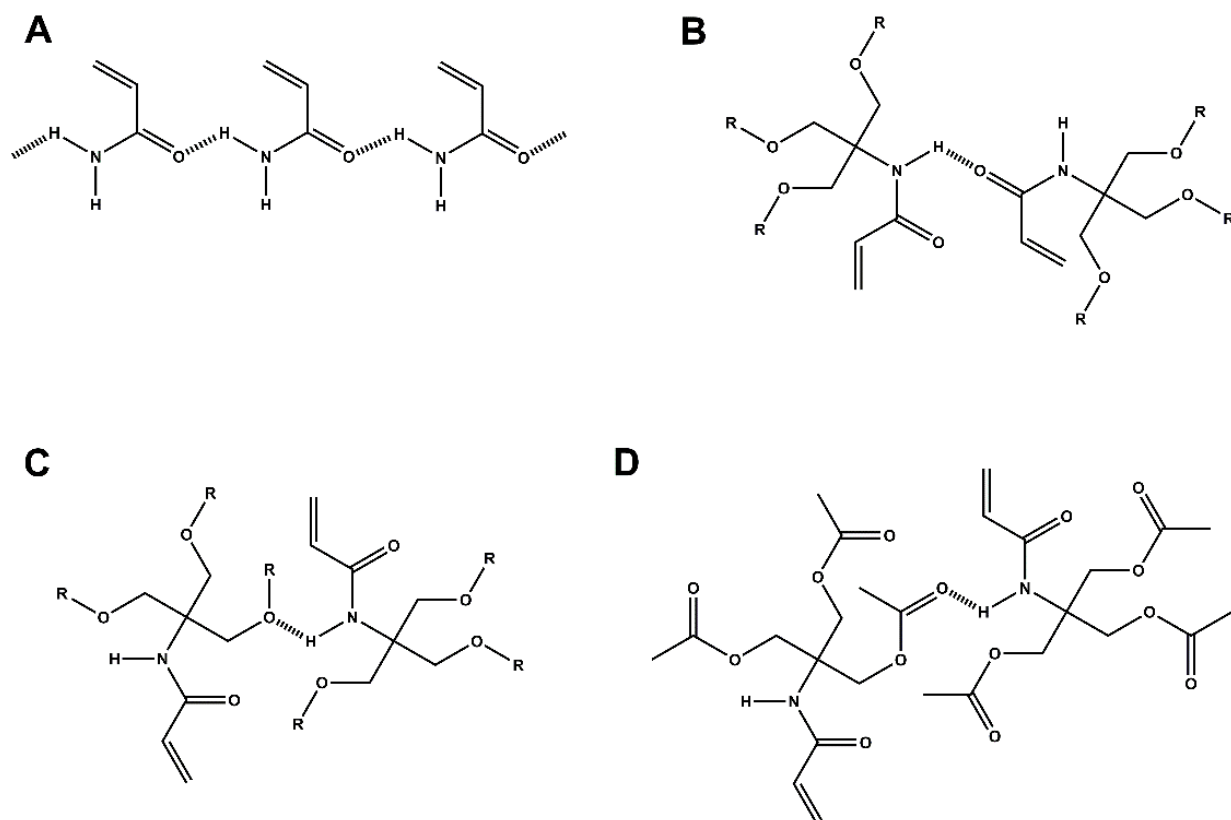
En nous basant sur cette dernière remarque et sur les résultats des quelques modélisations moléculaires reportées dans les figures 1.31 et 1.32, nous avons émis l'hypothèse que la réactivité inattendue des monomères **7** et **16** dont les fonctions alcool étaient protégées par des groupements acétyle ou méthyle, pouvait s'interpréter si l'on prenait en compte un donneur de liaison hydrogène tel que la liaison amide. Cette dernière interviendrait également dans les processus d'agrégation moléculaire.

Le rôle de la liaison amide dans le procédé d'association de l'acrylamide était connu et avait été décrit par différents auteurs<sup>159,160</sup> mais nous ignorions alors à quel niveau il pouvait intervenir dans le cas du THAM.

Dans le cas de l'acrylamide les liaisons hydrogènes s'établissent entre la fonction carbonyle d'un monomère et un des protons de la liaison amide d'un second monomère mais dans le cas du THAM ces interactions pouvaient intervenir aussi entre les fonctions alcool (libres ou alkylées) d'un monomère et le proton de la liaison amide d'un autre monomère (cf. figure 1.34).

Un proton amide pouvait ainsi donner des liaisons hydrogène (de façon aléatoire ou suivant un équilibre déterminé) avec les oxygènes du Tris ou la fonction carbonyle du groupe acryloyle. Par analogie, nous pouvions supposer que dans le cas du THAM triacétylé il se créait des interactions entre la liaison amide et les fonctions carbonyle des acétyles.

Ces liaisons hydrogènes étaient peut-être beaucoup plus solides que les interactions pouvant exister par exemple entre des groupements méthoxy et la liaison amide. Elles auraient été de ce fait responsables de la création d'un système agrégé en solution dont l'existence permettait d'interpréter la valeur élevée des constantes de vitesse de polymérisation.



**Figure 1.34** : Différents modes d'association des acrylamides faisant intervenir la liaison amide. A/cas de l'acrylamide tel que reporté dans la littérature<sup>159,160</sup>. B/Extension au THAM et à ses dérivés. C/Modèle alternatif où la liaison amide interagit avec les hydroxyméthyles. Ce modèle n'est pas valide si R est un groupement acétyle. D/Modèle alternatif spécifique aux dérivés acylés du THAM. Les associations des dérivés du THAM concernent l'agrégation de plusieurs monomères mais ont été représentées sous forme dimérique pour simplifier l'illustration.

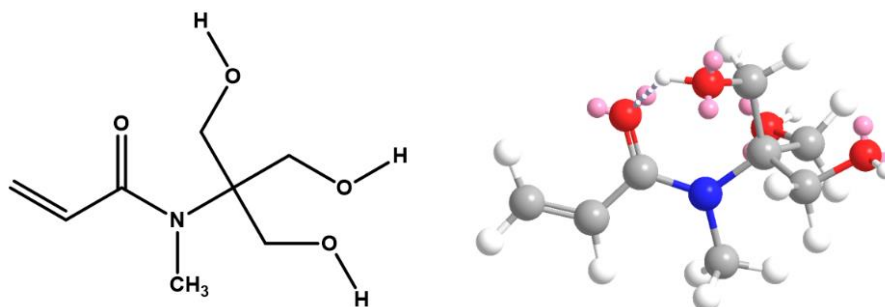
Mais nous pouvons interpréter la différence de réactivité entre les deux monomères d'une toute autre façon en admettant que les interactions avec la liaison amide s'établissaient exclusivement entre le proton amide et la fonction carbonyle. Ainsi, en acétylant une fonction hydroxyle, nous désactivons en partie le monomère car nous perdons un site d'agrégation mais nous en introduisons un autre qui permettait d'établir des interactions supplémentaires avec le proton amide. La réactivité était ainsi, certes, diminuée mais restait assez importante.

Il était donc fort probable que la liaison amide intervenait de façon significative dans les procédés d'association et nous nous sommes proposés de le démontrer. Précisons que nous nous attendions à ne pas être en mesure de pouvoir distinguer, parmi les quatre oxygènes présents dans la structure du monomère, lequel ou (lesquels) étai(en)t réellement impliqué(s) dans les procédés de connexion avec le proton amide.

Selon cette hypothèse, nous avons envisagé d'effectuer des études cinétiques sur un dérivé du THAM dépourvu de proton amide, ce dernier devant être remplacé par un groupement peu



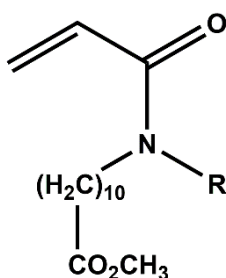
volumineux de façon à limiter l'influence de l'encombrement stérique. Un dérivé *N*-méthylé semblait parfaitement remplir ces conditions (cf. figure 1.35).



**Figure 1.35** : structure du THAM *N*-méthylé et modélisation 3-D. L'optimisation de structure (Chem 3D, champs de force MM2) conduit au conformère le plus stable présentant une liaison hydrogène intramoléculaire (tirets blancs) établie entre un hydroxyle et le carbonyle.

L'alkylation de l'azote et la disparition du proton amide devaient théoriquement avoir une forte influence sur la réactivité du monomère. Des auteurs tels que Saini *et al.*<sup>161-163</sup> ont en effet montré que la réactivité d'un acrylamide pouvait varier suivant le degré de substitution de l'atome d'azote, l'acrylamide, le *N*-méthylacrylamide et le *N,N'*-diméthylacrylamide ayant tous trois des réactivités différentes.

Leydet *et al.*<sup>164</sup> ont étudié les vitesses de réaction de certains *N*-acryloyl-*N*-alkylamino esters et ont montré que pour un monomère tel que le 11-(*N*-acryloyl-*N*-alkylamino)undécanoate de méthyle, le rapport  $fk_p^2/k_t$  évoluait de manière significative suivant le degré de substitution de l'azote (cf. figure 1.36).



R	$fk_p^2/k_t$ (L.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	Solvant	Température
H	0,264	CH <sub>3</sub> CN	80°C
Et	0,033	CH <sub>3</sub> CN	80°C

**Figure 1.36** : Evolution de la réactivité d'un acrylamide en fonction du degré de substitution de l'azote.

Il y avait donc pratiquement un rapport de 8 entre les deux valeurs. Il paraissait de ce fait tout à fait justifié de s'intéresser à l'influence de la liaison amide sur la vitesse de polymérisation du

THAM tout en gardant à l'esprit que le principal facteur influençant la vitesse de polymérisation des groupements acryloyle était de nature électronique. Il suffisait pour s'en convaincre de comparer les valeurs des rapports  $k_p^2/k_t$  de quelques dérivés acryliques et de leurs homologues méthacryliques répertoriées dans le tableau 1.10.

Monomère	$k_p^2/k_t$ (L.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	Solvant	t°(°C)	Référence
THAM	18,3	MeOH	65	23
MTHAM	0,017	MeOH	65	23
Acrylate de méthyle	0,12	Acrylate de méthyle	30	53 <sup>165</sup>
Méthacrylate de méthyle	0,0017	Méthacrylate de méthyle	30	54 <sup>166</sup>
Acrylamide	22,3	Eau	25	32
Méthacrylamide	0,0388	Eau	25	55 <sup>167</sup>

**Tableau 1.10** : comparaison des réactivités de certains monomères acryliques avec celle de leurs homologues méthacryliques.

La réactivité baisse d'un facteur 50 à 100 lorsque nous passons d'un groupe acryloyle à un groupe méthacryloyle. Guyot *et al.*<sup>168</sup> ont observé les mêmes phénomènes avec des dérivés méthacryliques et  $\alpha$ -acétoxyacryliques. Ces auteurs ont expliqué la baisse de la réactivité par le fait qu'un méthyle en  $\alpha$  de la double liaison pouvait induire une gêne stérique mais aussi stabiliser le radical formé lors de la polymérisation par effet donneur. Le radical devenait donc moins réactif et la vitesse de polymérisation diminuait.

Notamment, nous pouvions observer que la vitesse de polymérisation du MTHAM (homologue méthacrylique du THAM) était nettement moins élevée que celle du THAM, bien que les associations intermoléculaires avaient une forte influence sur la réaction de polymérisation, le facteur déterminant restait l'effet électronique.

Ceci ayant été établi, notre but était de déterminer quel était le principal facteur intervenant dans les processus d'agrégation : le proton amide, les fonctions alcool ou les deux à la fois. Le monomère pour lequel devaient être entreprises de nouvelles mesures de réactivité n'était cependant pas commercial et il a été nécessaire de rechercher une méthode de synthèse rapide et efficace permettant d'accéder au dérivé THAM-*N*-méthylé.

## **B) Synthèse et études cinétiques des dérivés du Tris(hydroxyméthyl)-N-méthylacrylamido-méthane**

La préparation du dérivé *N*-méthylé du THAM peut présenter de multiples intérêts, non seulement pour la compréhension du comportement cinétique du THAM, mais également pour définir une nouvelle classe de monomère, télomère et polymère. L'introduction de ce groupement méthyle est en effet susceptible d'affecter de façon très sensible les propriétés physicochimiques de l'ensemble de ces substrats : hydrosolubilité des polymères, CMC et tensioactivité des télomères, stabilité en milieu biologique...etc...

Deux voies de synthèse pouvaient être a priori envisagées pour accéder au THAM *N*-méthylé :

- La *N*-méthylation du Tris suivie de la condensation du *N*-méthyl Tris sur le chlorure d'acryloyle.

- La *N*-méthylation directe du THAM.

Ces deux axes de recherche ont été étudiés en parallèle afin de définir si possible la meilleure voie d'accès à ce monomère. Il est utile de préciser ici que si la première voie devait nous permettre de disposer assez rapidement d'une quantité importante de produit, le THAM, monomère initial employé dans la seconde, était disponible quant à lui en grande quantité au laboratoire, ce qui représentait un atout majeur si la *N*-méthylation se déroulait dans des conditions convenables.

### **1) Essai de synthèse du THAM *N*-Méthylé par condensation du Tris *N*-Méthyle sur le chlorure d'acryloyle.**

La première étape de la préparation envisagée a porté sur la mise au point de la synthèse du Tris *N*-méthylé.

#### **1.1) *N*-méthylation du Tris**

##### ***1.1.1) Tentative de *N*-méthylation du Tris par action d'un agent alkylant***

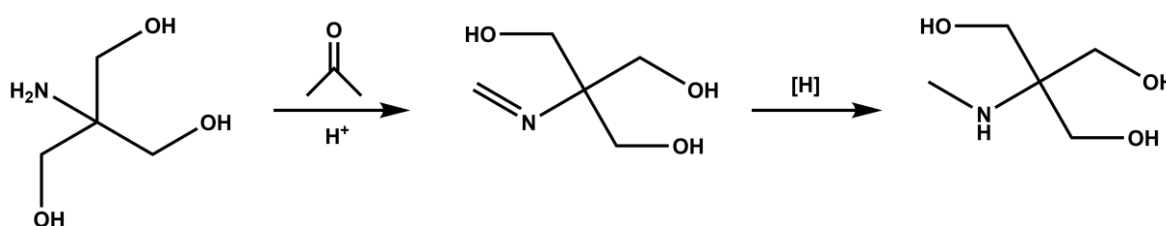
En premier lieu, il nous a paru intéressant de méthyler le Tris en traitant de façon classique la fonction amine par une base et un agent alkylant. Ce procédé s'est souvent révélé peu sélectif, la réaction conduisant à un mélange de produits mono ou polyalkylés.

Récemment Srivastava *et al.*<sup>169</sup> ont montré qu'il était possible d'obtenir essentiellement le dérivé monoalkylé en mettant en réaction l'amine et un bromure d'alkyle dans le DMSO en présence de carbonate de potassium. Nous avons donc tenté de méthyle la fonction amine du Tris en utilisant divers agents alkylants (tels que l'iodure ou le tosylate de méthyle) en milieu basique dans le DMF ou le DMSO.

Ces essais ont conduit à des mélanges de produits et ne nous ont pas permis d'obtenir le composé attendu. La méthylation a été certainement peu sélective et toutes les fonctions hydroxyle et amine ont réagi certainement en présence de ces agents alkylants. Il est donc paru opportun d'utiliser une méthode mieux adaptée telle que l'amination réductive.

### 1.1.2) *N*-alkylation du Tris par amination réductive du formaldéhyde

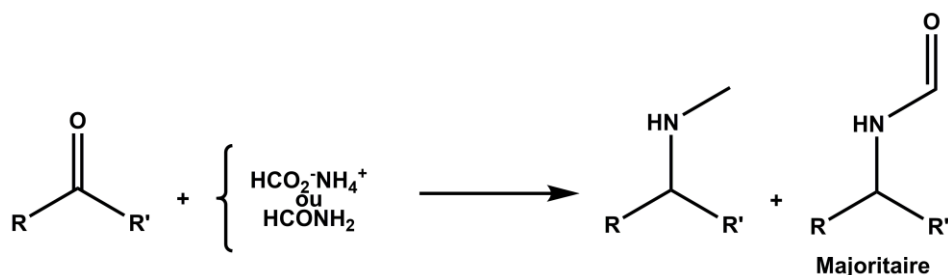
La réaction d'amination réductive du formaldéhyde devait consister en fait à synthétiser une formimine du Tris que l'on réduisait par la suite pour obtenir le dérivé *N*-méthylé (cf. figure 1.37).



**Figure 1.37** : plan de synthèse général du Tris *N*-méthylé.

Plusieurs méthodes de monoalkylation des amines ont été mises au point et décrites dans la littérature<sup>170</sup>. La plus ancienne, appelée réaction de Leuckart<sup>171</sup>, consistait à traiter un aldéhyde ou une cétone par le formiate d'ammonium pour obtenir l'amine correspondante. Leuckart préconisait également l'utilisation du formamide plutôt que le sel d'ammonium mais dans les deux cas c'est souvent le dérivé *N*-formylé qui était obtenu et non l'amine (cf. figure 1.38).

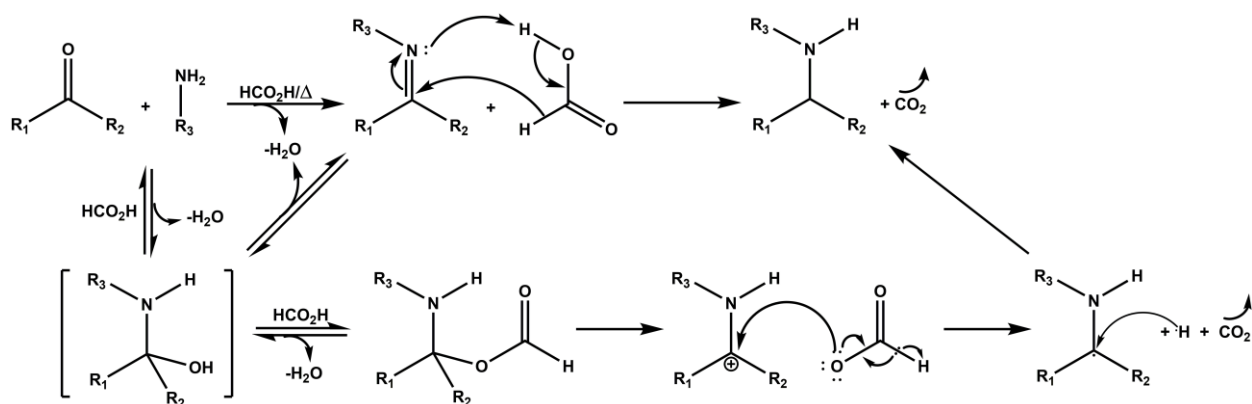
Un mécanisme expliquant ce phénomène a été proposé il y a une vingtaine d'années par Awachie *et al.*<sup>172</sup> qui ont démontré qu'à température élevée il existe un équilibre entre le sel de formiate d'ammonium et le formamide. Le formiate se décompose pour réduire le dérivé carbonyle en un alcool qui, après protonation, va subir une attaque nucléophile (le nucléophile étant le formamide) pour conduire à la formation du dérivé *N*-formylé.



**Figure 1.38** : amination réductive de Leuckart<sup>171</sup>.

Bien avant Awachie, Wallach<sup>173</sup> qui utilisait l'acide formique et non un sel d'ammonium, s'est intéressé au mécanisme de cette réaction. L'acide formique joue le rôle de catalyseur acide mais aussi de réducteur. L'acide formique et ses dérivés sont en effet des donneurs d'hydrogène dont les propriétés réductrices ont fait l'objet de nombreux travaux et ont trouvé un large domaine d'application<sup>174</sup>.

L'amine réagit avec le formol pour donner une imine qui est un accepteur potentiel d'hydrogène. L'acide formique est un composé instable qui a tendance à se dismuter en formaldéhyde et en dioxyde de carbone. En présence d'un accepteur d'hydrogène, cet acide va s'oxyder en gaz carbonique et réduire l'imine en amine (cf. figure 1.39).



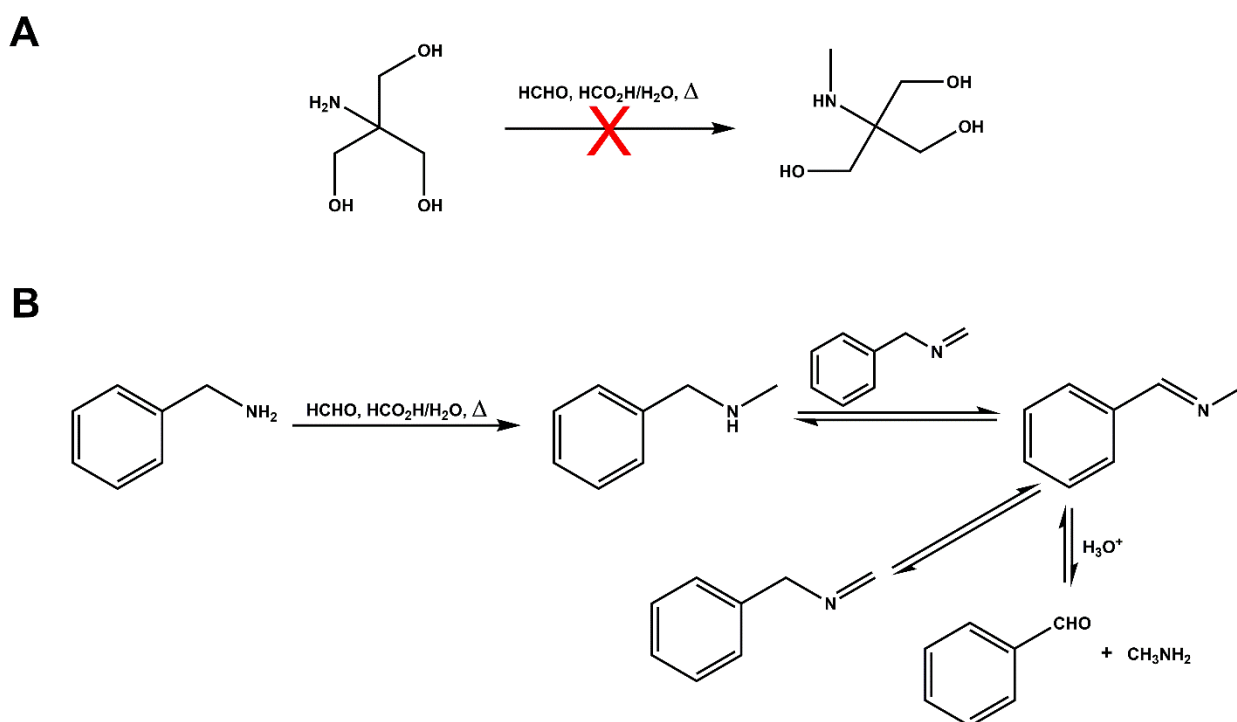
**Figure 1.39** : mécanisme de la réaction d'amination réductive de Leuckart<sup>171</sup> d'après Lukasiewicz<sup>175</sup>.

Le mécanisme est plus complexe qu'il n'y paraît et implique la formation d'un intermédiaire de type ester, se dégradant dans un premier temps suivant un processus hétérolytique pour générer une paire d'ions qui, elle-même, va se décomposer suivant un processus homolytique<sup>175</sup> (cf. figure 1.39).

Lorsque le dérivé carbonyle utilisé est le formaldéhyde, la réaction correspond à la monométhylation d'une amine primaire ou secondaire et la méthode est appelée procédé Eschweiler-Clarke<sup>176,177</sup>.

Nous avons donc essayé d'obtenir le Tris *N*-méthylé en suivant ce procédé simple de synthèse pour constater que l'amination réductive du formol n'avait pas abouti au résultat attendu (cf. figure 1.40). Nous avons en effet pu isoler, après cristallisation dans l'éthanol, 90 % de la quantité de Tris initialement mise en réaction.

Les recherches bibliographiques n'ont pas apporté d'informations suffisantes pour interpréter les raisons de ce manque de réactivité du Tris. Il est en effet très rare que la réaction ne puisse conduire au dérivé *N*-méthylé attendu. Le plus souvent l'échec se traduit par une forte production de produits secondaires tels que le dérivé formamide ou le produit issu de l'isomérisation ou de l'oxydoréduction puis de l'hydrolyse de la base de Schiff intermédiaire<sup>178</sup> (cf. figure 1.40).



**Figure 1.40 :** A/Echec de la tentative de *N*-méthylation du Tris via le procédé d'Eschweiler-Clarke<sup>176,177</sup>. B/Mécanisme des réactions secondaires compromettant l'aboutissement attendu de la réaction d'Eschweiler-Clarke, d'après Pine & Sanchez<sup>178</sup>. L'aldéhyde formé (ici le benzaldéhyde) peut de nouveau réagir avec le produit attendu de la réaction (la *N*-méthylbenzylamine) pour conduire à la *N*-méthyl-*N,N*-dibenzylamine.

Aucun de ces résultats bibliographiques ne semblait justifier le fait que la quasi-totalité du Tris de départ ait été récupéré en fin de réaction et trois hypothèses semblaient alors envisageables :

- soit l'imine ne se formait pas.
- soit l'amine réagissait pour donner un composé instable non réductible qui s'hydrolysait dans le milieu.

- soit l'imine se formait et le transfert d'hydrure était dans ce cas plus lent que la vitesse d'hydrolyse de l'imine. Cette dernière hypothèse semblait peu probable car dans ce cas nous allions à l'encontre des théories exposées dans la littérature<sup>179</sup>, l'étape lente correspondant à l'équilibre de formation de l'imine et non au transfert d'hydrogène.

Mais dans l'hypothèse extrême où effectivement le réducteur n'était pas assez réactif, nous avons envisagé d'utiliser des réducteurs tels que le cyanoborohydrure de sodium ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ), seul<sup>179,180</sup> ou associé au tétraisopropylate de titane IV ( $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$ )<sup>181</sup> ou encore le tétraborohydrure de sodium ( $\text{NaBH}_4$ )<sup>182</sup>, tous réputés efficaces dans les réactions d'amination réductive effectuées en phase organique comme en phase aqueuse.

Il était aussi théoriquement possible d'utiliser l'hydrogénation catalytique en présence de Nickel de Raney mais les borohydrures présentaient l'avantage d'être moins dangereux et plus efficaces.

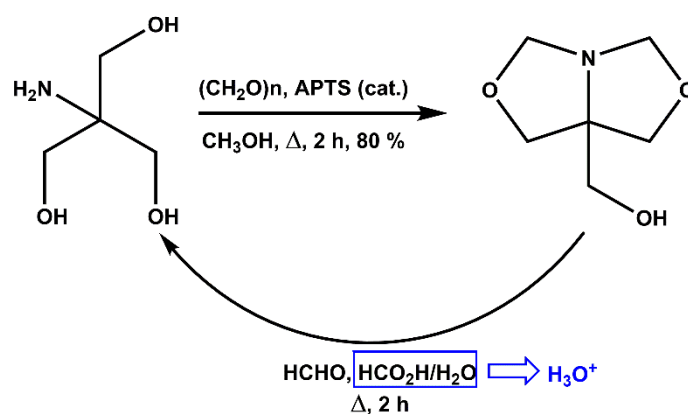
Afin de vérifier la validité de ces hypothèses, nous avons essayé de préparer et d'isoler l'imine intermédiaire.

La réaction a été effectuée dans un milieu anhydre en présence de faibles quantités de catalyseur acide. Ces deux précautions devaient limiter considérablement les risques d'hydrolyse de l'imine formée.

Nous avons donc traité le Tris par un excès de paraformaldéhyde dans le méthanol à ébullition en présence d'acide *para*-toluènesulfonique (APTS) en quantité catalytique. Cette réaction n'a pas conduit pas à l'imine attendue mais au dérivé 3,3-bicyclooxazolidine avec 80 % de rendement (cf. figure 1.41).

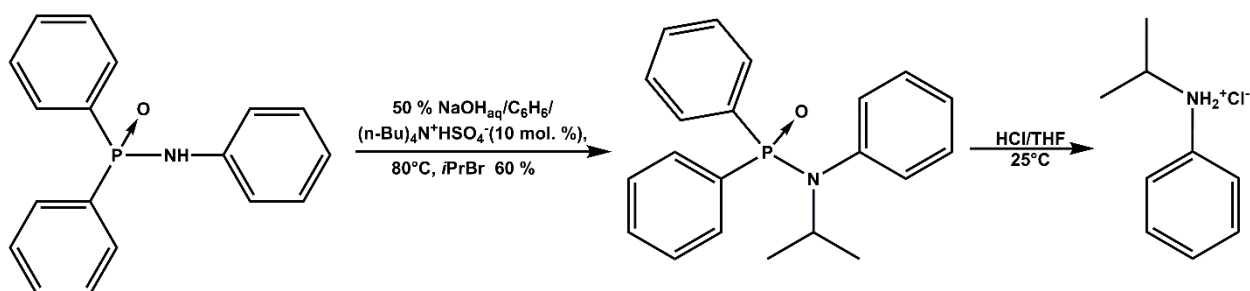
L'imine attendue ne pouvait donc être isolée car les fonctions hydroxyle du Tris réagissaient en présence de formaldéhyde pour former un dérivé bicyclique.

Ce résultat nous a permis d'interpréter l'absence apparente de réactivité du Tris observée dans les conditions des réactions de méthylation proposées par Eschweiler-Clarke<sup>176,177</sup>. Le Tris a réagi de façon à former exclusivement un dérivé bicyclique ne pouvant pas donner de réactions de type redox avec l'acide formique mais susceptible de s'hydrolyser rapidement en milieu acide pour régénérer le Tris de départ (cf. figure 1.41).



**Figure 1.41** : conversion du Tris en son dérivé 3,3-bicyclooxazolidine et hydrolyse de ce dernier dans les conditions du procédé Eschweiler-Clarke<sup>176,177</sup> conduisant au Tris initial.

Il faut noter ici qu'il était aussi envisageable d'introduire un groupement protecteur de la fonction amine de type phosphoninamide puis d'alkyler la fonction amide du composé obtenu. Ce procédé a été décrit dans la littérature<sup>183,184</sup> où l'alkylation est effectuée par catalyse de transfert de phase (cf. figure 1.42).



**Figure 1.42** : alkylation des amines sous leur forme phosphinamide, d'après Ślusarska & Zwierzak<sup>183,184</sup>. L'amine attendue est obtenue après protonolyse du *N*-alkylphosphinamide effectuée dans le THF.

Cette méthode, bien qu'intéressante, restait cependant difficilement applicable à la méthylation du Tris car la protection utilisée était introduite par action du chlorure de diphenylphosphinoxyde dont nous n'avons pas connaissance précise de la chimiosélectivité.

Nous ne pouvons prévoir s'il réagirait préférentiellement avec la fonction amine du Tris plutôt qu'avec les fonctions hydroxyle de ce dernier, et dans le doute, nous avons préféré orienter notre travail vers la synthèse et la réduction d'un dérivé formylamide du Tris.

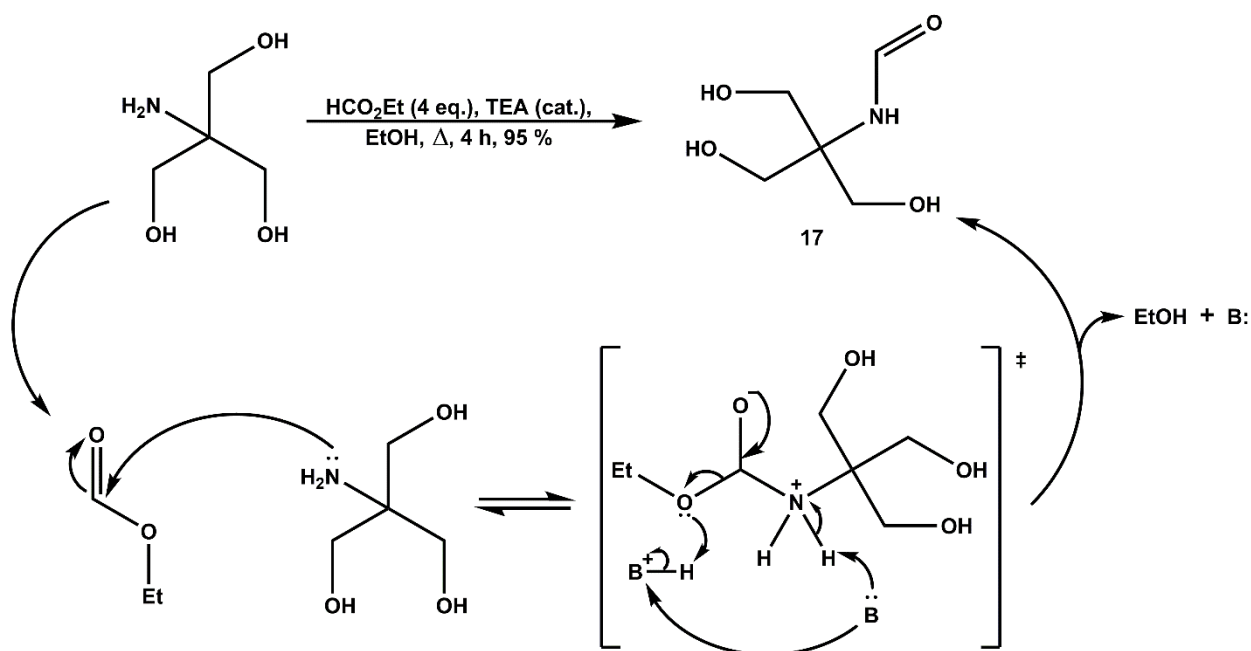


## 1.2) Formation et essais de réduction du Tris(hydroxyméthyl)formamidométhane **17**

### 1.2.1) Formation du Tris(hydroxyméthyl)formamidométhane **17**

Parmi les nombreuses méthodes de formylation des amines proposées dans la littérature<sup>154</sup>, la méthode d'aminolyse<sup>185</sup> est celle qui a retenu notre attention. Elle consiste à traiter une amine par un excès de formiate d'éthyle à chaud. Le procédé est simple et nous a permis de travailler dans des solvants polaires protiques tels que le méthanol ou l'éthanol solubilisant très bien le produit de départ et le produit final.

Le Tris(hydroxyméthyl)formamidométhane **17** a été obtenu avec un rendement de 95 % après aminolyse dans l'éthanol à reflux, en traitant le Tris par un excès de formiate d'éthyle en présence de TEA (cf. figure 1.43).



**Figure 1.43** : schéma de synthèse du composé **17** et mécanisme associé. Le groupement formyle a été sélectivement introduit sur la fonction amine indépendamment de la réactivité des fonctions hydroxyle dont l'intervention conduirait à un dérivé formiate aussitôt solvolysé pour régénérer les fonctions hydroxyle libres. L'intermédiaire réactionnel est, comme dans tous les cas de transestérification ou de transamidification, un dérivé orthoester (ou orthoamide suivant le cas) instable. La décomposition de cet intermédiaire réactionnel se fait de façon à libérer le meilleur groupement partant (le moins basique) et donc l'alcoolate. La liaison amide étant plus solide que la liaison ester, l'amide obtenu est stable dans les conditions opératoires et l'équilibre est ainsi déplacé. Le catalyseur basique ( $\text{B}$ ) n'a pas été formellement identifié sur le schéma car la TEA comme le Tris peuvent intervenir en tant que base dans la réaction.

### 1.2.2) Réduction du Tris(hydroxyméthyl)formamidométhane **17**

Le Tris(hydroxyméthyl)formamidométhane est une molécule très polaire qui n'est soluble que dans des solvants polaires : eau, méthanol, DMF, DMSO....Le choix d'agents réducteurs efficaces avec lesquels le solvant utilisé ne réagirait pas, se révélait de ce fait limité.

En effet, des agents réducteurs tels que l'hydrure d'aluminium lithium ( $\text{LiAlH}_4$ ) ou l'hydroborane ( $\text{BH}_3$ )<sup>186,187</sup> connus pour réduire efficacement les amides sont détruits en milieu protique (méthanol, éthanol) et perdent leur réactivité. Ces mêmes substrats réagiraient avec le DMF pour réduire celui-ci en triméthylamine et avec le DMSO pour conduire à la formation de sulfure de méthyle.

Les acides carboxyliques et leurs dérivés esters et amides pouvaient être réduits dans le DMSO en présence de borohydrure de sodium et d'acide méthanesulfonique<sup>186</sup>.

Il était aussi possible de réduire un grand nombre d'amides (excepté les  $\gamma$  lactames) en amines en ajoutant du méthanol goutte à goutte au mélange amide-borohydrure dissous dans le *tertio*-butanol à reflux<sup>187</sup>.

Différentes lactames ( $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ ) ont également été réduites en amines par action du sodium<sup>188</sup> dans le butanol (ou l'isopropanol) à reflux.

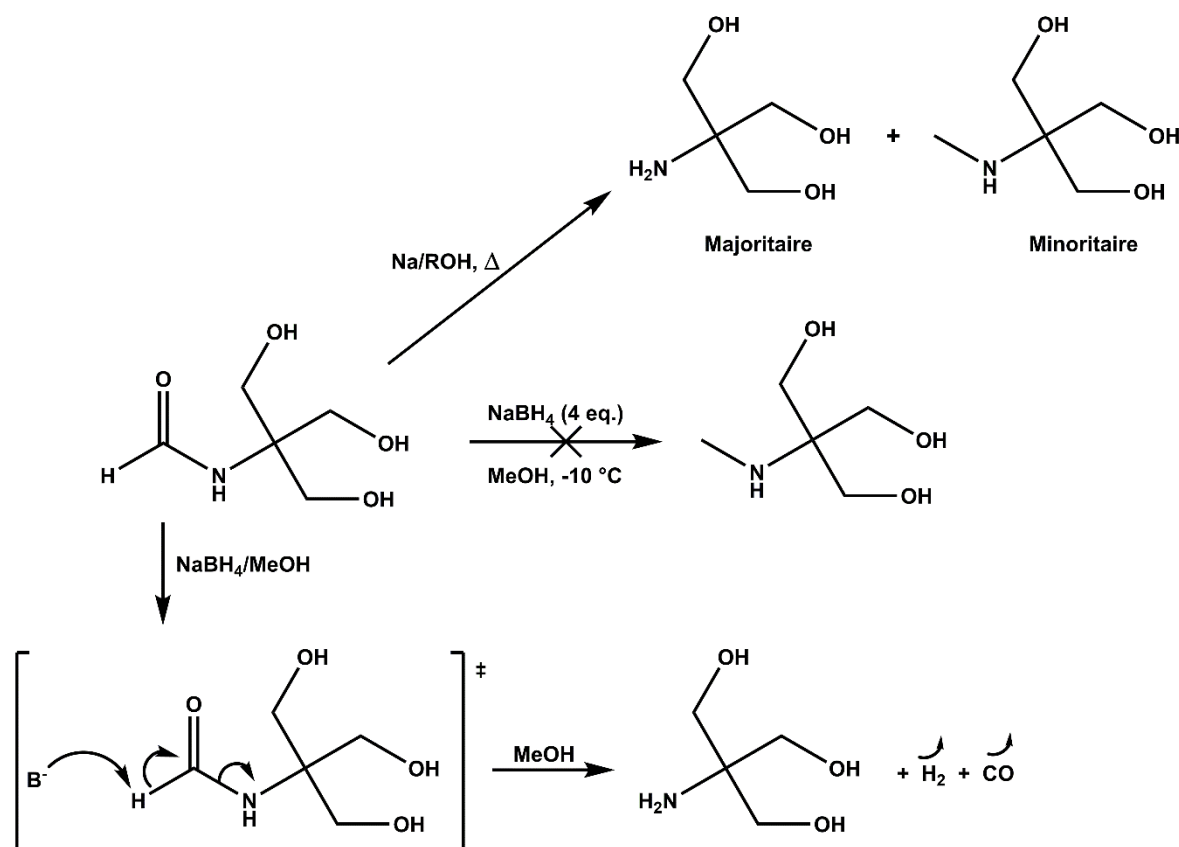
Enfin des amides, nitriles et dérivés nitro pouvaient être réduits en amines par action du système borohydrure de sodium-sels de métaux de transition<sup>189</sup> (chlorure de cobalt), dans des solvants tels que le méthanol ou l'éthanol.

Des quatre méthodes évoquées, la dernière semblait la plus appropriée mais elle était onéreuse car les sels de métaux de transition étaient utilisés en excès (2 équivalents). La première, quant à elle, présentait l'inconvénient d'utiliser le DMSO que nous n'aurions pu facilement séparé du produit final, l'amine théoriquement obtenue étant soluble en phase aqueuse.

Nous avons donc essayé de réduire le composé **17** dans le méthanol par action du borohydrure de sodium. La réaction a été réalisée dans le méthanol à froid ( $-10^\circ\text{C}$ ) en ajoutant l'agent réducteur par petites portions. Il s'est produit un dégagement gazeux important correspondant à la formation du monoxyde de carbone issu de la dégradation du formamide et non de sa réduction (cf. figure 1.44).

Le taux de conversion en Tris avoisinait les 100 %. Il faut remarquer ici que la dégradation des formates en milieu basique est un phénomène connu qui a été exploité en synthèse organique et industrielle<sup>190</sup>.

Le même problème a été rencontré en traitant l'amide par un excès de sodium dans un solvant alcoolique porté à ébullition. Cependant, dans ces conditions, après neutralisation, filtration et précipitation des sels, nous avons procédé à une analyse RMN <sup>1</sup>H du milieu réactionnel.



**Figure 1.44 :** échec total (traitement par  $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$  à froid) ou partiel (traitement  $\text{Na/EtOH}$  à chaud) de la tentative de réduction du composé **17** et mécanisme proposé. La base ( $\text{B}^-$ ) est ici soit un hydrure soit un alcoolate.

Celle-ci a révélé que nous avons obtenu un mélange de produits parmi lesquels le Tris semblait être le prédominant, mais la présence d'un singulet à 2.6 ppm dans  $\text{D}_2\text{O}$ , représentatif certainement d'un groupement aminométhyle, montrait que le substrat attendu était aussi présent en faible quantité (cf. figure 1.44).

Le traitement au sodium en milieu alcoolique pouvait certainement présenter un intérêt pour la réduction d'un dérivé amide du Tris plus stable, tel qu'un acétamide par exemple.

Cette succession d'échecs nous a amenés à protéger les fonctions alcool du formamide de façon à obtenir un dérivé soluble en phase organique et de ce fait, pouvoir utiliser des agents réducteurs efficaces n'engendrant pas des réactions parasites d'élimination (cf. figure 1.45).



**Figure 1.45** : nouvelle stratégie envisagée pour la réduction du composé **17** ; a) protection des fonctions alcool, b) réduction du formamide et c) déprotection des hydroxyles.

### 1.3) Formation et réduction des dérivés du Tris-(hydroxyméthyl)formamidométhane

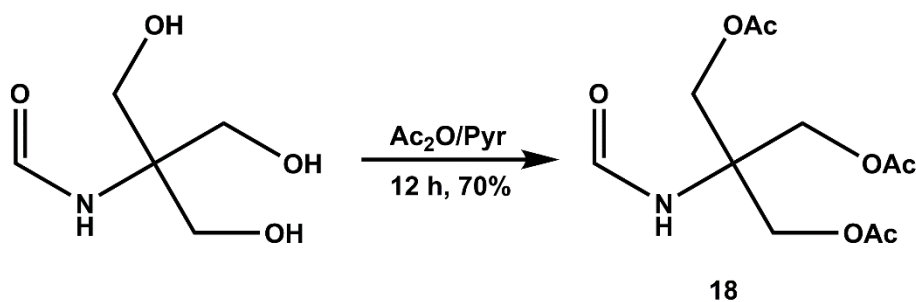
Les fonctions hydroxyle du composé **17** ont alors été protégées afin d'obtenir un dérivé organosoluble (soluble dans l'éther ou le THF). Nous avons testé différents types de protection afin de trouver la meilleure voie d'accès à la *N*-méthylamine recherchée.

#### 1.3.1) *Formation des dérivés du composé **17***

Les résultats précédemment obtenus nous ont encouragé à avoir recours aux mêmes types de protection que ceux utilisés pour la synthèse des dérivés du THAM. Comme nous l'avons vu, ces protections qui sont des acétyles, des cétales et acétals ont été aisément introduites sur les fonctions hydroxyle en faisant intervenir des réactions simples. Ces différents procédés de protection ont donc été appliqués au composé **17**.

##### 1.3.1.1) Synthèse du tris(acétoxyméthyl)formamidométhane **18**

L'acétylation du composé **17** a été effectuée dans le mélange anhydre acétique/pyridine 1/1 et a conduit au dérivé triacétylé **18** avec 75 % de rendement (cf. figure 1.46).



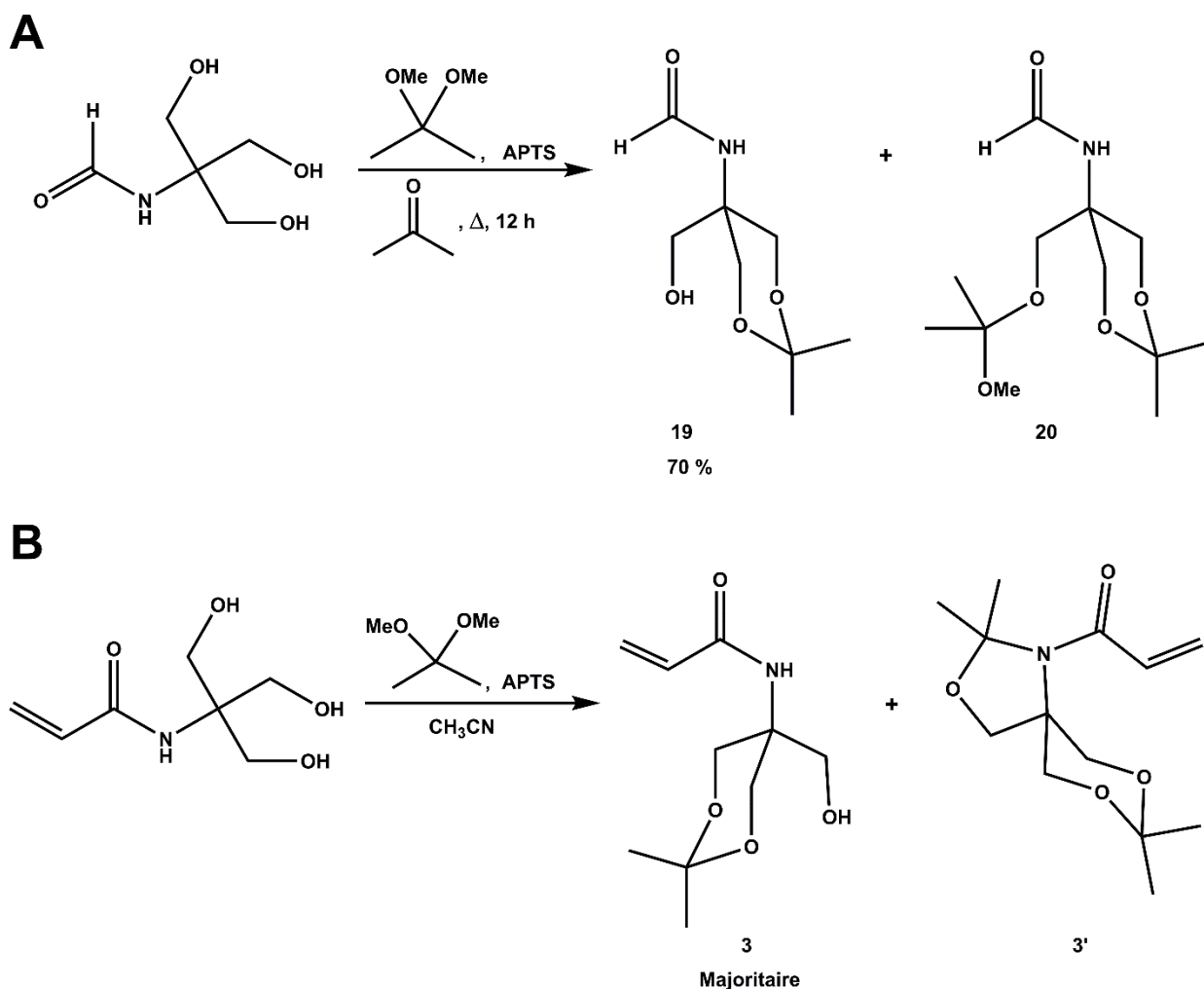
**Figure 1.46** : schéma de synthèse du composé **18**.

Le composé **18** s'est révélé parfaitement hydrophobe et soluble dans la plupart des solvants organiques excepté l'hexane.

### 1.3.1.2) Synthèse du 2,2-diméthyl-5-formylamido-5-hydroxyméthyl-1,3-dioxane **19**

Les conditions expérimentales précédemment employées pour la synthèse du THAM isopropylidène **3** se sont révélées inadaptées à la formation du composé **19** attendu. Le composé **19** a pu être préparé en solubilisant le Tris formamide et une quantité catalytique d'APTS dans un mélange acétone/diméthoxypropane 4/1 porté à ébullition.

La réaction a conduit à la formation du composé **19** avec un rendement de 70 % et d'un sous-produit **20**. Les deux composés ont pu être isolés et caractérisés. Le produit **20** était très probablement issu de la réaction de la fonction hydroxyle du composé **19** sur le diméthoxypropane en excès (cf. figure 1.47A).



**Figure 1.47** : A/Schéma de synthèse du composé **19** et formation du sous-produit **20**. B/Schéma de synthèse du THAM isopropylidène **3** et formation du sous-produit **3'**.

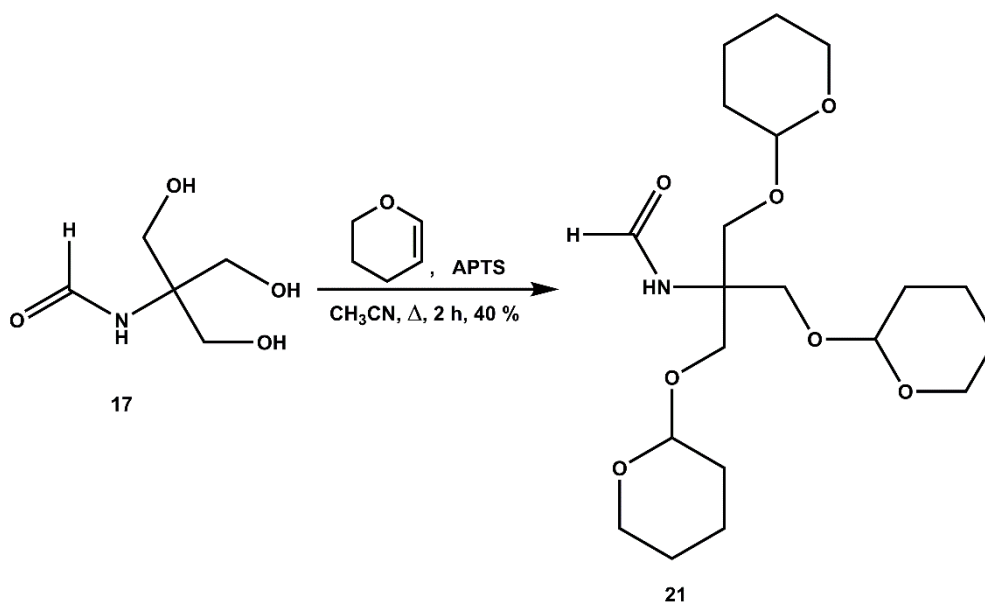
Ce type de réaction a également pu être observé lors de l'acétonisation du THAM. A. Polidori<sup>191</sup> a en effet montré qu'en utilisant un large excès de diméthoxypropane on peut obtenir en quantité non négligeable une oxazolidine **3'** issue de la réaction de la fonction amide et de la fonction alcool sur le diméthyl acétal (cf. figure 1.47B).

Nous avons pu constater que le composé **19** était soluble en phase organique et en phase aqueuse alors que le composé **20** n'était soluble que dans les solvants organiques. Le sous-produit **20** présentait donc les propriétés d'hydrophobie recherchées mais en dépit de différentes tentatives nous ne sommes pas parvenus à orienter la réaction vers la formation préférentielle de ce dernier.

Nous disposions déjà de 2 types de substrats hydrophobes nous permettant d'envisager la réduction du groupe formamide dans des solvants organiques classiques, mais dans un soucis d'anticipation, nous avons également procédé à la préparation des dérivés tétrahydropyranylés et tritylés.

### 1.3.1.3 Synthèse du tris(tétrahydropyranyloxyméthyl)formamidométhane **21**

Le dérivé tritétrahydropyranylé **21** a été obtenu en traitant le composé **17** par un excès important de DHP (4 équivalents) dans l'acétonitrile porté à ébullition.



**Figure 1.48** : schéma de synthèse du composé **21**.

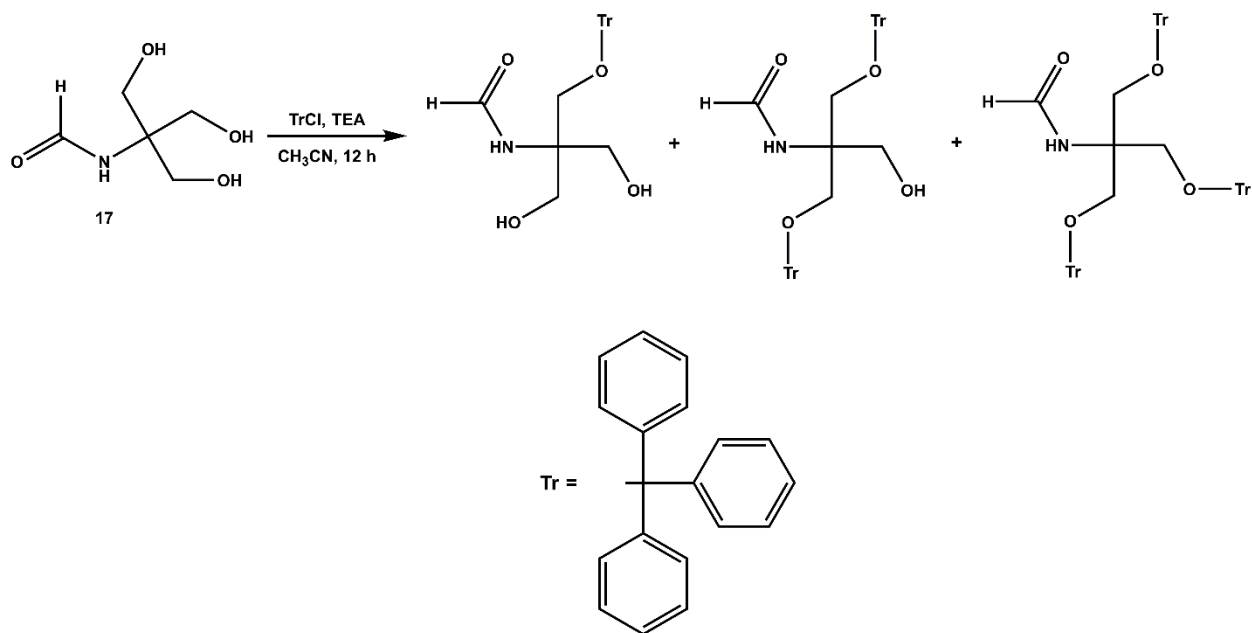
La formation du dérivé protégé s'est avéré peu sélective et a conduit à un mélange de produits. Le composé **21** a été isolé avec 40 % de rendement après purification sur colonne de silice.

L'instabilité de ce produit était observable sur plusieurs semaines, celui-ci se dégradant au cours du temps.

#### 1.3.1.4) Formation d'un dérivé tritritylé

La réaction de tritylation a consisté à traiter le composé **17** par un excès de TEA et de chlorure de trityle dans l'acétonitrile à température ambiante.

Ce procédé a conduit à un mélange de produits (vérifié par RMN et CCM) que nous n'avons pas isolés. Nous avons considéré qu'une fois la totalité du produit de départ solubilisée dans le solvant, une très grande partie du composé **17** avait réagi pour former un dérivé mono-, di- ou tritritylé (cf. figure 1.49). Ces trois composés organosolubles pouvaient dès lors subir les réactions de réduction pour conduire, après hydrolyse au Tris *N*-méthylé recherché.



**Figure 1.49** : schéma de synthèse des dérivés tritrylés du composé **17**.

Les différentes expériences décrites dans cette partie du manuscrit, ont montré qu'il était difficile de protéger quantitativement les trois fonctions alcool du Tris(hydroxyméthyl)-formamidométhane **17** lorsque la réaction impliquait des groupements protecteurs autres que les acétyles.

Cependant, cette réactivité particulière n'était pas un véritable problème dès l'instant où l'on considèrait que le groupement protecteur utilisé était seulement temporaire et permettait

uniquement de disposer d'un produit soluble en phase organique indépendamment du nombre de fonctions alcool protégées (une, deux ou trois).

Nous pouvions dès lors éviter l'étape de purification des différents substrats mono, di ou tri fonctionnalisés et nous contenter de lancer la réaction de réduction sur le mélange réactionnel, pour obtenir ainsi un mélange d'amine qui serait ensuite hydrolysé pour régénérer les fonctions hydroxyle et former le Tris *N*-méthylé.

Ainsi, nous pouvions disposer d'une méthode de réduction avec des rendements améliorés car les trois étapes étaient alors réalisées successivement sans effectuer de purifications des intermédiaires. Si nécessaire cependant, comme indiqué plus loin dans ce manuscrit, les différents produits ont pu être aisément isolés et purifiés.

### 1.3.2) Réduction des dérivés du composé 17

Le réactif le plus souvent utilisé pour réduire un amide est l'hydrure d'aluminium lithium ( $\text{LiAlH}_4$ ) qui est un agent réducteur très réactif. Cependant, en raison des faibles vitesses de réaction observées dans le cas des amides et des problèmes de réactions secondaires<sup>192</sup> telles que la coupure de la liaison C-N se produisant en présence d'un tel réactif, plusieurs auteurs ont élaboré de nouvelles techniques de réduction des amides.

Le diborane a donné de bons résultats<sup>192,193</sup>, ce réactif pouvant réduire tous les dérivés des acides carboxyliques dans d'excellentes conditions. Les réactions sont rapides et très sélectives, pratiquement aucune réaction secondaire n'est observée. La vitesse de réaction augmente avec le degré de substitution de l'azote et dans le cas des lactames tertiaires la réaction est si rapide qu'il est possible de réduire la liaison amide de la 1-benzyl-3-méthoxycarbonyl-5-pyrrolidinone<sup>192</sup> sans affecter la fonction ester (cf. figure 1.50A).

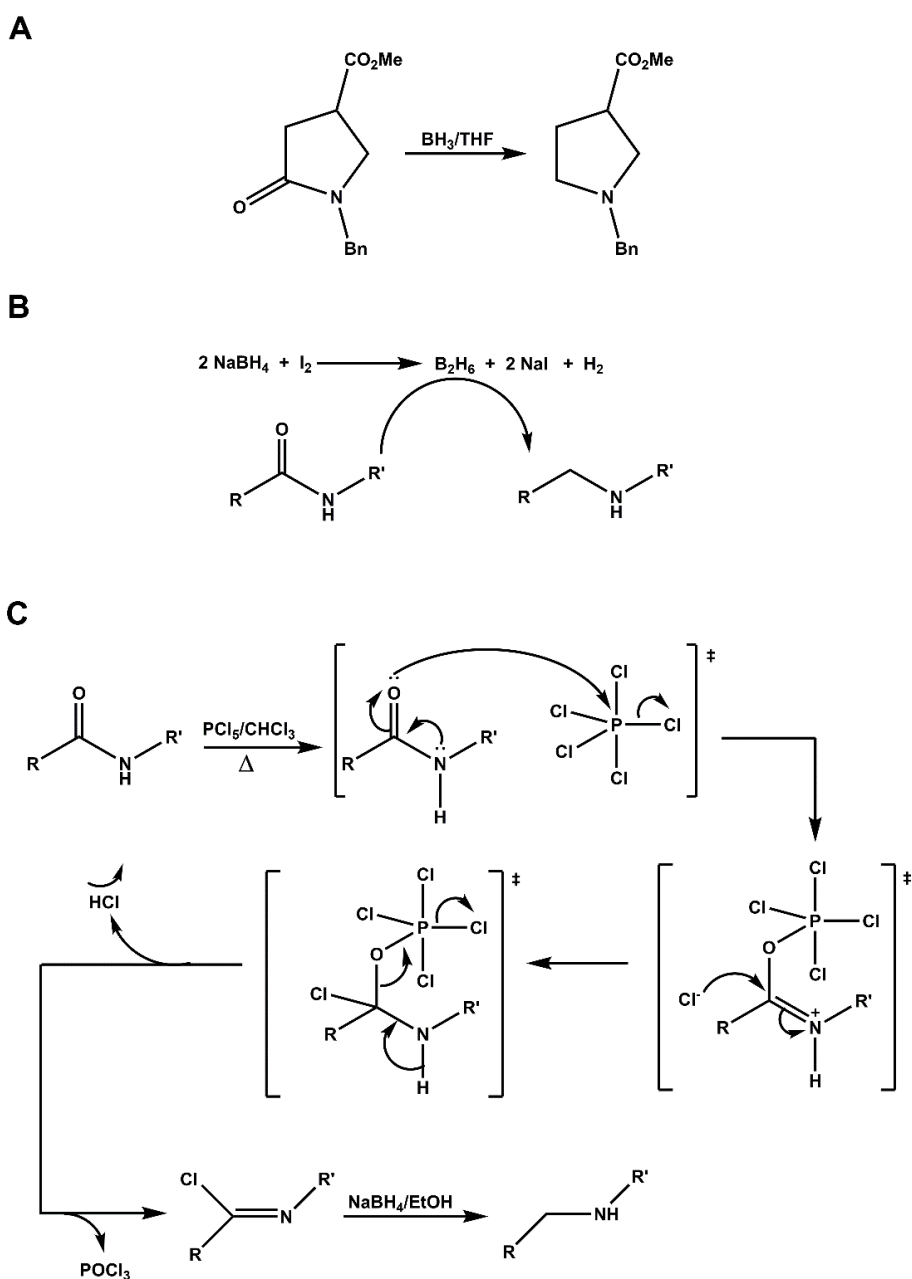
Le diborane est commercial mais peut être fabriqué *in situ*<sup>193</sup> par action du borohydrure de sodium sur l'iode. Cette méthode moderne est cependant plus délicate, la réaction se faisant sous atmosphère inerte et dans des conditions parfaitement anhydres (cf. figure 1.50B).

D'autres auteurs préconisent l'utilisation de borohydrure de sodium en présence d'acide de Lewis ( $\text{BF}_3$  ou  $\text{AlCl}_3$ ) ou de sels de métaux de transition<sup>189</sup>, de pentachlorure de phosphore ( $\text{PCl}_5$ )<sup>194</sup> ou de chlorure de phosphoryle ( $\text{POCl}_3$ )<sup>195</sup>. De tels réactifs permettent la transformation



d'un amide en immonium ou en chlorimidate qui sont des intermédiaires réactionnels pouvant être réduits par le borohydrure de sodium (cf. figure 1.50C).

Enfin, la désulfurisation des thioamides catalysée par le Nickel de Raney est une méthode qui a fait ses preuves<sup>196</sup>, s'étant révélée beaucoup plus douce et plus efficace qu'une réaction d'hydrogénation catalytique.



**Figure 1.50** : différentes méthodes de réduction des amides en amines. A/Utilisation du borane commercial<sup>192</sup>. B/Génération du diborane *in-situ*<sup>193</sup>. C/Conversion de l'amide en chlorimidate et réduction en amine<sup>194</sup>. N. B. : le traitement d'un amide par le pentachlorure de phosphore ou le chlorure de phosphoryle conduit à la formation d'un chlorimidate. Ce dérivé susceptible de réagir avec un électrophile est l'intermédiaire réactionnel clé du procédé de Vilsmeier.

Nous disposions donc d'un choix relativement important de réducteur mais la nature des protections des fonctions hydroxyle du Tris nous imposait certaines restrictions.

Il était en effet difficilement envisageable de réduire les composés protégés par des groupements sensibles aux acides avec le couple  $\text{NaBH}_4$  (ou  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ )/Acide de Lewis ou encore de réduire le dérivé triacétylé avec le diborane ou l'hydrure d'aluminium lithium. De plus, nous avons envisagé de synthétiser par la suite une quantité importante de produit, nous avons donc limité le coût de la synthèse en choisissant des réactifs dont le prix restait peu élevé.

### 1.3.2.1) Réduction du composé **18**

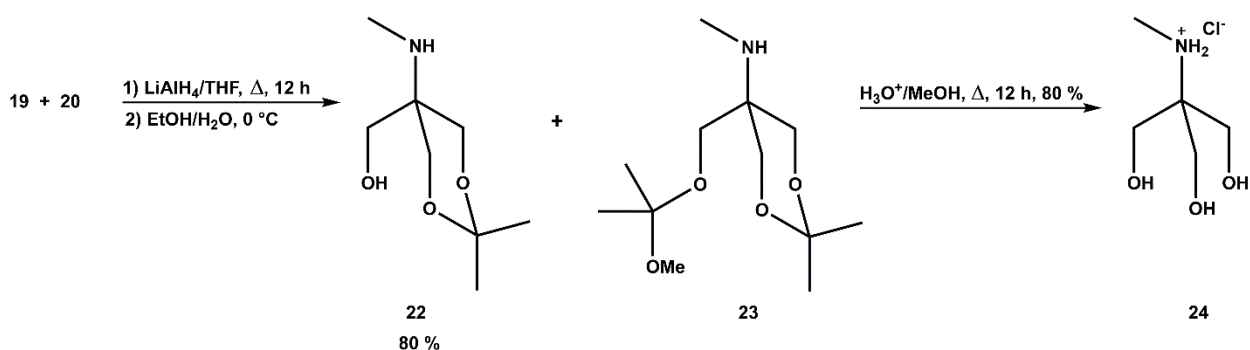
Nous avons dû utiliser une méthode de réduction qui permettait de conserver les protections acétyles dans leur intégralité. La technique consistant à réduire un complexe de Vilsmeier et celle permettant la réduction d'un amide par un borohydrure en présence d'acide de Lewis semblaient les mieux adaptées au type de protection mise en jeu.

La méthode au complexe de Vilsmeier s'étant avérée totalement inefficace avec nos produits, nous avons réalisé les réductions suivantes avec l'hydrure d'aluminium lithium qui nous a permis d'obtenir des résultats très convenables.

### 1.3.2.2) Réduction du composé **19**

La réduction du composé **19** purifié par cristallisation ou la réduction du mélange **19** + **20** ont été effectuées dans le THF en présence d'un excès d'hydrure d'aluminium lithium (cf. figure 1.51).

A partir du composé **19** pur, l'amine **22** a été obtenue après recristallisation dans le cyclohexane avec un rendement de 80 %.



**Figure 1.51** : schéma de synthèse des composés **22**, **23** et **24**.

La réduction a été effectuée également dans d'excellentes conditions avec le mélange **19** + **20**. En effet, alors que l'amine **22** recristallisait dans le cyclohexane comme précisé précédemment, le sous-produit **23**, restait soluble dans ce solvant, ce qui a favorisé ainsi l'emploi du mélange et nous a permis de nous affranchir de l'étape de purification du substrat **19**.

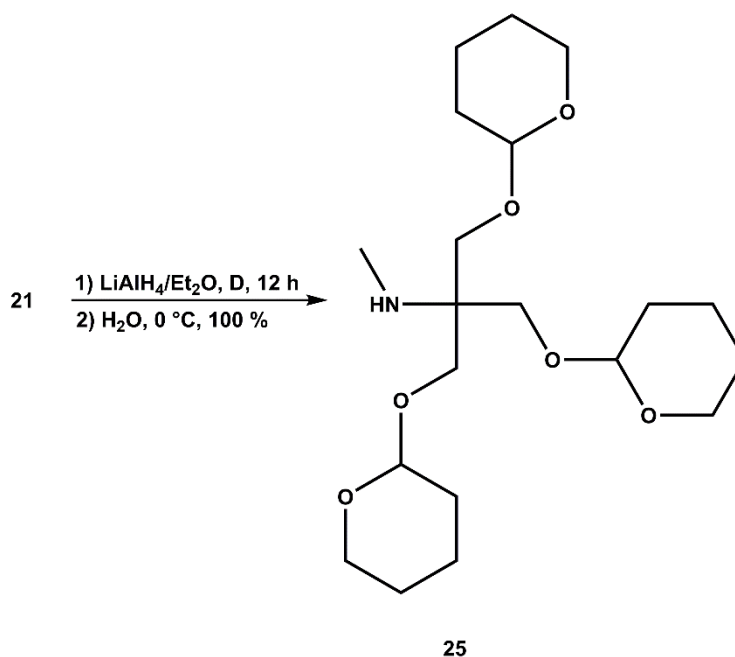
L'amine **23** récupérée dans le filtrat de recristallisation après évaporation de celui-ci, a été déprotégé dans le mélange MeOH/HCl<sub>aq</sub> 3N 1/1 porté à reflux durant 12 h pour conduire au chlorhydrate du Tris *N*-méthylé **24** obtenu pur après cristallisation dans l'éthanol. Ce même composé a pu être obtenu avec un rendement de 80 %, en traitant dans les mêmes conditions de déprotection le mélange d'amines **22** + **23** (cf. figure 1.51).

Ainsi, nous pouvions disposer soit d'une amine soluble dans les solvants organiques (composé **23**), soit directement du chlorhydrate du dérivé *N*-méthylé du Tris **24**.

Il faut noter ici la stabilité inattendue des protections cétal dont l'hydrolyse a requis des conditions relativement drastiques.

### 1.3.2.3) Réduction des dérivés *O*-tétrahydropyranylés

Le composé tétrahydropyranylé **21** a été réduit par action de l'hydrure d'aluminium lithium dans l'éther à reflux. L'amine **25** a été obtenue dans ce cas avec un rendement de 100 %. (cf. figure 1.52).



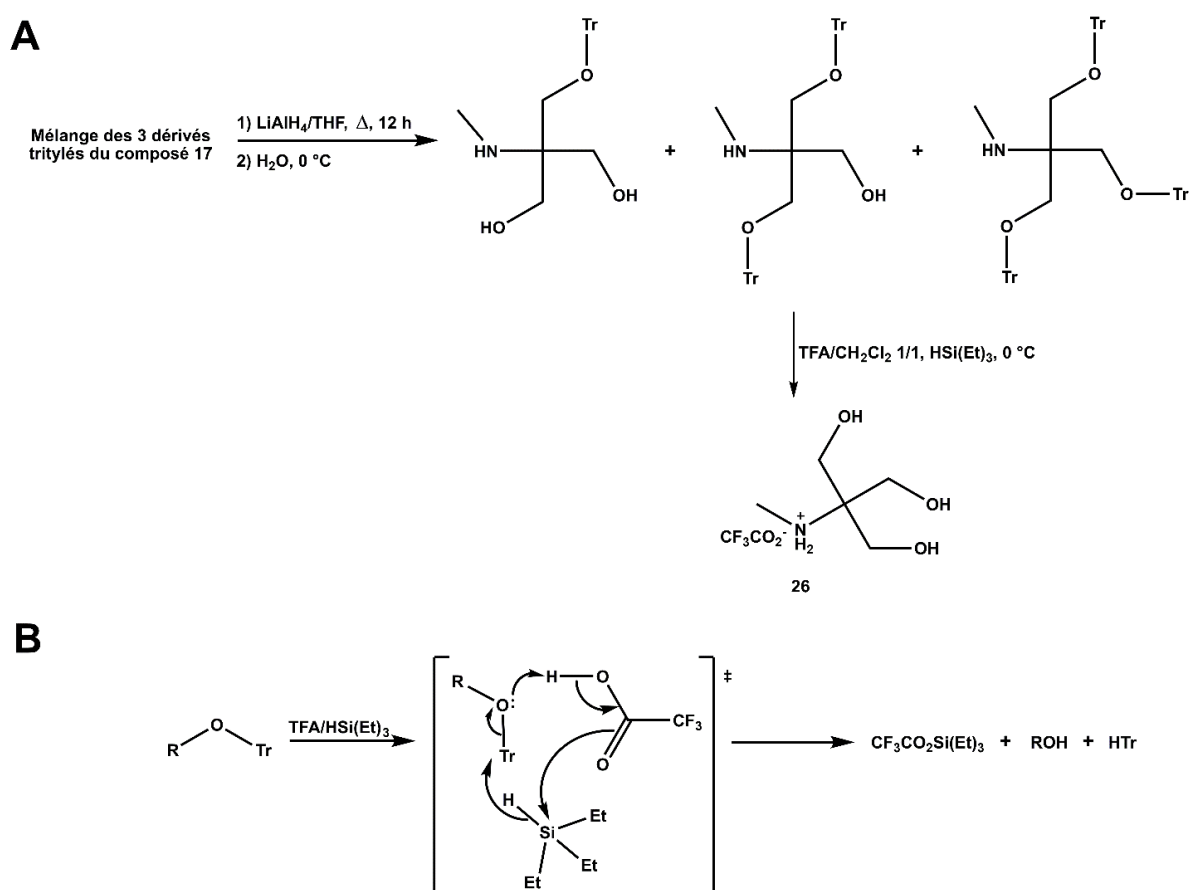
**Figure 1.52** : schéma de synthèse du composé **25**.

Nous avons pu effectuer la même réaction, sans procéder préalablement à la purification du composé **21**, sur le brut issu de la réaction de tétrahydropyranylation des fonctions hydroxyle du composé **17**. Nous avons obtenu un mélange d'amines (mono, di ou tri tétrahydropyranylés) (cf. 1.3.1.3).

Les amines ont été conservées sous leur forme protégée car nous ne sommes pas parvenus, après hydrolyse acide, à isoler le sel d'ammonium **24** (cf. figure 1.51).

#### 1.3.2.4) Réduction des dérivés tritylés

Nous avons effectué la réaction de réduction du mélange de composés tritylés en présence d'hydruure d'aluminium lithium dans le THF à ébullition. Le mélange d'amines obtenu a été soumis, sans purification, au processus de déprotection (cf. figure 1.53A).



**Figure 1.53** : **A**/Schéma de synthèse du composé **26**. La formation du sel de triflate consomme un équivalent d'acide et est particulièrement exothermique. La réaction est donc effectuée à basse température. **B**/Mécanisme impliqué dans la déprotection des éthers de trityle. L'acide protone l'éther tritylique et entraîne la libération du carbocation triphénylcarbonium qui est piégé par un ion hydruure cédé par le triéthylsilane, ce dernier réagissant avec le triflate. Il se forme ainsi du triphényl méthane, un ester silylé et l'alcool déprotégé.

La méthode de déprotection utilisée était une méthode relativement récente<sup>197</sup> et consistait à traiter un dérivé tritylé par un mélange dichlorométhane/acide trifluoroacétique 1/1 en présence de triéthylsilane (cf. figure 1.53B). Ces conditions expérimentales ont été appliquées au mélange d'amines tritylées, et le sel de triflate **26** du Tris *N*-méthylé a pu être obtenu dans de bonnes conditions (rendement global de 60% à partir du composé **17**) (cf. figure 1.53A).

Nous étions donc parvenus à synthétiser plusieurs dérivés du Tris *N*-méthylé avec des rendements convenables et nous disposions de formes solubles en phase organique (**22**, **23** et **25**) et de formes déprotégées hydrosolubles (**24** et **26**). Nous avons donc par la suite procédé à la *N*-acryloylation de chacun de ces composés pour obtenir le THAM *N*-méthylé ou un de ses dérivés.

## 2) Condensation d'un groupement acryloyle sur le *N*-méthyl TRIS et ses dérivés

### 2.1) Essais de synthèse du tris(hydroxyméthyl)-*N*-méthylacrylamidométhane

Dans une première approche, un excès de chlorure d'acryloyle a été condensé sur le Tris *N*-méthylé dissous dans du méthanol anhydre à basse température en présence de potasse méthanolique. La réaction effectuée avec les dérivés *N*-méthylés **24** ou **26** dans ces conditions s'est soldée par un échec.

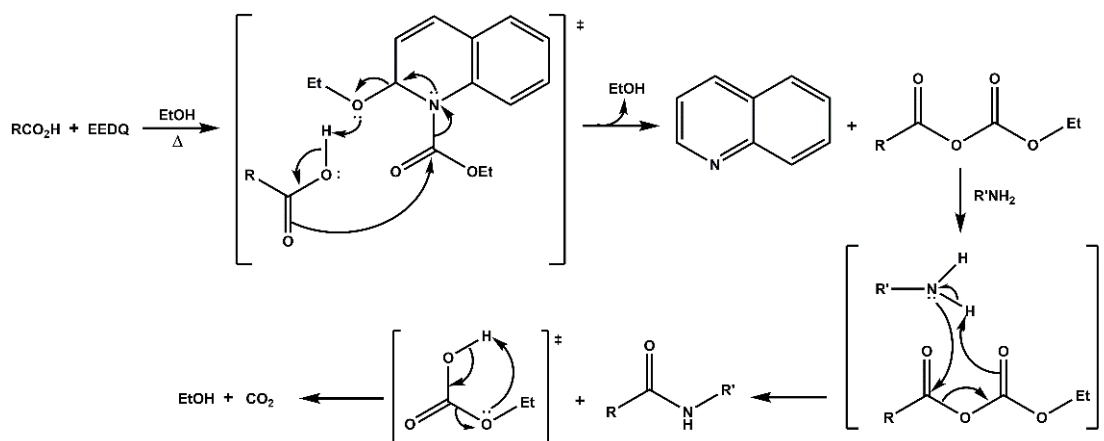
Le même type de réaction a été reproduit dans l'eau selon la technique de Schotten-Baumann mais sans plus de succès.

Nous avons imputé ces échecs au probable encombrement de l'amine secondaire dont la réactivité était diminuée, laissant ainsi le chlorure d'acryloyle réagir essentiellement avec le solvant (méthanol ou eau) pour donner des produits de solvolysse (acrylate de méthyle ou acide acrylique).

Nous avons aussi tenté de coupler l'amine à l'acide acrylique en utilisant le 2-éthoxy-1-éthoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoléine (EEDQ)<sup>198</sup> dans l'éthanol à reflux (cf. figure 1.54).

Cette technique pourtant connue pour être efficace et sélective<sup>198,199</sup> s'est également soldée par un échec. Le THAM *N*-méthylé n'a pu être isolé.

Dans de telles conditions, il nous a paru préférable de travailler avec une amine dont les fonctions hydroxyle étaient protégées afin d'autoriser la réaction de condensation dans un solvant organique apolaire et inerte.



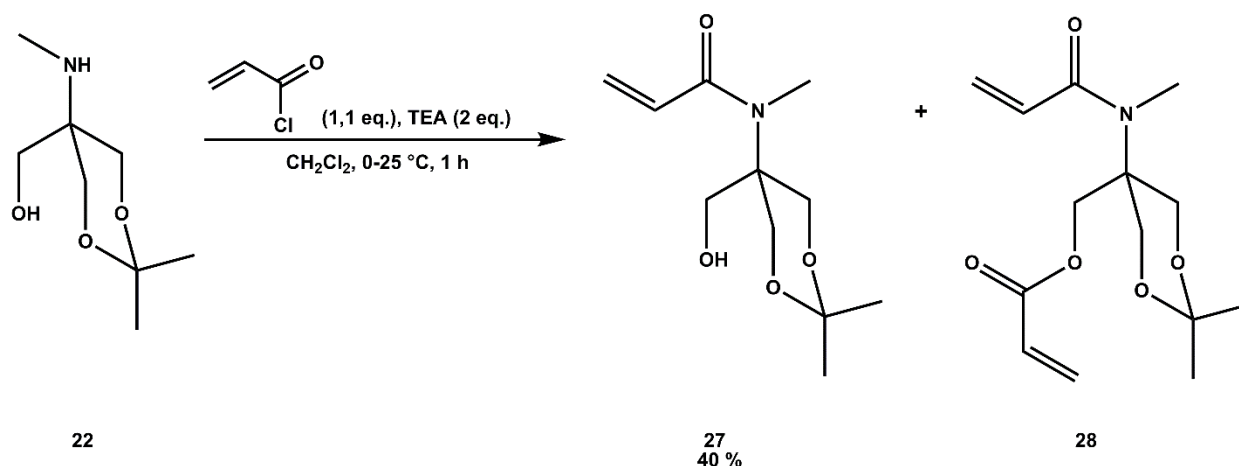
**Figure 1.54** : mécanisme impliqué dans le couplage peptidique effectué en présence d'EEDQ à chaud. L'EEDQ réagit sélectivement avec l'acide pour former un anhydride mixte sur lequel va se condenser la fonction amine. La fonction amine réagit sélectivement sur le carboxylate car plus électrophile que le carbonate (mésomérie plus importante sur cette fonction). L'aromatisation du cycle (formation de quinoléine) et, dans une moindre mesure, la libération de dioxyde de carbone, sont les forces motrices de la réaction.

## 2.2) Synthèse du THAM isopropylidène *N*-méthylé **27**

Comme reporté (cf. section précédente) pour les premiers essais effectués à partir du Tris *N*-méthylé, les tentatives de condensation du chlorure d'acryloyle sur le Tris isopropylidène *N*-méthylé **22**, effectuées dans le méthanol se sont soldées par des échecs.

De premiers résultats encourageants ont pu cependant être obtenus dans le dichlorométhane en présence de TEA. Le THAM isopropylidène *N*-méthylé **27** a été isolé avec un rendement de 40 % après chromatographie sur colonne de silice et cristallisation dans l'éther. Nous avons pu isoler et caractériser le sous-produit de dicondensation **28** (cf. figure 1.55).

Les structures de **27** et **28** ont été confirmées par RMN <sup>1</sup>H dont les spectres montraient un singulet à 3 ppm (CH<sub>3</sub>-N) et trois protons acryliques supplémentaires pour **28** à 6,35 ppm, 6,12 ppm et 5,85 ppm. Le fait que nous avons obtenu le produit secondaire **28** montrait que l'amine secondaire présentait une réactivité comparable à celle d'une fonction alcool primaire.



**Figure 1.55** : schéma de synthèse du THAM isopropylidène *N*-méthylé **27** et formation du produit secondaire **28**.

Dans l'objectif d'augmenter le rendement de la réaction, le produit **28** a été traité par du méthanolate de sodium en quantité catalytique dans le méthanol afin de déprotéger la fonction alcool estérifiée.

Après 12 h d'agitation le produit **28** a été totalement dégradé pour régénérer le Tris *N*-méthylé. Il semblait que la liaison amide se soit dégradée en subissant elle aussi une réaction de méthanolyse. La liaison amide formée se révélait donc particulièrement fragile, ce qui expliquait d'ailleurs les échecs rencontrés dans le cadre de nos premiers essais de synthèse du THAM *N*-méthylé dans la potasse méthanolique.

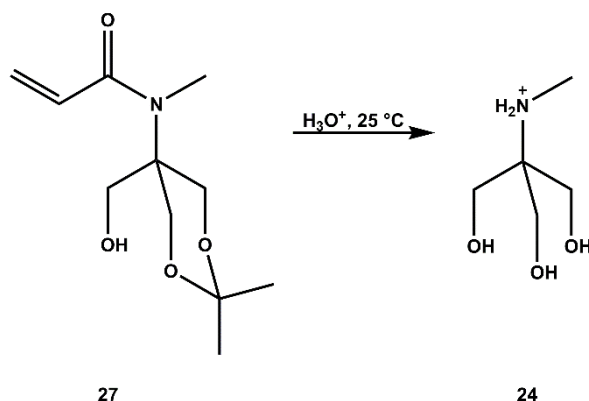
Par ailleurs, ce résultat et cette observation nous interdisaient l'utilisation des dérivés acétylés du Tris *N*-méthylé dont la solvolysse finale des groupements acétyl aurait été effectuée par réaction de transestérification.

Cette voie de synthèse nous a permis cependant d'accéder à un homologue *N*-alkylé du THAM isopropylidène **3**, monomère dont la réactivité avait déjà été évaluée. Il était donc intéressant de comparer la vitesse de polymérisation du monomère **27** à celle du monomère **3**.

Enfin, une simple hydrolyse acide de la fonction cétal de ce monomère devrait conduire au THAM *N*-méthyl recherché.

En fait, l'hydrolyse acide, dans un mélange acide acétique/eau à température ambiante de la fonction cétal s'est révélée inefficace pour cliver la liaison C-O devenue particulièrement résistante. Des conditions un peu plus drastiques (AcOH/H<sub>2</sub>O 8/2, 50 °C ou HCl 1N à la température ambiante) ont provoqué la dégradation du cétal mais aussi celle de la liaison amide.

Le chlorhydrate **24** a ainsi été isolé du milieu réactionnel ce qui montrait que la liaison amide était aussi instable en milieu acide (cf. figure 1.56).

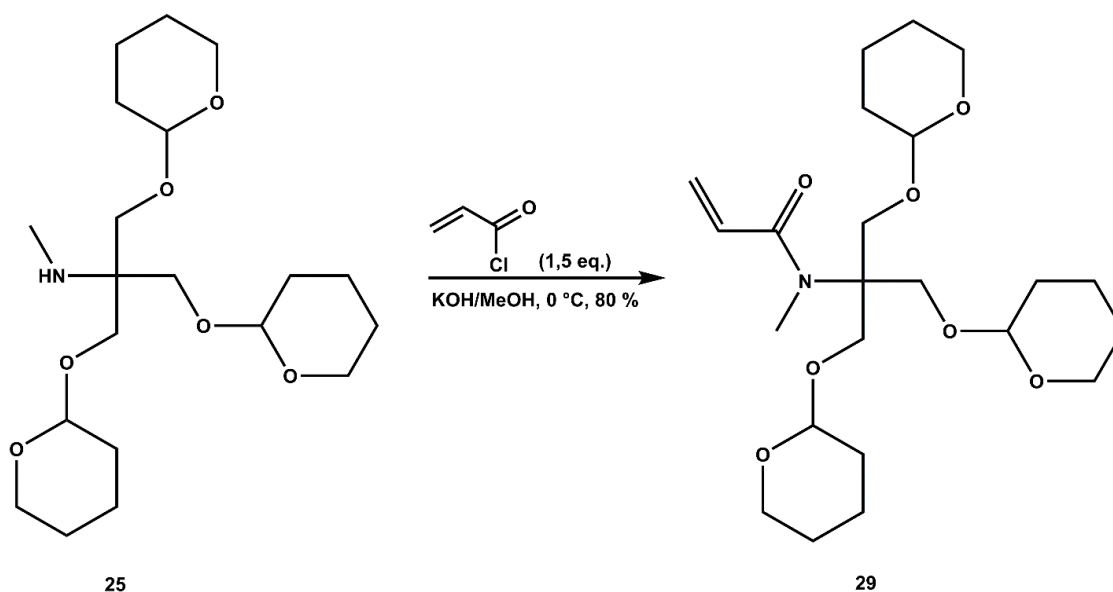


**Figure 1.56** : hydrolyse totale du THAM isopropylidène *N*-méthylé **27** et reformation du Tris *N*-méthylé **24**.

Compte tenu de cette succession d'échecs, il semblait peu envisageable de pouvoir accéder au THAM *N*-méthylé mais nous avons, par principe, effectué un dernier essai avec les dérivés *O*-tétrahydropyranylés.

### 2.3) Synthèse du THAM tri-*O*-tétrahydropyranyle *N*-méthylé **29**

La synthèse de ce substrat a pu être réalisée à partir de l'amine **25** pure ou en mélange avec d'autres produits. Malgré les résultats négatifs obtenus précédemment, nous avons en effet de nouveau tenté d'effectuer la synthèse du composé **29** dans le méthanol et nous y sommes cette fois-ci parvenus avec un très bon rendement de 80%.



**Figure 1.57** : schéma de synthèse du THAMtriOTHP *N*-méthylé **29**.

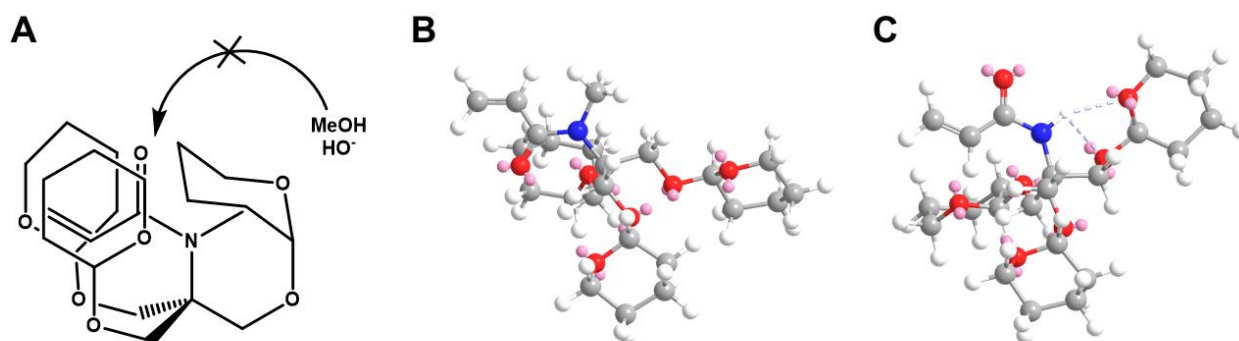


La même réaction a pu être réalisée sur le mélange d'amine mono-, di- et triOTHP pour conduire, après purification par chromatographie, au composé **29** avec un rendement global de 30 %.

L'isolement de ce substrat tendait à montrer que la liaison amide était ici insensible à l'attaque du méthanol. D'un point de vue thermodynamique, cette liaison était certainement toujours aussi fragile et c'était très certainement la cinétique de méthanolyse de la liaison qui était ralentie par un facteur que nous ne sommes pas parvenus à identifier.

Notre première hypothèse impliquait le fort encombrement stérique apporté par les groupements tétrahydropyranyle qui adoptaient alors un arrangement particulier dans l'espace qui empêchait l'approche des molécules de méthanol et/ou des ions hydroxyde.

Nous avons pu vérifier par des expériences de modélisation que l'hypothèse ne concernait jamais les molécules de monomère en phase gaz (cf. figure 1.58) et qu'il aurait été nécessaire de procéder à des simulations en solvant que nous n'étions pas en mesure de produire.



**Figure 1.58 :** A/Hypothèse selon laquelle la méthanolyse était compromise suite à l'établissement d'une conformation particulière des groupements THP gênant l'approche de l'acryloyle par les nucléophiles. Le motif acrylamide aurait été ainsi contenu dans une cavité formée par le repliement des  $-\text{CH}_2\text{OTHP}$ . B/Modélisation du THAM triOTHP *N*-méthylé **29**. C/Modélisation du THAM triOTHP **13**. Les modélisations ont été effectuées avec le logiciel Chem-3D en appliquant le champ de force MM2 en phase gaz. La structure hypothétique (A) n'a pu être retrouvée par modélisation et ne correspondait à aucun conformère stable en phase gaz. La modélisation effectuée sur le THAM triOTHP a permis de connaître l'impact de la méthylation de l'azote. Il était à noter la différence d'orientation du groupement acryloyle et l'établissement de liaisons hydrogène pour la forme non méthylée, résultant en une différence d'énergie d'environ  $42 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  entre les deux monomères.

Si par ailleurs nous avons pu confirmer cette hypothèse, nous aurions pu apporter une explication plausible à la baisse de réactivité observée en polymérisation lorsqu'on protégeait les

fonctions hydroxyle du THAM par des groupements THP. Ces derniers pouvaient inhiber l'agrégation résultant des interactions type proton amide-oxygène carbonyle.

Il aurait été très intéressant de pouvoir comparer les cinétiques de polymérisation des composés **13** et **29**, cependant, n'étant pas parvenus à cristalliser ce dernier composé, nous avons choisi de ne pas procéder à l'étude de sa réactivité.

Nous avons ensuite essayé de déprotéger les fonctions hydroxyle de ce produit de manière à obtenir le THAM *N*-Méthylé. Les différents essais de déprotection des fonctions hydroxyle qui ont été effectués sur ce composé ou sur le mélange de produits ont montré qu'il était très facile de déprotéger deux fonctions alcool sur trois. Le dérivé mono-OTHP semblait par contre inerte ou se dégradait dans des conditions un peu plus drastiques (acide acétique/eau 6/3, montmorillonite K10 /méthanol, méthanol/APTS, méthanol/CBr<sub>4</sub><sup>200</sup>...).

Dans des conditions d'acidité importante, nous avons observé soit une polymérisation, soit une dégradation des produits qui rendaient l'isolement et la caractérisation du THAM *N*-méthylé particulièrement difficile.

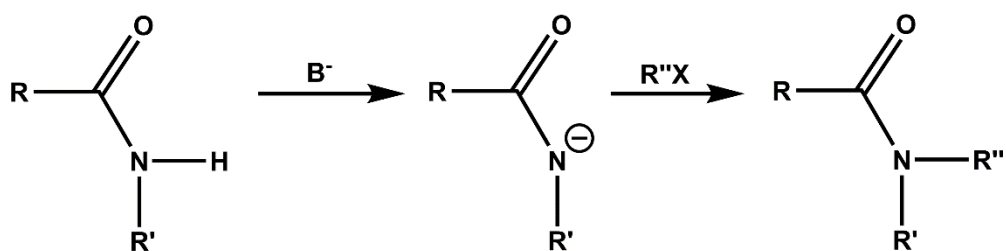
L'ensemble de ces résultats nous a alors orienté sur la mise au point d'une méthode de *N*-alkylation du THAM.

### **3) *N*-Méthylation du THAM**

La méthylation devant se faire sur l'azote du Tris et non sur les fonctions alcool, nous avons utilisé des dérivés protégés du THAM.

Différents types de protections ont été utilisés et testés. Nous avons soit protégé les trois fonctions alcool avec un même groupement protecteur et obtenu des dérivés du THAM que nous avons appelés dérivés tri-*O*-R, soit protégé la fonction alcool du THAM isopropylidène et nous avons obtenu des dérivés du THAM isopropylidène que nous avons appelé dérivés iso-*O*-R.

La *N*-alkylation des amides est souvent difficile car ceux-ci étant peu nucléophiles, il faut d'abord arracher le proton avec une base forte pour former l'amidure qui va réagir sur un halogénure d'alkyle (cf. figure 1.59).



**Figure 1.59** : schéma de synthèse générique pour la *N*-alkylation des amides.

Les méthodes les plus courantes et anciennes consistaient à traiter l'amide par du sodium dans le toluène<sup>201</sup> (méthode de Hepp) ou par une solution éthanolique concentrée d'hydroxyde de sodium<sup>202</sup> (méthode de Pictet). Fones<sup>203</sup> a amélioré le procédé en utilisant de l'hydruire de sodium dans le xylène. En règle générale, ces trois méthodes ont conduit aux amides *N*-alkylés attendus avec de faibles rendements.

La *N*-alkylation des amides a pu être aussi effectuée par catalyse par transfert de phase (CTP)<sup>204</sup> mais le procédé s'est révélé infructueux lorsque l'amide était stériquement encombré.

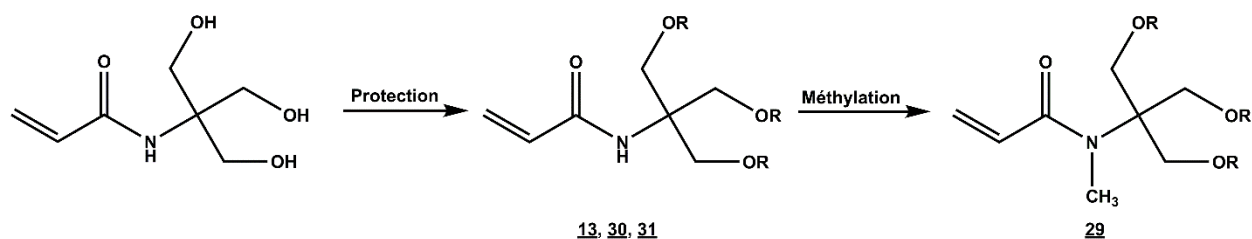
Nous avons donc choisi de travailler en phase homogène avec une base organique, le *tert*-Butylate de potassium utilisé par Baumgarten *et al.*<sup>205</sup> pour la synthèse d'une  $\alpha$ -lactame. Nous avons effectué la réaction dans le THF en utilisant le tosylate de méthyle en tant qu'agent alkylant. Les rendements ont évolué entre 75 et 100 % (*vide infra* figure 1.60 et tableau 1.11).

### 3.1) Formation et méthylation des dérivés tri-*O*-R

Les méthodes de synthèses sont décrites dans la figure 1.60 et les résultats obtenus ont été répertoriés dans le tableau 1.11.

Dans le but de confirmer que les structures obtenues avec la première méthode (condensation des dérivés du Tris *N*-méthylé sur le chlorure d'acryloyle) étaient bien dérivées du THAM *N*-méthylé, nous avons essayé de reproduire la synthèse du monomère **29** en suivant une méthode de synthèse différente et en utilisant le THAM comme synthon de départ. Après avoir protégé les trois fonctions alcool par un groupement THP, nous avons obtenu le monomère **13** dont nous avons ensuite méthylié la fonction amide.

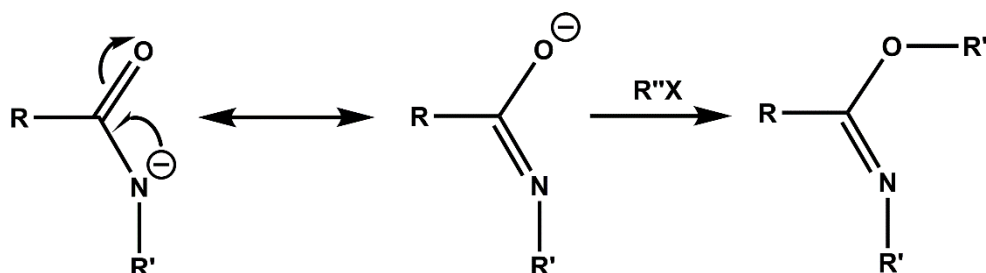
En RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C nous avons pu vérifier que le monomère obtenu avait exactement la même structure que le composé **29**. Ce résultat confirmait qu'il s'était produit une *N*-alkylation et non une *O*-alkylation comme ont pu l'observer Baumgarten *et al.*<sup>205</sup> dans certains cas (cf. figure 1.61).



**Figure 1.60** : schéma de synthèse général des dérivés tri-*O*-R *N*-méthylés du THAM. Les protections ont été effectuées par tétrahydropyranylation (3,3 eq. DHP/APTS (cat.) dans DMF) ou par benzylation (3,3 eq. PhCOCl/Pyridine) ou par tritylation (3,3 eq. TrCl/TEA/CH<sub>3</sub>CN). Les mêmes conditions de méthylation (1,1 eq. TsOMe, 1,1 eq. *t*BuOK, THF, 1 h) ont été appliquées aux trois différents dérivés.

Produit de départ n°	Groupement protecteur utilisé	Rendement synthèse	Rendement méthylation	Produit méthylé n°
<u>13</u>	THP (R = C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O)	80 %	90 %	<u>29</u>
<u>30</u>	Benzoyle ( R = $\begin{array}{c} \text{---C---}\Phi \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ )	80 %	0 %	-
<u>31</u>	Trityle (R = -CΦ <sub>3</sub> )	80 %	0 %	-

**Tableau 1.11** : résultats des synthèses et méthylations des dérivés tri-*O*-R.



**Figure 1.61** : mécanisme intervenant dans la *O*-alkylation des amides et reposant essentiellement sur le phénomène de mésomérie.

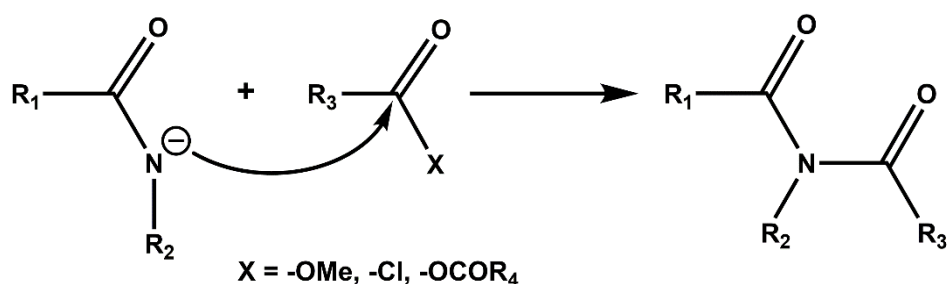
Il nous a donc été possible d'obtenir des dérivés *N*-alkylés du THAM en utilisant cette méthode. Il faut préciser ici que cette deuxième voie s'est révélée nettement plus intéressante que la *N*-acryloylation des dérivés du Tris, puisque le rendement global de synthèse du THAM *N*-méthylé est passé de 30 % à 70 %.

Toutefois, comme nous avons pu le signaler dans le paragraphe 2.3, il nous a été impossible d'obtenir le THAM *N*-méthylé à partir du monomère 29 et nous n'avons pas poussé nos investigations plus loin. Nous avons alors essayé de procéder à la *N*-alkylation de dérivés protégés par estérification.

Nous ne pouvions introduire des esters comportant un hydrogène en  $\alpha$  sous peine d'alkyler l'ester et nous avons donc benzoylé les trois fonctions alcool du THAM. La réaction a été effectuée dans la pyridine en présence d'un excès d'anhydride benzoïque. Le composé **30** a été obtenu avec 80 % de rendement mais sa *N*-alkylation a abouti à un échec, le type de protection utilisé n'ayant certainement pas été compatible avec les conditions expérimentales utilisées.

Nous avons en effet observé une dégradation du composé **30** qui se traduisait par la présence d'un grand nombre de taches révélées sur plaque CCM. Il peut s'agir d'une réaction parasite de *N*-benzoylation, les amidures pouvant réagir sur les esters<sup>206,207</sup>, les chlorures d'acides<sup>208</sup> et les anhydrides d'acides<sup>209</sup> pour former des imides (cf. figure 1.62).

Nous ignorions si le mécanisme était intra- ou intermoléculaire et nous n'avons ni essayé d'isoler et ni essayé d'identifier les différents sous-produits. Nous avons alors étudié la synthèse du dérivé tritritylé du THAM.



**Figure 1.62** : formation d'imides via la *N*-acylation d'amidure.

Le THAM tri-*O*-Tr **31** a été obtenu avec un bon rendement de 80 %. La réaction a été effectuée en traitant une suspension de THAM dans l'acétonitrile par un excès de chlorure de trityle et de TEA. La réaction de *N*-alkylation n'a pas donné les résultats espérés. En effet, après 12 h de réaction dans les conditions précédemment définies, le composé **31** a été intégralement récupéré. La méthylation ne s'est pas produite car l'encombrement stérique apporté par les trois groupements trityle n'a probablement pas permis l'approche de la base et/ou de l'agent méthylant.

Nous avons donc entrepris la synthèse de dérivés du THAM comportant trois fonctions alcool protégées mais moins encombrées, en greffant différents groupements protecteurs sur la fonction hydroxyle du THAM isopropylidène.

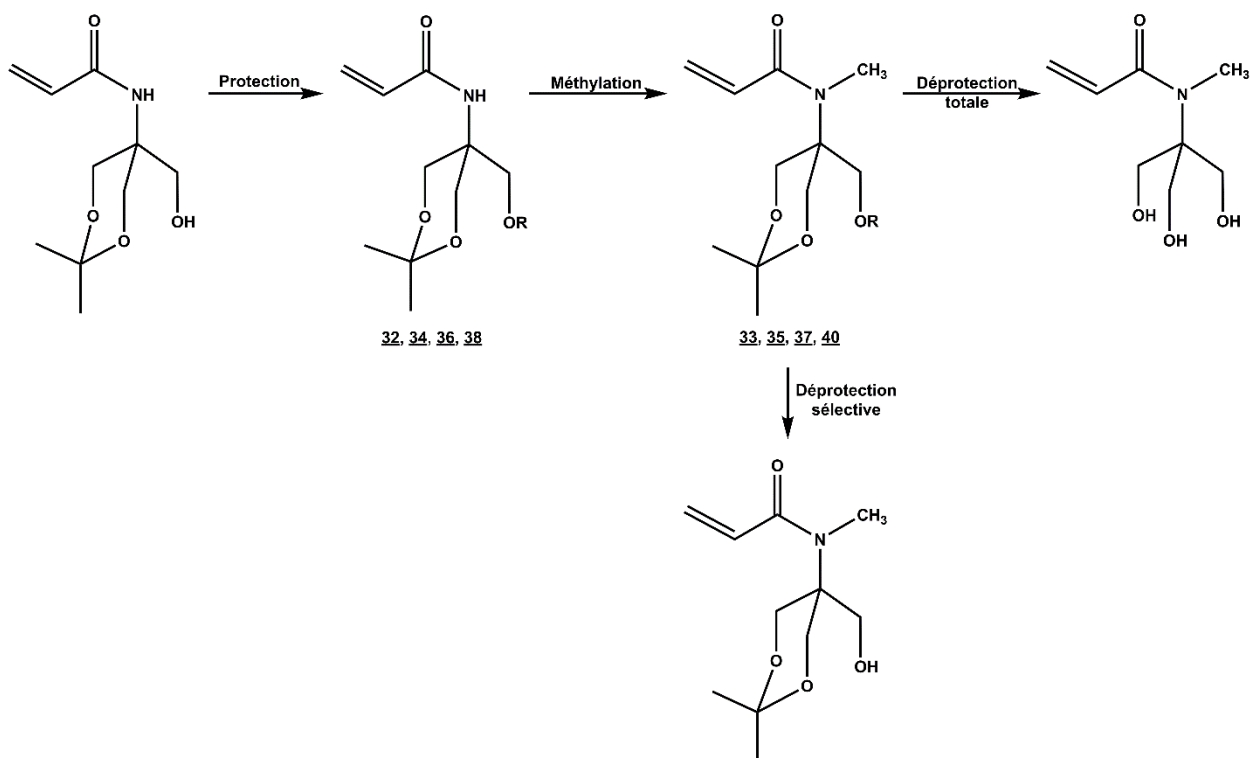
### 3.2) Formation et méthylation des dérivés iso-O-R

Trois raisons essentielles ont motivé la synthèse de ces substrats :

- diminuer l'encombrement stérique afin de faciliter la méthylation de la fonction amide ;
- obtenir ainsi un dérivé du THAM isopropylidène *N*-méthylé qui devrait normalement se déprotéger plus facilement (les interactions stabilisantes ayant théoriquement disparu) pour conduire à la formation du THAM *N*-Méthylé ;
- introduire un groupement protecteur pouvant être éliminé sans affecter la protection cétal pour obtenir ainsi plus facilement le THAM isopropylidène *N*-méthylé **28**.

Nos expériences ont d'abord consisté à introduire un groupement sensible à l'hydrolyse acide en vue de déprotéger en une seule fois les trois fonctions alcool du composé obtenu après méthylation (cf. figure 1.63). Les résultats obtenus ont été répertoriés dans le tableau 1.12.

Quelle qu'ait été la technique utilisée ( $H_3O^+$ , MeOH/CBr<sub>4</sub>, TFA/HSiEt<sub>3</sub>...), les tentatives de déprotection des composés **33**, **35** et **37** n'ont abouti qu'à des échecs. Nous avons en effet rencontré toujours les mêmes problèmes de dégradation de la liaison amide qui était donc sensible aux agents nucléophiles en milieu basique ou acide ainsi qu'aux acides.



**Figure 1.63** : stratégie suivie pour la synthèse des dérivés iso-O-R méthylés du THAM.

Produit de départ n°	Groupe protecteur utilisé	Rendement synthèse	Rendement méthylation	Produit méthylié n°
<b>32</b>	THP (R = C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O)	90 %	100 %	<b>33</b>
<b>34</b>	MEM (R = -CH <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> )	75 %	85 %	<b>35</b>
<b>36</b>	Trityl (R = -CΦ <sub>3</sub> )	85 %	77 %	<b>37</b>
<b>38</b>	Benzyle (R = -CH <sub>2</sub> Φ)	85 %	88 %	<b>40</b>

**Tableau 1.12** : résultats des synthèses et méthylation des dérivés iso-O-R. La synthèse des composés **32** à **40** est décrite plus en détail dans la partie expérimentale.

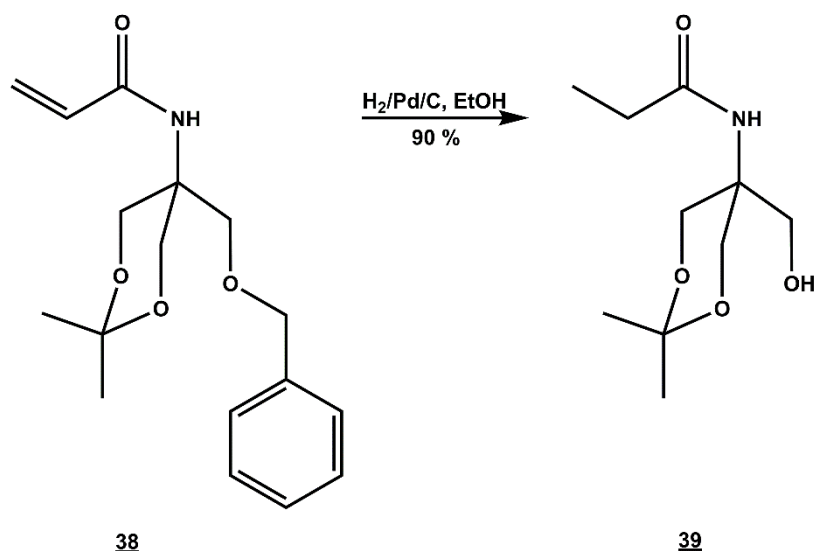
L'idée d'obtenir le THAM *N*-méthylé a été abandonnée et nous avons essayé d'améliorer les rendements obtenus lors de la synthèse du THAM-isopropylidène *N*-méthylé (**27**).

Nous avons pensé introduire sur la fonction alcool du THAM isopropylidène (**3**), un groupement protecteur pouvant être en effet éliminé par action de réactifs neutres. Après méthylation de la fonction amide il suffisait d'éliminer ce groupement dans des conditions neutres qui n'affectaient ni la fonction céta, ni la liaison amide du produit, pour obtenir le THAM isopropylidène *N*-méthylé.

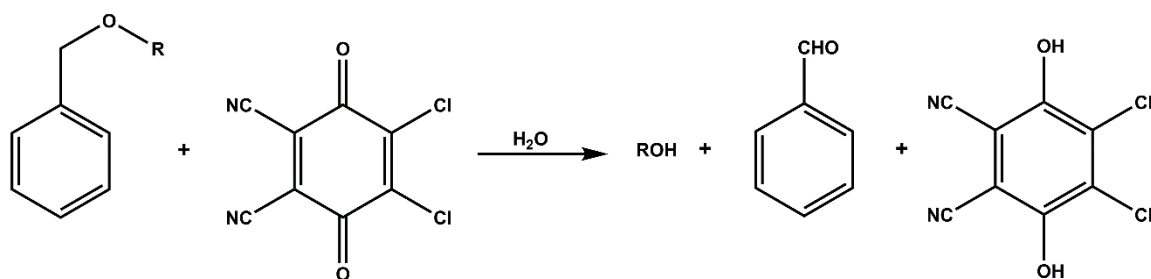
Nous avons ainsi entrepris de benzyle la fonction hydroxyle du THAM isopropylidène. Le composé **38** a été obtenu par réaction du bromure de benzyle sur le THAM isopropylidène dans le THF en présence de *tertio*-Butylate de potassium avec 85 % de rendement. Une des possibilités qui était alors envisageable consistait à méthyler ce dérivé et à déprotéger le benzyle par hydrogénation catalytique.

Nous avons alors procédé à un essai sur une petite quantité de composé **38** pour savoir si on ne réduisait pas aussi la double liaison. Le monomère **38** a été mis en présence de palladium sur charbon dans l'éthanol sous atmosphère d'hydrogène durant 2h. Une CCM a révélé que le composé de départ avait disparu ainsi que l'absorption en U.V., nous avons donc réduit la double liaison (cf. figure 1.64). Nous avons isolé, cristallisé et caractérisé le composé **39**.

Nous devons donc utiliser une autre méthode de déprotection du benzyle. Nos recherches bibliographiques nous ont conduit à envisager l'utilisation de la 2,3-dichloro-5,6-dicyanoquinone (DDQ) qui est un agent oxydant spécifique des positions benzyliques<sup>210-214</sup> et des positions allyliques<sup>215</sup> (cf. figure 1.65).



**Figure 1.64** : formation du composé **39**.



**Figure 1.65** : réaction de clivage des éthers benzyliques en présence de DDQ.

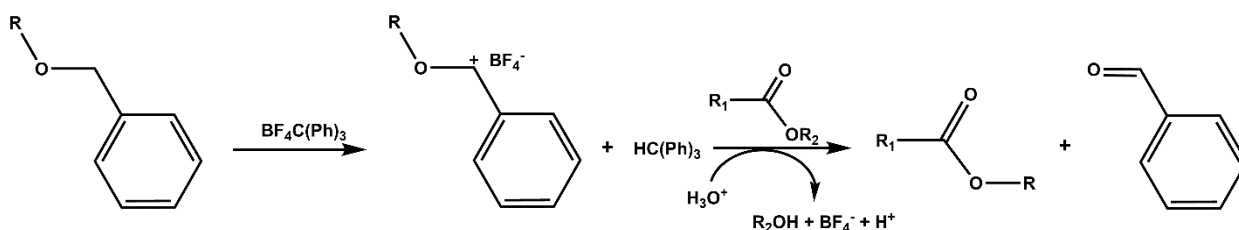
Nous avons donc procédé dans un premier temps à la méthylation du THAM isopropylidène benzylé **38** en employant toujours les mêmes réactifs d'alkylation et le produit *N*-méthylé a été obtenu avec un rendement de 90 %.

Ce produit est ensuite traité par un léger excès de DDQ dans un mélange dichlorométhane/eau 10/1 ou en milieu anhydre dans le chloroforme à reflux. Dans les deux cas, la tentative de déprotection par la DDQ a échoué car il nous a été impossible d'isoler le composé **27** attendu.

Nous avons alors effectué une tentative de déprotection avec le tétrafluoroborate de triphénylcarbénium<sup>216</sup>  $\text{C}\Phi_3\text{BF}_4$  qui permet d'arracher un hydrure en position benzylique. Le carbocation ainsi formé peut évoluer de différentes façons dont l'une est décrite ci-après (cf. figure 1.66).

Nous avons travaillé en présence d'acide acétique et d'eau et nous n'avons pu isoler le composé **27** à partir du composé **40**.





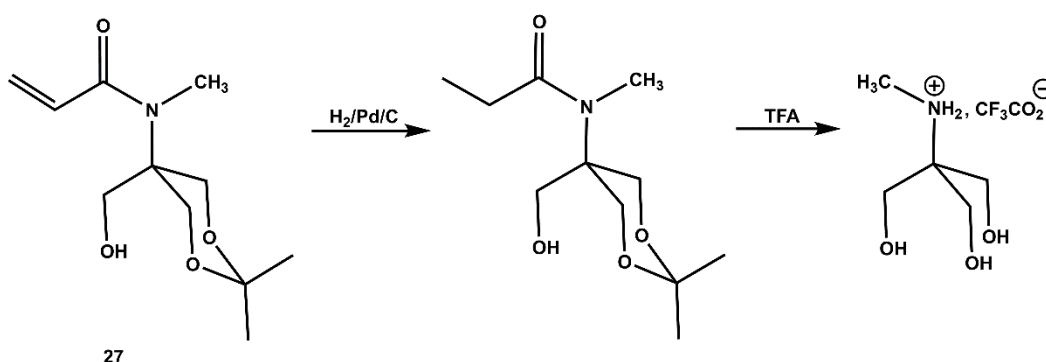
**Figure 1.66** : déprotection des éthers benzyliques médié par triphénylcarbénium.

Enfin, un dernier essai a été effectué en hydrogénant le composé **40** à pression normale en présence de nickel de Raney dans l'éthanol. Oikawa *et al.*<sup>217,218</sup> ont montré que l'on pouvait éliminer sélectivement le groupement benzyle sans réduire un motif acrylate présent sur la même molécule. Cependant, la double liaison de l'acrylamide étant certainement beaucoup plus réactive que celle d'un acrylate, nous avons observé la formation du composé réduit **39**.

L'idée de pouvoir améliorer les rendements de la synthèse du THAM isopropylidène *N*-méthyle **27** a été abandonnée.

L'hydrolyse de la liaison amide intervenant lors des réactions de déprotection était un réel problème, il nous a donc paru intéressant de savoir si cette fragilité était imputable au motif acrylamide ou alors à la présence du méthyle sur l'azote. Dans ce dernier cas on devait rencontrer le même problème avec un amide classique.

Nous avons réduit le composé **27** par hydrogénation catalytique puis nous avons traité le produit obtenu par un excès de TFA (cf. figure 1.67).



**Figure 1.67** : génération du sel de triflate du Tris *N*-méthyle après hydrogénation et protonolyse du composé **27**.

Nous avons pu vérifier que la liaison amide était parfaitement labile dans les deux cas. La RMN nous a permis d'identifier le triflate provenant de la protonolyse de la liaison amide. La présence ou l'absence d'une insaturation en  $\alpha$  n'avait donc aucune influence sur la stabilité de la liaison

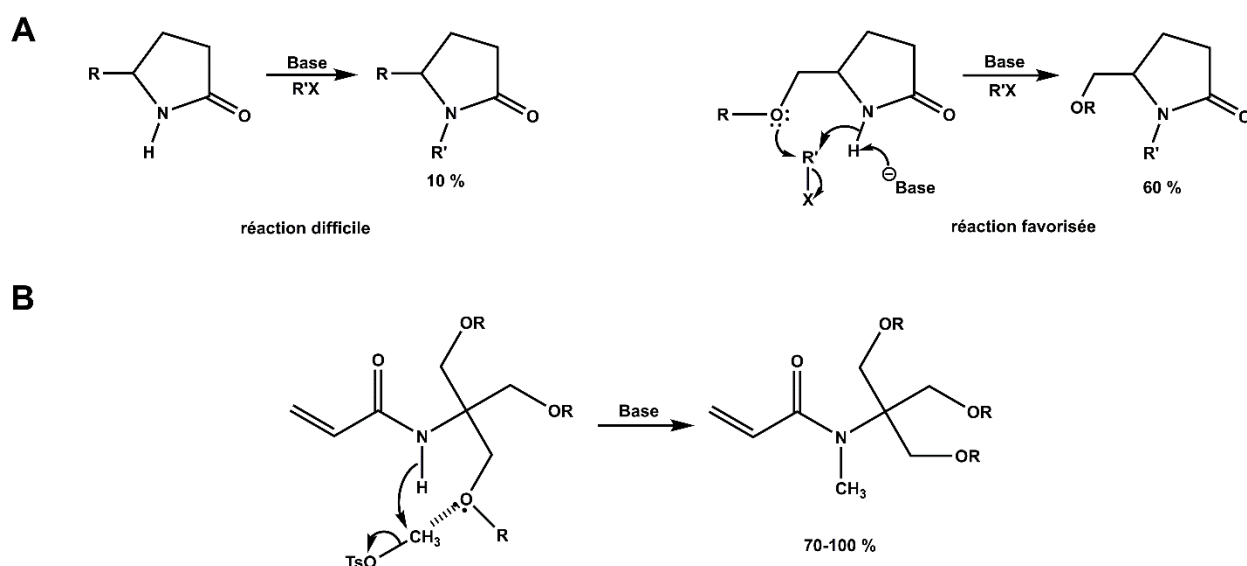
amide. C'était certainement des facteurs tels que l'encombrement stérique ou autres qui intervenaient sur la fragilité de cette liaison.

Ce resultat a aussi montré qu'il était impossible d'obtenir un polymère ou un télomère dérivé du THAM *N*-méthylé à partir de monomères *N*-méthylés protégés par des groupements labiles en milieu acide ou en milieu basique car les réactifs de déprotection entraînaient l'hydrolyse des liaisons amides. Il était donc très difficile, voire impossible d'obtenir, le THAM *N*-méthylé, la fragilité de la liaison amide alkylée rendant la plupart des résultats obtenus inexploitable.

D'un point de vue théorique, nous pouvons remarquer, que malgré l'encombrement important de la liaison amide, les réactions d'alkylation se faisaient généralement avec un rendement supérieur à 80 %. Ceci pouvait s'expliquer par l'existence d'une assistance anchimérique.

Keusenkothen & Smith<sup>219</sup> ont montré que la *N*-alkylation des dérivés de la 5-alkoxyméthyl-2-pyrrolidinone se faisait beaucoup plus facilement que celle des dérivés de la 2-pyrrolidinone substituée en 5 par des groupements alkyle (cf. figure 1.68A).

Nous pouvons donc faire le rapprochement avec les dérivés du THAM où les positions relatives de l'azote et des oxygènes étaient les mêmes (cf. figure 1.68B).



**Figure 1.68** : intervention d'une assistance anchimérique favorisant les réactions de *N*-alkylation des dérivés de la pyrrolidone<sup>219</sup> (A) ou du THAM (B).

Précisons que la méthode d'alkylation utilisée pour la *N*-méthylation des dérivés tri-*O*-R et iso-*O*-R du THAM s'est avérée être finalement la seule envisageable. En effet, d'autres méthodes telles que l'alkylation réductive des amides<sup>220-223</sup> ont été testées et n'ont abouti qu'à des échecs.

Sur le plan pratique, les résultats obtenus ont montré clairement que les mesures de cinétiques de polymérisation du THAM *N*-méthylé étaient sérieusement compromises. Toutefois, nous pouvions indirectement mesurer l'influence de cette *N*-alkylation sur les dérivés du THAM isopropylidène que nous avons isolés et caractérisés.

Nous avons donc uniquement effectué des mesures de cinétique de polymérisation du THAM isopropylidène *N*-méthylé.

#### 4) Cinétique de polymérisation du THAM isopropylidène *N*-méthylé 27

La première cinétique, réalisée dans le méthanol à reflux, a montré qu'il se produisait dans ce solvant une méthanolyse de la liaison amide avec formation d'acrylate de méthyle. L'emploi d'un solvant tel que le méthanol s'est donc révélé tout à fait inadapté et incompatible avec la labilité de la liaison amide du monomère 27.

Notre choix s'est alors porté sur le THF, solvant inerte dont la température d'ébullition (67 °C) est proche de celle du méthanol (65 °C). Par voie de conséquence, la vitesse de décomposition de l'AIBN dans le THF devait rester très proche de celle de l'AIBN dans le méthanol. Dans le Polymer Handbook<sup>142</sup>, nous trouvons quelques valeurs de  $k_d$  répertoriées dans le tableau 1.13.

Solvant	Température (°C)	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )
Monobutyléther	66,8	$2,44 \cdot 10^{-5}$
<i>N,N</i> -diméthylaniline	66,8	$3,48 \cdot 10^{-5}$
Toluène	65	$1,9 \cdot 10^{-5}$
Dioxane/eau (80/20)	65,3	$2,53 \cdot 10^{-5}$

**Tableau 1.13** : quelques valeurs de  $k_d$  mesurées pour l'AIBN dans différents solvants à des températures comprises entre 65 et 67 °C.

Nous avons donc admis, en nous basant sur la valeur du  $k_d$  déterminée dans le monobutyléther, que les vitesses de décomposition de l'AIBN dans le méthanol et dans le THF étaient comparables.

Cependant, contrairement au méthanol et à l'eau, le THF est un solvant apolaire aprotique. Ce solvant est un accepteur de liaison hydrogène mais il n'en est pas donneur. Les mécanismes de solvation intervenant dans le méthanol ou le THF étaient donc très différents et n'auraient pas la même influence sur la réactivité. Celle-ci pouvait en effet varier suivant le type de solvant pour un même monomère à une température donnée (cf. résultats des cinétiques déterminées dans l'eau et le méthanol pour le THAM ainsi que le tableau 1.14).

Monomères	Solvants	$f k_p^2 / k_t$ (L.mol <sup>-1</sup> .s)	T°	Ref.
Acrylonitrile	eau	0,21	25°C	200 <sup>224</sup>
Acrylonitrile	DMF	0,0015	25°C	201 <sup>225</sup>
Acrylamide	eau	22,34	25°C	125 <sup>141</sup>
Acrylamide	DMSO	0,0484	26°C	202 <sup>142</sup>

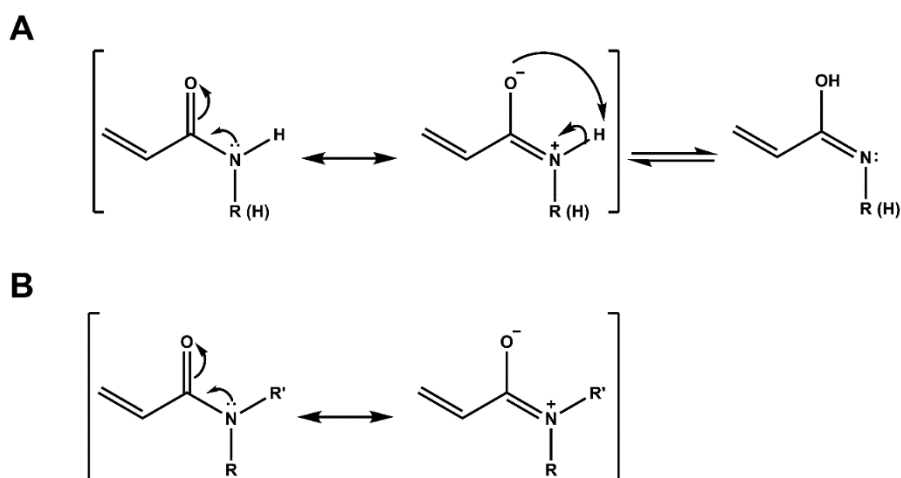
**Tableau 1.14** : réactivité de l'acrylamide et de l'acrylonitrile dans différents solvants.

Il était donc nécessaire de procéder à des mesures des cinétiques de polymérisation du monomère non méthylé, le THAM isopropylidène, dans le THF afin de connaître l'évolution de la réactivité lorsqu'on passait d'un milieu polaire protique (méthanol) à un milieu apolaire aprotique (THF).

Il était certain que nous ne pourrions jamais avoir une idée précise du comportement du monomère *N*-méthylé dans un solvant tel que le méthanol, mais cela ne devait pas nous empêcher pour autant de parvenir à déterminer quelle pouvait être l'influence de la liaison amide sur la vitesse de polymérisation du monomère.

En effet, différents auteurs<sup>161-163</sup> ont montré que la réactivité des acrylamides primaires et secondaires en milieu organique évoluait en fonction de la polarité du solvant. La réactivité était d'autant plus importante que la constante diélectrique du solvant était faible.

Ils ont attribué ce phénomène à deux facteurs essentiels qui étaient les associations intermoléculaires (plus fortes dans un solvant apolaire que dans un solvant polaire) et l'existence d'un équilibre énolique dans le cas des amides I et II influençant la réactivité du monomère et plus ou moins présent suivant la polarité du solvant considéré (cf. Figure 1.69).



**Figure 1.69** : mésonérie et équilibre énolique des acrylamides. L'équilibre énolique n'est pas vérifié pour les amides III dépourvus de proton mobile.

Cet équilibre énolique était ralenti dans le cas des acrylamides II car la présence d'un substituant électrodonneur renforçait la basicité de l'azote.

Les mêmes auteurs montraient aussi que la réactivité plus faible des amides tertiaires était pratiquement indépendante de la polarité du milieu réactionnel, les associations intermoléculaires et déplacement énolique étant inexistant en absence de proton amide.

Nous devons donc nous attendre à mesurer des vitesses de polymérisation dans le THF supérieures à celles observées dans le méthanol et ceci, quel que soit le type de liaison hydrogène intervenant dans les mécanismes d'association.

D'autre part, si la réactivité du monomère était essentiellement fonction du degré de substitution de l'acrylamide, la vitesse de polymérisation du monomère *N*-Méthylé devrait être nettement inférieure à celle du monomère non méthylé et ne devrait pas évoluer en fonction de la polarité du milieu réactionnel.

Pour s'en assurer, nous avons complété nos études par une cinétique dans un solvant polaire inerte tel que l'acétonitrile.

#### 4.1) Cinétique de polymérisation du THAM isopropylidène **3** et du THAM isopropylidène-*N*-méthylé **27** dans le THF

Les résultats obtenus ont été reportés dans le tableau 1.15 ci-après.

Monomère	[AIBN] <sub>0</sub> (mol/l)	Nombre de points	Pente	R <sup>2</sup>	$f k_p^2/k_t$ (L.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
<b><u>3</u></b>	0.001	8	36.648	0.9916	8.39
	0.0005	9	25.936	0.9833	<b>8.4 ± 0.01</b> 8.41
<b><u>27</u></b>	0.001	10	32.201	0.9936	6.48
	0.002	10	41.248	0.9823	<b>5.9 ± 0.58</b> 5.32

**Tableau 1.15** : Résultats des cinétiques des monomères **3** et **27** dans le THF.

Conformément à nos attentes, nous avons observé pour le THAM isopropylidène, une vitesse de polymérisation quatre fois plus importante dans le THF ( $f k_p^2/k_t = 8.4 \pm 0.01$  L.mol<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) que dans le méthanol ( $f k_p^2/k_t = 2.04 \pm 0.01$  L.mol<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>). Nous retrouvons donc le phénomène analogue

à celui déjà décrit par Saini *et al.*<sup>161,162</sup> pour l'acrylamide qui polymérisait plus vite dans le dioxane que dans l'éthanol.

Comme nous l'avons expliqué, ce phénomène a été attribué au fait qu'en milieu polaire il y a formation de liaisons hydrogène entre le solvant et le monomère alors que dans les solvants apolaires les interactions s'établissent essentiellement entre les monomères.

Cependant, contrairement aux résultats observés avec l'acrylamide, ceux obtenus avec un dérivé du THAM semblaient montrer que le degré de substitution de l'azote n'avait que peu d'influence sur la réactivité du monomère.

L'augmentation de la vitesse de polymérisation du monomère **3** dans le THF était donc due à de fortes liaisons hydrogène s'établissant entre les monomères par l'intermédiaire des fonctions hydroxyle libres et non du proton amide.

La faible perte de réactivité observée pour le monomère **27** pouvait être interprétée de trois façons différentes :

- soit la liaison amide n'intervenait que très peu dans les phénomènes d'association ;
- soit, en méthylant cette fonction, nous avons introduit un encombrement stérique qui ralentissait la réaction et/ou nous avons augmenté la basicité du proton amide et réduit ainsi la proportion de tautomères.

Il demeurait nécessaire, cependant, d'effectuer des mesures de cinétique dans l'acétonitrile pour s'assurer que ces dernières remarques étaient toujours vérifiées en milieu polaire.

#### 4.2) Cinétique de polymérisation du THAM isopropylidène **3** et du THAM isopropylidène-*N*-méthylé **27** dans l'acétonitrile

Les cinétiques ont été effectuées à ébullition dans l'acétonitrile à 80° C. A cette température la valeur de la constante de vitesse de décomposition de l'AIBN était  $k_d = 1,25 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Nous avons tenté d'effectuer ces mêmes mesures à 65° C mais nous avons rencontré des problèmes d'inhibition de la réaction de polymérisation. Nous nous sommes limités, ici, à exposer les résultats obtenus à 80° C.

A 80° C dans l'acétonitrile la valeur du rapport  $fk_p^2/k_t$  a été estimée à  $5 \pm 0,2 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$  pour le monomère **3** et à  $3 \pm 0,1 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$  pour le monomère **27**.

La réactivité du dérivé *N*-méthylé **27** était restée inférieure à celle du composé non méthylé **3** et le rapport des vitesses de polymérisation des deux monomères mesurées dans le THF et l'acétonitrile était quasiment identique ( $\approx 1,5$ ).

Bien que la température d'ébullition de l'acétonitrile soit nettement plus élevée que celle du THF, les vitesses de polymérisation étaient moins élevées dans l'acétonitrile que dans le THF. Nous notons donc une forte influence de la polarité du solvant sur la réactivité des monomères moins importante en milieu organique polaire dans lequel les associations étaient atténuées.

Nous ne disposons pas des valeurs des rapports  $f k_p^2 / k_t$  à 65 °C dans l'acétonitrile mais il était permis de penser que la différence existant entre les réactivités mesurées dans ce solvant et dans le THF aurait été encore plus importante.

Solvant	$\epsilon$
Eau	78,5
DMSO	48,9
Acétonitrile	37,5
DMF	36,7
Méthanol	32,7
THF	7,6

**Tableau 1.16** : solvants utilisés et valeur de leur constante diélectrique.

Les résultats ont confirmé que le proton de la liaison amide n'intervenait pratiquement pas sur la réactivité des monomères étudiés.

Il semblait en fait, que l'interaction intermoléculaire proton amide-carbonyle  $-N-H--O=C$  ne se produisait pas du fait de l'encombrement du groupement acryloyle, mais elle pouvait très bien s'établir avec des groupements moins encombrés fixés sur les fonctions alcool du Tris tels que des groupements acétoxy ou méthoxy (comme nous l'avons suggéré dans les sections précédentes) ce qui expliquerait alors la réactivité encore assez importante des monomères **7** et **16**.

L'aptitude à l'agrégation du monomère semblait compromise dans les solvants organiques polaires de constante diélectrique élevée. L'influence de la polarité du milieu était donc vérifiée quelle que soit la nature du mécanisme associatif envisagé : liaison hydrogène carbonyle-proton amide (cas de l'acrylamide) ou liaison hydrogène fonction hydroxyle-hydroxyle (cas du THAM et de ses dérivés).

## V) CONCLUSION

Les expériences de cinétique effectuées avec le THAM et ses dérivés ont permis de montrer que la réactivité importante de ce monomère pouvait être attribuée à la présence des fonctions hydroxyle qui conduisent par l'intermédiaire de fortes liaisons hydrogène à l'agrégation des monomères. Contrairement à toute logique, ce phénomène d'agrégation est favorisé dans les solvants aqueux et minimisé dans un solvant organique. Comme il est peu concevable que les phénomènes d'hydratation ne se produisent pas dans l'eau, on doit dès lors admettre que les agrégats responsables de cette très haute réactivité font intervenir diverses molécules d'eau associant entre elles les différentes molécules de monomère par liaisons hydrogène.

Dans les solvants organiques, ces associations sont, comme le prévoit la théorie, d'autant plus défavorisées que le milieu est polaire. La réactivité du monomère est alors fortement dépendante de la constante diélectrique du solvant.

Nous avons aussi mis en évidence le fait que la réaction est sensible à l'encombrement stérique du monomère et par la même occasion que la nature du groupement protecteur utilisé a aussi une influence sur la vitesse de polymérisation.

Nous avons enfin démontré que la liaison amide avait une faible influence sur la réactivité de ces acrylamides lorsque ceux-ci comportent une fonction alcool libre. Ce sont les fonctions alcool qui semblent en effet intervenir essentiellement sur la réactivité.

Dans le cas où toutes les fonctions alcool sont protégées, des interactions peuvent alors s'établir entre le proton amide et un site accepteur de liaisons hydrogène du groupement protecteur, lorsque celui-ci en présente un. Ainsi, certains monomères (monomère **7** et **16**) conservent une réactivité importante bien que la totalité des fonctions alcool soit protégée.

**Les associations régissant la réactivité des monomères dérivés du THAM s'établissent essentiellement entre les fonctions alcool et n'impliquent que très peu la participation du groupement amide.**

Les problèmes rencontrés lors de la synthèse des dérivés *N*-méthylés du THAM permettent d'affirmer que l'instabilité de la liaison amide de ces monomères limite leur utilisation à des études purement fondamentales en milieu neutre et inerte et n'offre aucune application potentielle



réellement envisageable dans des domaines de la chimie où le THAM a permis d'obtenir des résultats satisfaisants.

Il aurait été intéressant d'approfondir les résultats de cinétique en mesurant la réactivité des monomères mono-, di- ou trigalactosylés dont les fonctions alcool seraient entièrement protégées par acétylation, puis de recommencer les mêmes expériences avec des monomères présentant la totalité de leurs fonctions alcool libres.

La comparaison des réactivités monomères galactosylés acétylés/monomère **7** et monomères galactosylés déprotégés/monomères tétrahydropyranylés devrait amener des compléments d'information concernant l'influence de groupements acétyle et hydroxyle sur les vitesses de polymérisation des dérivés du THAM.

## **CHAPITRE II**

*Synthèse et étude des propriétés biologiques  
d'amphipols dérivés du THAM.*

## *D) INTRODUCTION*

L'une des motivations majeures des recherches menées sur l'isolement et l'étude structurale des protéines membranaires est l'éclaircissement des mécanismes d'action des récepteurs membranaires et donc des échanges cellulaires avec le milieu extérieur. Les informations recueillies représentent un atout sérieux pour la compréhension des phénomènes régissant les interactions hôtes-substances exogènes ou cellules cibles-vecteurs de principes actifs.

L'une des étapes préliminaires mais incontournable de ces études est l'extraction des protéines de la membrane cellulaire hôte. Ce travail parfois fastidieux mais toujours délicat fait appel à des techniques maintenant bien maîtrisées qui font intervenir des tensioactifs appropriés appelés dans ce cas précis « détergents membranaires ». La fonction essentielle de ces substrats est de déstabiliser et de décomposer la membrane cellulaire afin de favoriser la dissolution de la protéine dans une structure de type micelle mixte comprenant non seulement le détergent mais également les phospholipides constitutifs de la membrane (cf. Partie ii introduction générale). Ces tensioactifs doivent de ce fait répondre à quelques critères d'excellence bien précis :

- une CMC élevée permettant leur élimination rapide par dialyse lors de la reconstitution membranaire dans des protéoliposomes ;
- une transparence aux ultraviolets dans la région de détection des protéines (260-280 nm) ;
- une neutralité de charge éventuelle évitant des interactions électrostatiques dénaturantes avec la protéine ;
- une composition chimique bien définie et une grande pureté qui assurent une bonne reproductibilité expérimentale.

Plusieurs agents amphiphiles répondent à la plupart de ces critères : ce sont essentiellement des tensioactifs non-ioniques qui limitent les phénomènes d'interaction avec les charges de la protéine. Ces tensioactifs ne perturbent généralement pas la conformation spatiale de la protéine, leur tête polaire étant neutre<sup>23</sup>.

Cette classe de tensioactifs est subdivisée en deux groupes qui sont les alkyl- (Tween80, Brij) et arylpolyoxyéthylènes (Triton X-100, Nonidet P 40) et les alkylglycosides (alkylglucoside<sup>226</sup>, alkylthioglycoside<sup>227</sup>, Hécameg<sup>228</sup>).

Les difficultés de purification des dérivés de type polyoxyéthylène représentent un inconvénient majeur pour l'emploi de ces substrats. En effet, ils sont souvent contaminés par des traces de peroxydes qui réagissent avec la protéine<sup>229</sup>. D'autre part, la polydispersité des chaînes hydrophiles est souvent à l'origine d'une mauvaise reproductibilité des expériences<sup>230</sup>. Les alkylglycosides quant à eux présentent toutes les propriétés du détergent idéal mais leur coût élevé limite leur utilisation.

La structure tridimensionnelle de la protéine maintenue en solution aqueuse au sein des micelles de tensioactifs peut subir au cours du temps des altérations. Il est donc nécessaire de reconstituer une bicouche phospholipidique autour de la protéine afin de pouvoir la conserver plus longtemps sous sa forme native.

Dans ce but, des structures vésiculaires ou protéoliposomes sont préparées en remplaçant les molécules de tensioactifs par des phospholipides. Lors de cette opération, le tensioactif est éliminé suivant des techniques adaptées permettant de limiter le temps de contact protéine-tensioactif.

Diverses méthodes d'élimination ont été mises au point et ont été adaptées suivant les propriétés (CMC, HLB, poids moléculaire, nombre d'agrégation...) du détergent considéré<sup>30</sup>. Les tensioactifs de faible masse molaire dont la CMC est élevée seront facilement éliminés par dialyse<sup>231,232</sup> (technique la plus employée) ou dilution<sup>232</sup>.

Ces méthodes ne seront donc pas adaptées aux tensioactifs de masse molaire élevée et présentant une faible CMC, qui seront plutôt échangés par centrifugation<sup>30</sup> ou chromatographie d'échange hydrophobe<sup>233</sup>. Dans ce dernier cas l'efficacité de la séparation sera fonction de la HLB du tensioactif (HLB basse à modérée).

Le nombre d'agrégation va définir la taille de la micelle et permettre de prédire avec quelle efficacité cette micelle sera séparée des protéoliposomes après centrifugation sur gradient de sucrose<sup>234</sup>, ultracentrifugation<sup>235</sup> ou chromatographie par exclusion de taille.

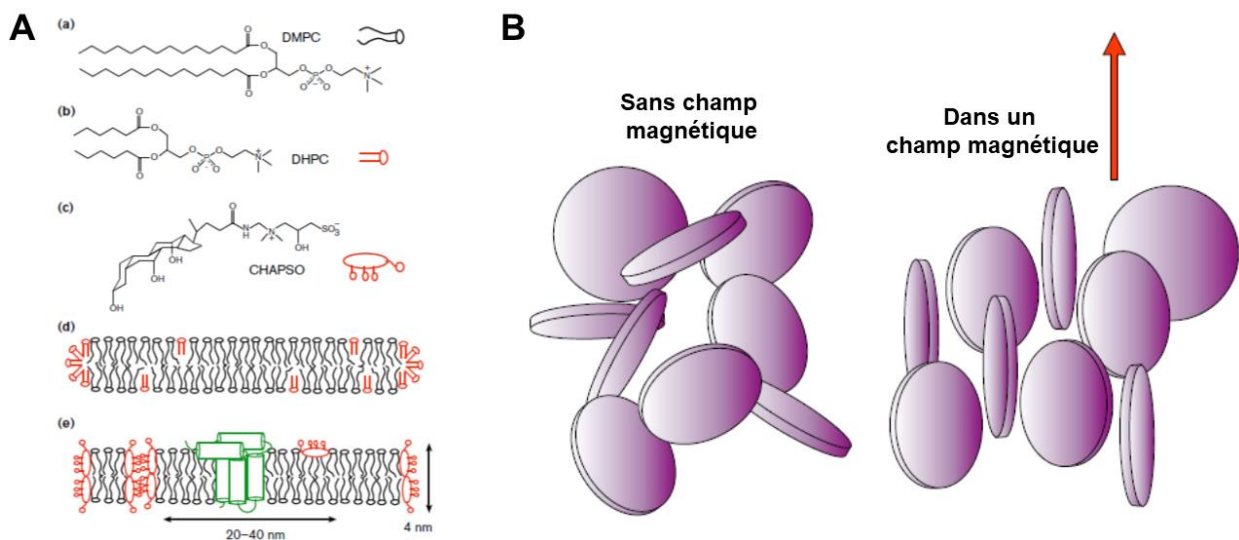
Enfin, citons la chromatographie d'affinité<sup>234</sup> qui sera appliquée indépendamment des propriétés intrinsèques du détergent et dont la réussite sera fonction de l'aptitude du détergent à compromettre l'interaction de la PM avec le ligand immobilisé à la surface de la phase stationnaire<sup>30</sup>.

Cette opération terminée, la protéine à étudier est donc incluse dans des systèmes vésiculaires. L'étude conformationnelle peut dès lors être réalisée par RMN en solution ou à l'état solide<sup>236</sup>

(l'échantillon est dans ce dernier cas toujours en solution mais se comporte comme un solide, c'est à dire que les composantes spectrales de l'échantillon liquide sont caractéristiques d'un échantillon solide : temps de relaxation très courts, ...).

La protéine peut aussi être étudiée maintenue dans une bicelle<sup>237-240</sup>. Les bicelles sont des agrégats particuliers présentant une géométrie discoïdale et constitués d'une bicouche phospholipidique stabilisée par un anneau de tensioactifs (sels biliaires : cholate et désoxycholate de sodium) (cf. figure 2.1A). Les bicelles ne possèdent pas d'espace interne aqueux comme les vésicules. Il a cependant été montré que la structure native au sein des bicelles peut être parfois perturbée<sup>239</sup>, mais des travaux visant à améliorer la méthode sont en cours<sup>241</sup>.

D'autres auteurs<sup>242</sup> ont étudié la structure de polypeptides incorporés dans une bicelle constituée exclusivement de perfluorooctanoate de césium (CPO). Les bicelles de CPO (comme la plupart des bicelles ayant incorporé une protéine) présentent la particularité de s'orienter dans un champ magnétique<sup>243</sup> (cf. figure 2.1B).



**Figure 2.1** : A/Schéma d'une bicelle et de ses constituants : a) 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) ; b) 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DHPC) ; c) 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate (CHAPSO) ; d) bicelle e) bicelle ayant incorporé une PM (ici la diacylglycérol kinase ou DAGK). B/Bicelles s'alignant sur le champ magnétique appliqué. Figure (version reprise et adaptée) extraite de l'article publié par Sanders & Prosser<sup>240</sup>.

Enfin, tout récemment le cytochrome b6f, une protéine transmembranaire, a été maintenu en solution avec succès en présence de tensioactifs mixtes perfluorohydrocarbonés neutres<sup>244,245</sup>. Ces tensioactifs sont des dérivés du THAM. Ils présentent une tête polaire Tris et une queue

hydrophobe constituée par une chaîne grasse hybride de type octahydro-1H,1H,2H,2H,9H,9H,10H,10H-perfluorodécyle.

Les chaînes perfluorées n'ont aucune affinité pour les sites hydrophobes hydrocarbonés et ce sont les groupements éthyle terminaux des chaînes qui très probablement sont à l'origine d'associations hydrophobes avec les sites lipophiles de la protéine. La protéine est maintenue en solution au sein d'une monocouche non micellaire de tensioactifs perfluorocarbonés *via* des interactions de type effet hydrophobe fluorophile.

Toutefois, les protéines membranaires ne sont pas toujours étudiées sous forme stabilisées au sein d'un agrégat micellaire ou vésiculaire. D'autres techniques ne faisant pas intervenir nécessairement des étapes d'extraction et de purification ont permis d'étudier les paramètres structuraux d'une protéine hydrophobe.

Par exemple, il a été montré qu'il était possible d'étudier par RMN (plus particulièrement par effet NOE) les associations protéine-ligands, le récepteur restant inclus dans la membrane native<sup>246</sup>.

La solubilisation dans des mélanges de solvants organiques pourrait représenter une autre alternative très prometteuse. L'étude conformationnelle de la sous-unité C de l'ATPase F1-F0 a en effet été effectuée dans un mélange de solvants organiques, milieu dans lequel la structure native de la sous-unité est conservée<sup>247</sup>. La méthode devra cependant être appliquée à l'étude de l'intégralité de la protéine pour faire réellement ses preuves.

Enfin, l'utilisation de polymères amphiphiles de faible masse moléculaire tels que les *amphipols*<sup>7-9</sup> permet également de maintenir certaines protéines transmembranaires en solution aqueuse. Cette dernière méthodologie nous est apparue très intéressante car peu de travaux concernant l'étude d'interactions polymères amphiphiles-protéine hydrophobes ont à ce jour été réalisés.

Excepté le travail publié dans le cadre des recherches sur les amphipols, une seule expérience<sup>248</sup> a été décrite dans la littérature. Ce travail a consisté à stabiliser la rhodopsine et la bactériorhodopsine en présence de « peptitergents ». Ces composés sont des polypeptides synthétiques formant des hélices  $\alpha$  amphipatiques c'est à dire qu'une face de l'hélice aura des propriétés hydrophiles et une autre face aura des propriétés hydrophobes.

Le maintien en solution des protéines par des structures polymères amphiphiles est une nouvelle approche. Le plus souvent, ces derniers étaient jusqu'à présent destinés à générer des interactions répulsives vis à vis des protéines.

Rappelons, en effet, que ces phénomènes d'interactions répulsives polymère-protéine ont été largement étudiés au cours de la dernière décennie et permettent de pallier les problèmes d'instabilité des vecteurs de principes actifs utilisés *in-vivo*. Il a été montré, en effet, qu'il est possible d'augmenter le temps de vie *in-vivo* d'une protéine ou d'un polypeptide (choisis comme vecteurs) en utilisant une forme de la protéine conjuguée à un polymère amphiphile<sup>249-252</sup>.

De même, il est possible d'augmenter le temps de vie d'un liposome en greffant ou en adsorbant à sa surface des polymères amphiphiles<sup>102,103,253,254</sup>. Ce gain de stabilité est dû à des interactions électrostatiques ou stériques<sup>255,256</sup> répulsives entre la couche de polymères adsorbés et toute autre particule (souvent des protéines du sang, les opsonines).

Ce phénomène occupe une place fondamentale dans le domaine histotechnologique. Par exemple, certaines techniques modernes consistent à remplacer des tissus endommagés par des matrices synthétiques de type hydrogel ou des réseaux amphiphiles, biocompatibles<sup>257-259</sup> n'entraînant donc pas de problème de rejet et n'induisant pas entre autres une adsorption anarchique de protéines ou de cellules.

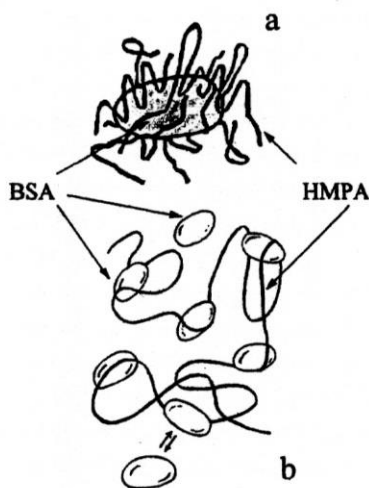
Les mécanismes de ces interactions dépendent en fait des propriétés d'interface entre matériel exogène et matériel endogène. De nombreuses investigations ont été menées à ce niveau notamment sur l'affinité des polymères ou des réseaux amphiphiles pour certaines protéines solubles telles que l'immunoglobine G<sup>260</sup> par exemple. Les interactions répulsives avec les protéines résultent dans la majorité des cas de la présence de sites hydrophiles à la surface du substrat, les mécanismes d'adsorption faisant intervenir principalement les sites hydrophobes de la protéine et du substrat.

Les études réalisées sur l'interaction polyacrylates modifiés-protéine<sup>88,89,261</sup> sont en ce sens très intéressantes car elles ont permis de montrer que les chaînes alkyles des HMPA pouvaient s'adsorber sur les domaines hydrophobes de certaines protéines hydrosolubles. Le mécanisme de l'adsorption est comparable à celui de l'adhésion d'un polymère à une surface.

L'association se produit aussi bien avec une protéine anionique (BSA) qu'avec une protéine cationique (Lysozyme), les interactions hydrophobes protéine-chaînes latérales étant plus fortes

que les répulsions électrostatiques polymère-protéine. L'association HMPA-BSA est dite anticoopérative, c'est à dire que l'affinité de la protéine pour le polymère ne devient pas plus importante lorsqu'un polymère est adsorbé sur un des sites hydrophobes de la protéine.

L'association ne dépend pas de la concentration en polymère dans le milieu aqueux mais elle dépend de ses propriétés hydrophobes (longueur des chaînes alkyles et taux de greffage) et de la concentration en protéine. Dans le cas de la BSA, une même chaîne macromoléculaire peut être liée à plusieurs protéines, chacune de ces dernières n'étant liée qu'à une seule chaîne macromoléculaire (cf. figure 2.2). Le nombre de liaisons (interactions chaînes latérales-sites hydrophobes) sera pratiquement identique au nombre de sites hydrophobes de la protéine (une chaîne latérale pour un site hydrophobe).

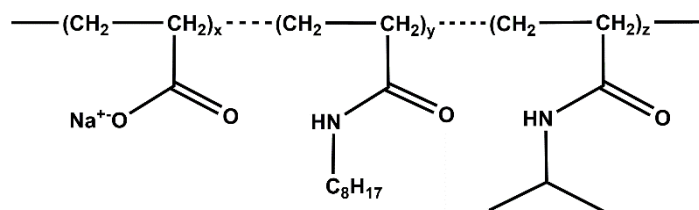


**Figure 2.2** : schéma de l'interaction polymère-protéine hydrosoluble pour des HMPA de faible masse moléculaire (a) et des HMPA de masse élevée (b) d'après Tribet *et al.*<sup>261</sup>. Figure (originale) extraite du même article.

La nature du complexe protéine-polymère dépend essentiellement de la masse du polymère<sup>261</sup>. En effet, les HMPA de masse moléculaire faible ( $MM \approx 5000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) ne se fixent plus sur plusieurs protéines mais, ont plutôt tendance à former des agrégats autour des sites hydrophobes de celles-ci. Le complexe formé est semblable à une coque constituée de petits polymères recouvrant l'intégralité de la surface de la protéine (cf. figure 2.2).

Tribet *et al.*<sup>7-9</sup> ont déjà établi qu'une telle complexation pouvait se produire en milieu aqueux entre une protéine transmembranaire hydrophobe (cytochrome *b6f* ou bactériorhodopsine) et des polymères de faible masse moléculaire dérivés des HMPA et baptisés *amphipols* (cf. figure 2.3).



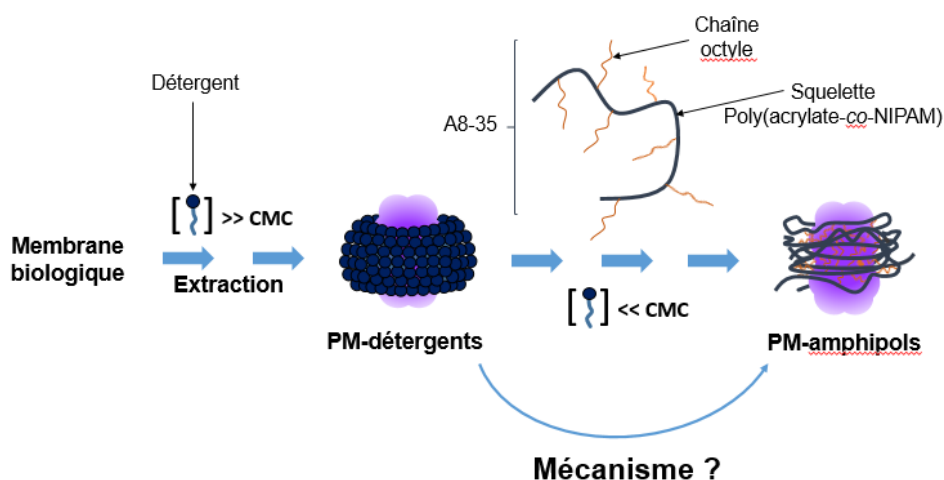


Nom	$\bar{M}_w$ (kg.mol <sup>-1</sup> )	$\bar{DP}_w$	x (%)	y (%)	z (%)
A8-75	≈ 8	≈ 70	≈ 75	≈ 25	0
A8-35	≈ 8	≈ 70	≈ 35	≈ 25	≈ 40
A34-75	≈ 34	≈ 280	≈ 75	≈ 25	0
A34-35	≈ 34	≈ 280	≈ 35	≈ 25	≈ 40

**Figure 2.3** : Exemple d'amphipols élaborés par Tribet *et al.*<sup>7</sup>. Le tableau renseigne la masse moléculaire moyenne en poids  $\bar{M}_w$ , le degré de polymérisation moyen en poids  $\bar{DP}_w$  et la composition chimique avec x, y et z les différentes fractions molaires exprimés en % par rapport au unités monomères.

Le complexe ainsi formé est très stable et permet le maintien de la protéine hydrophobe en solution aqueuse sous sa forme native. Ces amphipols diffèrent des HMPA classiques de par la présence d'une certaine proportion de groupements *n*-isopropyle le long de la chaîne macromoléculaire. Leur fonction est de limiter le nombre de charges du polyélectrolyte sans trop affecter l'hydrophilie de la macromolécule.

Les amphipols interviennent après l'étape d'extraction de la protéine membranaire. Ils sont mis en présence de micelles mixtes détergents-protéine et leurs chaînes alkyles latérales entrent en compétition avec les chaînes alkyles du détergent pour l'occupation des sites hydrophobes de la protéine (cf. Figure 2.4).



**Figure 2.4** : stabilisation d'une PM en amphipol A8-35. La PM est extraite en détergent au-delà de la CMC de celui-ci qui est échangé par la suite avec l'A8-35 (présent en excès) sous la CMC du détergent. Le mécanisme impliqué n'a pas encore été élucidé.

Après dilution du milieu, de façon à se placer à une concentration en tensioactif inférieure à sa CMC, et pour une concentration suffisante en amphipol, il y a formation d'un complexe amphipol-protéine très stable : l'association est quasi-irréversible et très rapide. Les complexes formés sont homogènes en taille, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'agrégation détectable entre les complexes. Après élimination du tensioactif, les amphipols maintiennent la protéine en solution sous sa forme native. Ils s'enroulent probablement autour des parties lipophiles de la protéine et constituent ainsi un arrangement supramoléculaire amphiphile (cf. Figures 2.4 et 2.5). Les fonctions carboxylate hydrophiles permettent de solubiliser l'assemblage moléculaire dans l'eau.



**Figure 2.5** : modélisation du complexe protéine-amphipol. PM et amphipol ont été représentés à l'échelle (diamètre  $\alpha$ -helice  $\approx 1$  nm; unités acrylique espacées les unes des autres de  $\sim 0.3$  nm; longueur de la chaîne octyle  $\approx 1$  nm; masse de polymère adsorbé estimée  $\approx 20$  kDa par mole de protéine). La longueur de persistance<sup>262</sup> (paramètre déterminant la rigidité des boucles), a été fixée à  $\approx 3$  nm. Elle dépend notamment de la densité de charge répartie le long de la chaîne macromoléculaire et de la force ionique du tampon. La fraction de chaîne alkyle n'interagissant pas avec le domaine transmembranaire de la protéine reste très hypothétique. Figure et légende extraites de l'article publié par Tribet *et al.*<sup>7</sup>.

Des résultats très encourageants ont pu être obtenus avec des protéines intégrales telles que le cytochrome *b6f*, la bacteriorhodopsine et la porine OmpF qui restent actives en solution pendant plus de deux semaines.

Le complexe formé comporte souvent un certain nombre de molécules de tensioactifs et de lipides résiduels; ce nombre évoluant suivant la protéine étudiée et la méthode d'extraction utilisée. Pour le complexe cytochrome *b6f*-amphipol, on dénombre 12 molécules de tensioactifs et  $36 \pm 22$  molécules de phospholipides par sous-unité. Le nombre d'amphipol dans le complexe est peu

élevé. Il varie en fonction de la protéine étudiée. Ce nombre est indépendant de la concentration en polymère. Il a été estimé que le nombre de chaînes alkyles adsorbées à la surface de la protéine évoluait entre 100 et 200 soit 5 à 10 polymères par protéine.

Plusieurs paramètres interviennent sur la stabilité du complexe protéine-amphipol :

- **la concentration en tensioactif**, lorsque le complexe est mis en présence d'un tensioactif (neutre ou chargé), si la concentration de celui-ci est proche ou supérieure à la CMC, il est alors possible d'assister à la désorption du polymère à la surface de la protéine et à la formation de complexes protéine-tensioactif et amphipol-tensioactif ;
- **le pH et la force ionique du milieu**, les protéines étudiées sont stables pour un pH pouvant varier entre 6 et 8. A pH basique toutes les fonctions carboxyliques sont ionisées, les répulsions électrostatiques sont maximales. Bien que les interactions hydrophobes soient beaucoup plus fortes que les répulsions électrostatiques, la composition du complexe est plus stable lorsque la force ionique augmente et que les répulsions coulombiennes sont atténuées ;
- **la concentration en amphipol** qui doit être suffisamment importante pour que tous les sites hydrophobes de la protéine soient associés aux chaînes latérales du polymère. Il a été montré qu'il suffisait que des traces d'amphipols libres subsistent dans le milieu pour que la complexation soit totalement irréversible.

Les résultats obtenus avec les amphipols sont donc très positifs et ceci en dépit du fait que ces polymères soient chargés. Rappelons en effet que les détergents ioniques dénaturent très souvent les protéines<sup>263</sup>.

Toutefois, nous ne pouvons négliger le fait que la nature polyélectrolytique des amphipols pourrait présenter quelques inconvénients avec certaines protéines car sans avoir une grande influence sur la stabilité du complexe, les interactions coulombiennes répulsives peuvent par exemple gêner l'approche d'un substrat chargé lorsqu'une étude de l'activité enzymatique est effectuée<sup>7</sup>. Dans ce cas les résultats pourraient être faussés.

Divers autres inconvénients et avantages liés à la charge portée par l'A8-35 pourraient être envisagés, rencontrés ou découverts au cours des années avenir, et l'aspect essentiel préoccupant les biochimistes concerne la facilité avec laquelle il serait envisageable de procéder à la cristallisation des PMs stabilisées en amphipols. La cristallisation étant, rappelons-le, une étape

essentielle de l'étude structurale des biomolécules par diffraction des rayons X, technique actuellement la plus résolutive.

La cristallisation supposant un rapprochement des différents complexes PM-amphipol et l'organisation de ces derniers dans un réseau régulier, la répulsion coulombienne pouvant subsister entre les complexes chargés semblerait donc compromettre cette perspective.

*Il paraissait donc intéressant, afin d'éliminer tout phénomène lié à une quelconque interaction électrostatique protéine-amphipol, amphipol-substrat ou amphipol-amphipol, de disposer d'une structure neutre présentant les mêmes propriétés que les amphipols chargés.*

Dans ce but nous nous sommes proposés de synthétiser des amphipols neutres dérivés du THAM. Ce monomère est tout à fait approprié à l'obtention de macrostructures amphiphiles, ses fonctions alcool pouvant être facilement fonctionnalisées par des groupements hydrophiles (glycosides par exemple) ou hydrophobes (chaînes alkyles).

Nous avons décrit dans ce deuxième chapitre, le travail de synthèse de ces nouvelles classes d'amphipols mais aussi les résultats obtenus lors des essais biochimiques réalisés avec différentes protéines membranaires.

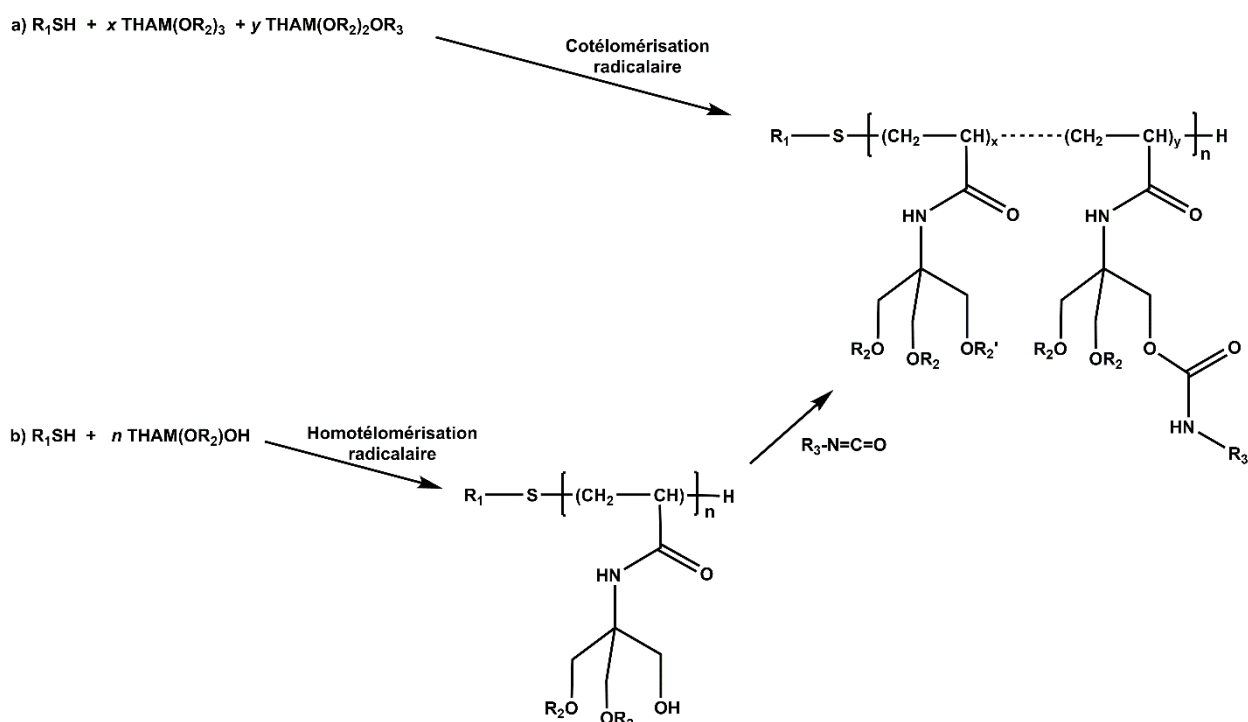
## II) SYNTHÈSE D'AMPHIPOLS NEUTRES DÉRIVÉS DU THAM

### 1) Stratégie de synthèse envisagée

Le but du travail entrepris, inspiré des résultats reportés par Tribet *et al.*<sup>7</sup>, a été de synthétiser des polymères amphiphiles non ioniques de taille réduite et présentant si possible une distribution aléatoire des greffons hydrophobes le long de la chaîne macromoléculaire.

Ces amphipols neutres pouvaient correspondre à des cotélomères dérivés du THAM. Les fonctions alcool du monomère (THAM) pouvaient constituer les sites hydrophiles de l'édifice macromoléculaire alors que des chaînes grasses greffées sur quelques-unes des fonctions alcool du cotélomère pouvaient conférer l'hydrophobie recherchée.

Enfin, de façon à accentuer l'hydrophilie du télomère si nécessaire, il était toujours envisageable d'utiliser le dérivé mono, di ou trigalactosylé du THAM (cf. figure 2.6).



**Figure 2.6 :** stratégie de synthèse et structure envisagées pour les amphipols neutres dérivés du THAM. Deux voies de synthèse ont été envisagées : a) cotélomérisation d'un monomère hydrophile avec un monomère hydrophobe,  $R_1$  et  $R_3$  sont deux chaînes grasses,  $R_2$  représente soit un proton soit un motif  $\beta$ -D-galactopyranosyle,  $R_2'$  sera identique à  $R_2$ ,  $x$  et  $y$  sont respectivement les fractions molaires en monomère hydrophile et monomère hydrophobe et  $n$  est le  $\overline{DP}_n$  du cotélomère ; b) modification hydrophobe d'un homotélomère précurseur,  $R_2$  est un groupement protecteur,  $R_2'$  est un proton et les autres variables telles que définies en a).

Ces cotélobères dérivés du THAM pouvaient être obtenus en utilisant deux méthodes différentes qui étaient la cotélobérisation de deux comonomères et la modification hydrophobe d'un homotélobère du THAM.

a) *Cotélobérisation de deux monomères appropriés dérivés du THAM.*

Cette méthode consistait à copolymériser par voie radicalaire le monomère porteur d'une chaîne grasse avec le monomère hydrophile en présence d'un agent télogène permettant de contrôler efficacement la taille de la macromolécule (cf. figure 2.6 cas a)). Dans ce cas précis, elle dépendait des concentrations initiales en monomères et en agent télogène (cf. Chapitre I). Nous avons choisi d'utiliser un agent télogène hydrophobe qui était un thiol à longue chaîne alkyle, ce qui permettait d'introduire facilement un motif hydrophobe supplémentaire (cf. Chapitre I).

La stratégie envisagée ici, était aussi justifiée par le fait que la télobérisation du THAM et de ses dérivés était parfaitement maîtrisée au laboratoire (cf. Chapitre I). De plus, si les différentes méthodes de polymérisation radicalaire contrôlée développées plus récemment étaient réputées pour être très efficaces, leur domaine d'application se limitait à la polymérisation du styrène ou des acrylates d'alkyle<sup>264-268</sup>, et restaient incompatibles avec les acrylamides<sup>269</sup>.

Le rapport du nombre d'unités hydrophobes au nombre d'unités hydrophiles (et donc la HLB de la macromolécule) était essentiellement fonction des proportions initiales  $x$  et  $y$  des différents monomères si nous considérons, en première approximation, que leur réactivité était comparable et que les effets de solvant pouvaient être négligés.

Les résultats obtenus dans le premier chapitre montraient que cette approximation n'était valable qu'à partir du moment où les deux comonomères étaient protégés par un même type de groupement protecteur (faible écart de réactivité observé entre le monomère monoacétylé **5** et le monomère triacétylé **7**).

Les essais préliminaires devaient permettre de vérifier la validité de cette hypothèse et de définir les conditions les mieux adaptées à la préparation de ces cotélobères en analysant leur composition finale. Ceci restant cependant seulement une approximation, l'évaluation rigoureuse de la microstructure des télobères exigeant une série d'expériences supplémentaires (analyse de la microstructure des télobères finaux par RMN  $^{13}\text{C}^{270}$  ou des compositions des milieux réactionnels et des cotélobères formés au cours du temps<sup>271</sup>) que nous n'étions plus en mesure de produire.

b) *modification hydrophobe d'un télomère du THAM.*

Cette deuxième technique implique de télomériser un dérivé du THAM présentant deux de ses fonctions alcool protégées; de greffer ensuite un certain pourcentage de chaînes grasses sur les fonctions alcool du télomère obtenu et enfin de cliver les protections mises en jeu pour obtenir le produit final (cf. figure 2.6 cas b)).

Cette méthode est couramment utilisée pour la synthèse de polymères amphiphiles tels que les amphipols, ils sont en effet obtenus en faisant réagir les amines (octylamine et isopropylamine) sur un acide polyacrylique précurseur. La neutralisation des fonctions acide par action du méthylate de sodium conduit à la formation du produit final.

Cette méthode présente l'avantage d'être plus rapide et moins onéreuse que la copolymérisation de monomères hydrophiles-monomères hydrophobes car elle n'implique pas la synthèse des comonomères. Elle permet de disposer d'une quantité importante de polymère initial et donc de pouvoir travailler sur de grandes quantités de structures amphiphiles. Les différents échantillons sont donc tous issus d'une même macromolécule et ne diffèrent que par leur taux de greffage de chaînes grasses.

Elle présente cependant un inconvénient qui réside dans le fait que la réactivité des sites le long de la chaîne macromoléculaire peut varier de façon significative et il est difficile de savoir si la totalité du réactif a été consommée. De plus, il paraît difficile dans le cas présent de greffer, dans de bonnes conditions, des motifs galactose sur la macromolécule. Nous n'avons jamais tenté d'appliquer le procédé d'Elfeirich à la glycosylation de macromolécules polyhydroxylées mais nous pouvons supposer que cette technique est mal adaptée. En effet, les rendements obtenus après galactosylation du monomère étant souvent peu élevés (< 60 %), il est difficilement envisageable de glycosyler quantitativement un télomère du THAM (ou d'un monomère dérivé).

Il est donc nécessaire de définir dans un premier temps les conditions de synthèse qui permettront de bénéficier d'une réactivité maximale des sites hydroxyle de l'homopolymère et des réactifs de greffage utilisés. Le taux de conversion de chaînes libres en chaînes greffées doit être proche de 100 % de façon à s'assurer une nouvelle fois du contrôle de la HLB de la macromolécule par simple modulation des concentrations initiales en réactifs utilisés.

Compte tenu des avantages et des inconvénients présentés respectivement par ces deux techniques, nous avons décidé de mettre en œuvre dans un premier temps les deux techniques de

synthèse afin de déterminer, après comparaison des résultats apportés par chacune d'elles, quel était le procédé le mieux adapté à l'élaboration de nos amphipols.

Nous nous sommes intéressés initialement à la cotélomérisation car elle permettait de disposer d'un choix plus important de structures amphiphiles (galactosylées ou non galactosylées).

## **2) Synthèse d'amphipol par cotélomérisation de monomères dérivés du THAM**

Des essais préliminaires ont montré qu'il était difficile de cotélomériser le THAM avec des monomères dérivés de ce dernier. Les différences de solubilité et notamment de réactivité des monomères ont souvent conduit à l'homotélomérisation de l'espèce la plus réactive (le THAM). La nécessité d'utiliser des monomères protégés était donc évidente.

La protection des fonctions hydroxyles du THAM permettait de diminuer la vitesse de réaction, comme nous l'avons précisé précédemment (cf. chapitre I), ce qui réduisait le risque de polymérisation thermique souvent rencontré avec le THAM. Par ailleurs, le contrôle de la taille de la molécule par transfert à l'agent télogène introduit dans le milieu réactionnel était favorisé.

Elle permettait aussi de masquer les propriétés hydrophiles ou amphiphiles du monomère devenu parfaitement organosoluble. La formation d'agrégats de type micellaire ou autre était ainsi peu probable voire impossible. Il était alors permis de penser, si les constantes de vitesse des différents monomères étaient comparables, que l'incorporation de chaque monomère au sein de la macromolécule restait constante au cours du temps.

Dans ce cas, la distribution des chaînes latérales le long de la chaîne macromoléculaire devait être statistique. Les proportions initiales  $x$  et  $y$  des différents monomères devaient être comparables sinon identiques à celles de la macromolécule finale, assurant ainsi le contrôle de la balance hydrophile-lipophile.

Nous avons réalisé plusieurs expériences afin de vérifier ces hypothèses en procédant à la cotélomérisation de différents monomères, dans différentes conditions. Ce travail a nécessité dans un premier temps la synthèse de toute une série de monomères dérivés du THAM, tous solubles en phase organique et dotés de groupements protecteurs des fonctions alcool.



## 2.1) Synthèse des monomères

Comme il a été montré dans le premier chapitre, les dérivés du THAM dont les fonctions alcool sont protégées, présentent une réactivité moindre et une meilleure solubilité dans les solvants organiques. De plus, après cotélomérisation de ces monomères, les réactions de déprotection doivent permettre de disposer, assez facilement, des macrostructures attendues avec un rendement et une pureté acceptables.

Ces critères nous ont amenés à bloquer les fonctions alcool des monomères, soit par des motifs acétyle, soit par des motifs isopropylidène. La déprotection de tels groupements générant des sous-produits facilement éliminés, car volatils, et les réactions utilisées (hydrolyse acide ou méthanolyse basiques) étaient des réactions simples effectuées dans des conditions peu drastiques avec des rendements généralement quantitatifs. Rappelons enfin, que l'impact de la présence de tels groupements sur la vitesse de polymérisation a été étudié en détail dans le premier chapitre.

### *2.1.1) Synthèse des monomères porteurs de chaîne grasse*

Plusieurs types de chaînes grasses de nature perhydro- ou perfluorocarbonée et de longueur variable (C7 à C17) ont été choisis, ceci afin, d'une part, d'étudier l'influence du caractère hydrophobe de ces télomères sur leurs propriétés biochimiques et, d'autre part, de préciser si un cotélomère amphiphile doté de chaînes latérales fluorées pouvait se comporter comme un amphipol.

Il faut se rappeler ici, que les chaînes fluorées sont supposées n'avoir aucune affinité particulière pour un domaine hydrophobe constitué de groupements perhydrocarbonés tel que les sites hydrophobes d'une protéine membranaire.

Les tests biologiques devaient apporter une réponse à cette question.

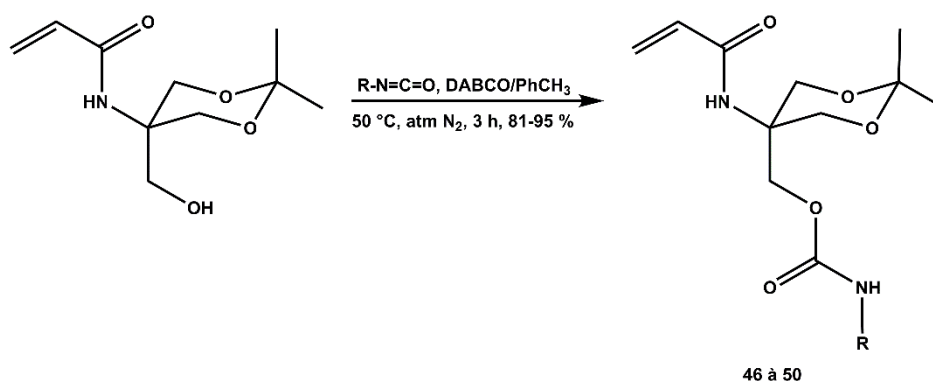
Les amphipols modèles (A8-35) comportant des chaînes octyle, la longueur minimale des chaînes a été fixée à sept atomes de carbone et la longueur maximale à dix-sept atomes de carbone.

La chaîne grasse a été introduite en faisant réagir sélectivement un isocyanate d'alkyle sur une seule des fonctions alcool du THAM. Ceci a été possible en utilisant le THAM isopropylidène **3** dont la synthèse a été décrite dans le premier chapitre. Cette réaction a été effectuée dans le toluène anhydre à 50°C sous atmosphère inerte et en présence d'une base encombrée, le diazabicyclo-

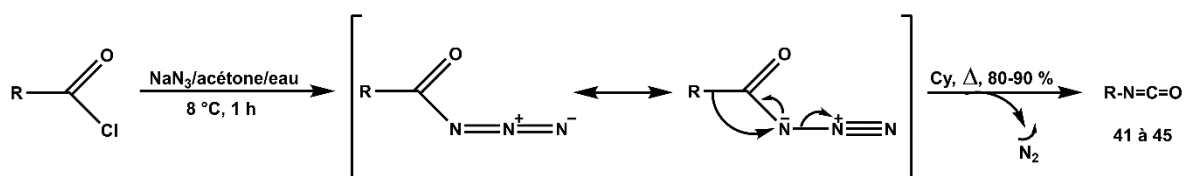
octane (DABCO). Nous avons ainsi obtenu un uréthane ou ester d'un acide carbamique (cf. figure 2.7A).

Les isocyanates hydrophobes ont été synthétisés au laboratoire en faisant réagir l'azoture de sodium sur le chlorure d'acide. L'azoture d'acyle obtenu est instable et sous action de la chaleur se réarrange en isocyanate (réarrangement de Curtius). Les chlorures d'acide à chaîne perhydrocarbonée sont commerciaux et ceux à chaîne perfluorocarbonée ont été synthétisés au laboratoire en faisant réagir le chlorure de thionyle sur l'acide correspondant (cf. figure 2.7B).

**A**



**B**



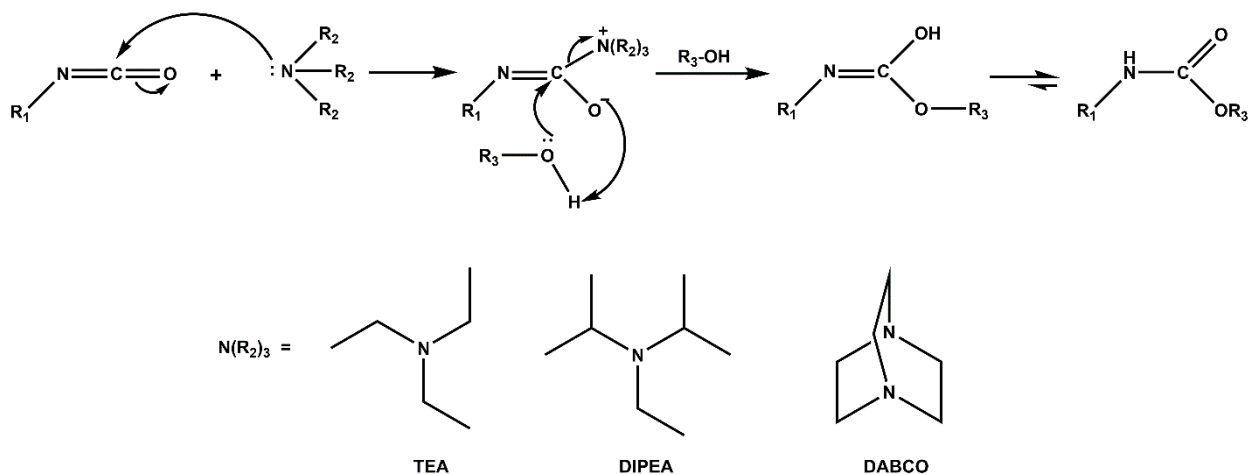
**Figure 2.7 :** **A**/Synthèse des monomères hydrophobes dérivés du THAM. **B**/Synthèse des isocyanates d'alkyle. La fonction isocyanate est issue du réarrangement du Curtius se produisant sur l'azoture d'acyle porté à 80 °C dans le cyclohexane (Cy).

Dans le tableau 2.1 ci-après sont répertoriés les noms des isocyanates, des monomères hydrophobes et les rendements obtenus en fonction de la chaîne alkyle utilisée.

Isocyanate	R	Rendement	Uréthane	Rendement	F (°C)
<u>41</u>	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	80 %	<u>46</u>	87 %	83,5
<u>42</u>	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub>	80 %	<u>47</u>	90 %	84,5
<u>43</u>	C <sub>17</sub> H <sub>35</sub>	90 %	<u>48</u>	90 %	91,6
<u>44</u>	C <sub>6</sub> F <sub>13</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	90 %	<u>49</u>	81 %	128,4
<u>45</u>	C <sub>8</sub> F <sub>17</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	80 %	<u>50</u>	95 %	136,3

**Tableau 2.1 :** Rendements obtenus lors de la synthèse des différents isocyanates et uréthanes correspondants. Les points de fusion sont donnés pour chaque monomère.

La réaction des alcools sur les isocyanates, catalysée par un nucléophile azoté a été très étudiée<sup>272-275</sup>. La première étape de la réaction consiste en la formation d'un complexe amine-isocyanate. Ce complexe va réagir avec l'alcool pour former un uréthane (cf. figure 2.8).



**Figure 2.8** : mécanisme de formation des uréthanes catalysée par les amines tertiaires. La triéthylamine (TEA), la diisopropyléthylamine (DIPEA) et le DABCO sont donnés comme exemples de catalyseurs pouvant être employés dans le cadre de ces réactions.

Les auteurs préconisent l'utilisation du DABCO<sup>274,275</sup> (cf. figure 2.8) comme catalyseur car les doublets électroniques en tête de pont sont particulièrement accessibles et l'amine est donc très réactive. Cette base présente en quantité catalytique dans le milieu réactionnel favorise les échanges de protons entre les fonctions alcool et isocyanate. Il semblerait également que la réaction soit plus rapide dans les solvants apolaires tels que le benzène<sup>276</sup>. Pour notre part nous avons porté notre choix sur le toluène beaucoup moins toxique.

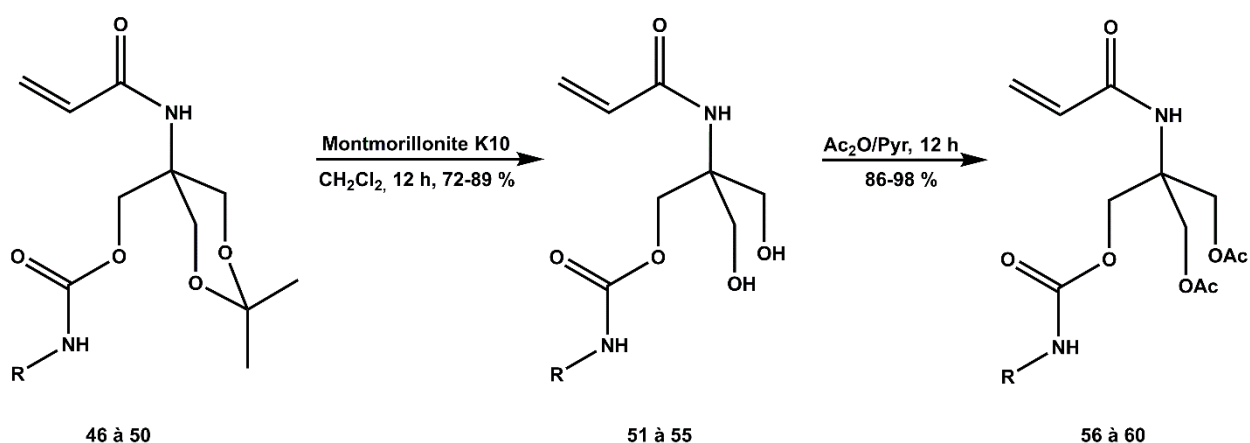
La réactivité des produits utilisés a été très bonne (les isocyanates fluorés ont réagi en une dizaine de minutes) et la réaction a conduit à l'uréthane attendu avec des rendements de l'ordre de 90 % (cf. tableau 2.1).

Les différents uréthanes obtenus ont été facilement purifiés par chromatographie sur silice, puis par cristallisation. La liaison uréthane formée présentait l'avantage d'être introduite dans des conditions douces et avec des rendements quantitatifs. Elle était de plus très stable et ne pouvait être hydrolysée que dans des conditions drastiques.

Les monomères obtenus étaient parfaitement organosolubles et pouvaient donc être utilisés pour la réaction de cotéomérisation. Cependant, pour des raisons pratiques (qui seront explicitées

ultérieurement dans l'exposé), nous avons préféré substituer le groupement isopropylidène de ce monomère par deux groupes acétyles.

L'hydrolyse de l'isopropylidène a été effectuée dans le dichlorométhane en présence de montmorillonite K10 et a conduit aux dérivés dihydroxylés avec des rendements de l'ordre de 85 % (cf. figure 2.9 et tableau 2.2). Il faut préciser ici que les mélanges eau/acide acétique sont proscrits à ce niveau, essentiellement à cause du caractère amphiphile et du fort pouvoir moussant des monomères obtenus, observé en solution aqueuse.



**Figure 2.9** : schéma de synthèse des monomères hydrophobes acétylés.

Uréthane obtenu après hydrolyse	R	Rdt	Uréthane obtenu après acétylation	Rdt	F (°C)
<b>51</b>	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	85 %	<b>56</b>	98 %	84
<b>52</b>	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub>	88,7 %	<b>57</b>	92 %	101,2
<b>53</b>	C <sub>17</sub> H <sub>35</sub>	85 %	<b>58</b>	86 %	101,8
<b>54</b>	C <sub>6</sub> F <sub>13</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	82 %	<b>59</b>	86 %	-
<b>55</b>	C <sub>8</sub> F <sub>17</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	72,7 %	<b>60</b>	90 %	-

**Tableau 2.2** : rendements des synthèses des monomères diol **51** à **55** et des monomères diacétylés **56** à **60**.

L'acétylation des alcools obtenus a été réalisée dans un mélange anhydride acétique/pyridine (1/1) et conduit aux dérivés bis-acétoxy avec des rendements pratiquement quantitatifs (cf. figure 2.9 et tableau 2.2). Dix monomères (**56** à **60** et **46** à **50**) dotés de chaînes grasses et utilisables pour les réactions de cotélomérisation étaient dès lors disponibles.

### 2.1.2) Synthèse de monomères destinés à constituer les parties hydrophiles de l'amphipol

Ces monomères correspondaient en fait à des formes organosolubles du THAM ou des dérivés galactosylés du THAM. Ces dérivés sur lesquels les fonctions hydrophiles ont été bloquées, sont

conservés et polymérisés sous leur forme hydrophobe. L'hydrolyse finale des groupes protecteurs devaient permettre de récupérer l'hydrosolubilité attendue.

Différents types de protection déjà utilisés et décrits dans le premier chapitre étaient envisageables mais nous nous sommes limités à utiliser soit le THAM triacétylé (**7**), soit le THAM isopropylidène (**3**) dont les synthèses et méthodes de déprotection mettaient en oeuvre des techniques simples.

Après polymérisation, les protections acétylées devaient être facilement éliminées par méthanolyse en milieu légèrement basique et les fonctions cétales clivées par hydrolyse acide ménagée.

La structure du THAM offrait par ailleurs l'opportunité de pouvoir disposer de dérivés mono, di ou tri galactosylés. De tels motifs devraient renforcer l'hydrophilie de la structure polymère.

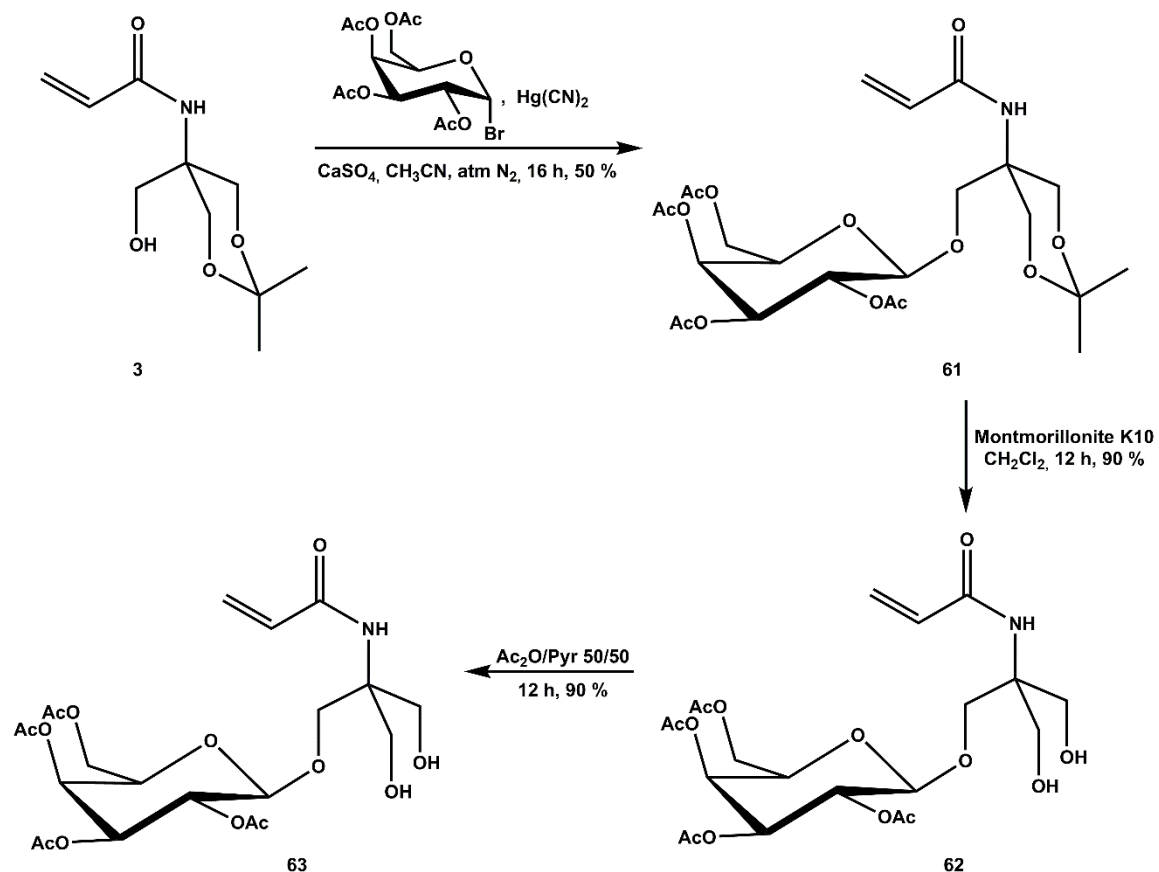
Les galactosylations ont été effectuées selon la méthode de Helferich<sup>277</sup> qui a consisté à traiter un alcool par un bromure de glycosyle en présence d'un acide de Lewis tel que le cyanure mercurique.

Le dérivé monogalactosylé est obtenu en traitant le THAM isopropylidène par un excès d'acétochromogalactose et de cyanure mercurique, dans l'acétonitrile sous atmosphère d'azote en présence de drierite. Le composé attendu **61** est ainsi obtenu avec un rendement de 50 % (cf. figure 2.10).

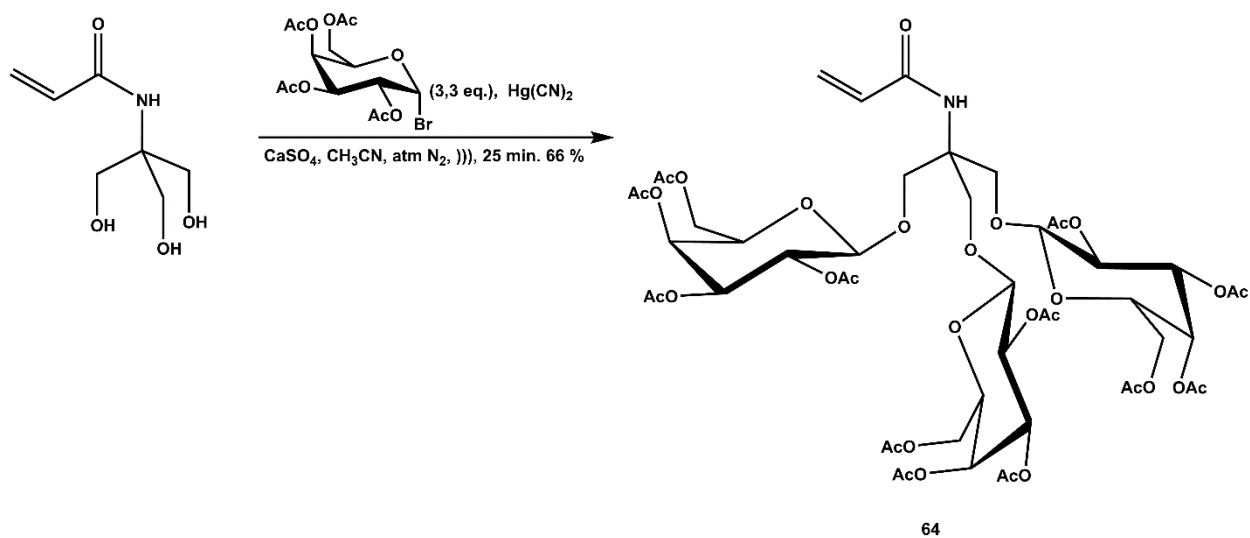
Les RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C ont permis de vérifier que nous avons obtenu un seul isomère qui était l'anomère β (signal du proton H<sub>1</sub> à 4,44 ppm et signal du carbone anomère à 101,61 ppm).

La forme peracétylée **63** du monomère monogalactosylé **61** peut être obtenue en clivant la fonction cétale par hydrolyse acide et en acétylant le diol **62** obtenu (cf. figure 2.10).

Le dérivé trigalactosylé **64** est obtenu avec un rendement supérieur à 60 % en utilisant le même procédé de synthèse et en provoquant une ultrasonication du milieu réactionnel. La sonication permet d'augmenter les rendements et la vitesse de réaction. La synthèse des dérivés trigalactosylés du Tris a été mise au point au laboratoire par A. Polidori<sup>191</sup> (cf. figure 2.11).



**Figure 2.10** : schéma de synthèse des monomères monogalactosylés.



**Figure 2.11** : schéma de synthèse du THAM trigalactosylé (THAM triGal) **64**.

Précisons qu'il n'a pas été possible d'utiliser la sonication lors de la glycosylation du composé **3**, car le groupe isopropylidène relativement labile devenait alors particulièrement sensible à l'acidité du catalyseur et subissait une "protonolyse". Les deux fonctions alcool déprotégées étaient à leur tour susceptibles de réagir et la réaction conduisait à un mélange de dérivé mono, di ou trigalactosylé.

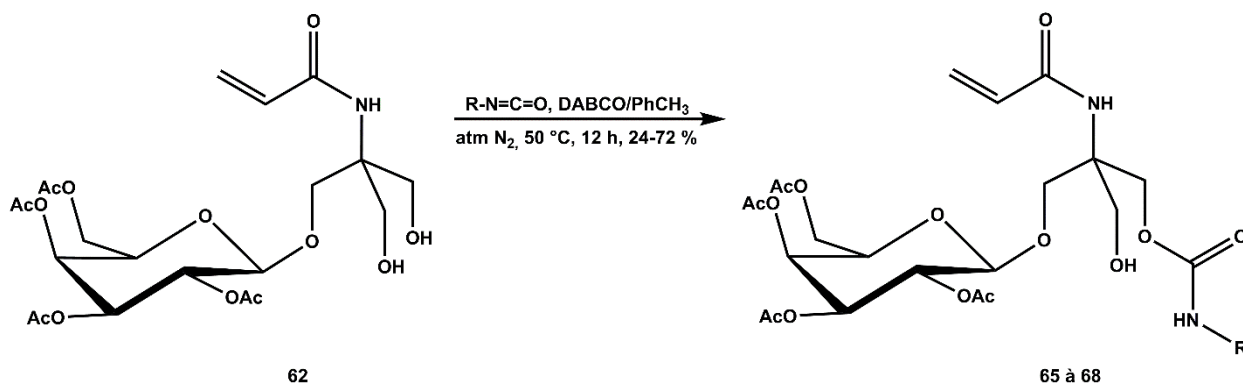
Nous disposons donc de plusieurs monomères solubles en phase organique dont la cotélomérisation pouvait nous permettre d'accéder aux macrostructures attendues. Cependant, de façon à élargir notre champ d'investigation, il nous a paru intéressant de procéder à la synthèse d'une troisième série de monomères qui présenteraient la particularité de pouvoir conférer à l'amphipol simultanément des propriétés hydrophiles et hydrophobes. Ces monomères correspondaient aux formes protégées de tensioactifs polymérisables dérivés du Tris.

### 2.1.3) Synthèse des formes protégées des monomères amphiphiles

Ces monomères sont des dérivés mono ou digalactosylés du THAM sur lesquels a été greffée une chaîne grasse. Les propriétés amphiphiles potentielles de telles structures ont été une fois encore parfaitement masquées par les protections utilisées, ce qui a permis de polymériser ces monomères en milieu organique.

#### 2.1.3.1) Synthèse des dérivés amphiphiles monogalactosylés

Ces composés ont été obtenus en traitant le THAM monogalactosylé **62** par un équivalent d'alkylisocyanate dans le toluène à 50°C et sous atmosphère inerte. Les rendements de synthèse ont évolué entre 20 et 70 % suivant la chaîne grasse greffée (cf. figure 2.12 et tableau 2.3).



**Figure 2.12** : schéma de synthèse des dérivés amphiphiles monogalactosylés du THAM.

Uréthane	R	Rendement
<b>65</b>	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	52 %
<b>66</b>	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub>	72 %
<b>67</b>	C <sub>17</sub> H <sub>35</sub>	56 %
<b>68</b>	C <sub>8</sub> F <sub>17</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	24 %

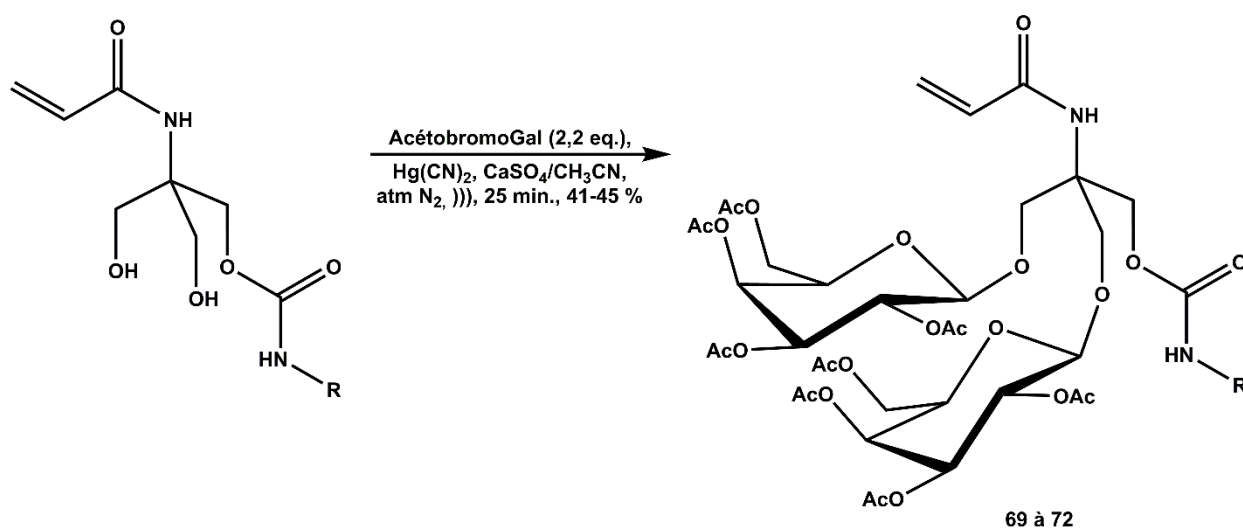
**Tableau 2.3** : Rendements obtenus lors de la synthèse des monomères amphiphiles monogalactosylés **65** à **68**.

Nous avons ainsi observé une disparité marquée des rendements de synthèse suivant le type et la longueur de chaîne alkyle introduite sur le monomère de départ **62**. Nous n'avons cependant pas pu entreprendre de travaux d'investigation supplémentaires visant à comprendre les mécanismes à l'origine de telles différences.

Ces travaux seront très certainement abordés, dans un avenir proche ou lointain, au laboratoire dans le cadre de projets de développement construits autour de la synthèse à échelle multigramme des amphipols neutres.

### 2.1.3.2) Synthèse des dérivés amphiphiles digalactosylés

Les dérivés digalactosylés ont été obtenus quant à eux en galactosylant les deux fonctions alcool du THAM sur lequel a été préalablement greffée une chaîne grasse. La galactosylation a été effectuée suivant le protocole précédemment décrit (cf. section 2.1.2) et a conduit aux produits attendus avec des rendements peu élevés de l'ordre de 40 % (cf. figure 2.13 et tableau 2.4).



**Figure 2.13** : schéma de synthèse des dérivés amphiphiles digalactosylés du THAM.

URETHANE	R	Rendement
<b>69</b>	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	45 %
<b>70</b>	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub>	42 %
<b>71</b>	C <sub>17</sub> H <sub>35</sub>	41 %
<b>72</b>	C <sub>8</sub> F <sub>17</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	41 %

**Tableau 2.4** : rendement obtenu lors de la synthèse des monomères digalactosylés **69** à **72**.

Les rendements plus homogènes sont restés faibles et comme dans le cas précédent, un travail de mise au point, sur lequel nous n'avons pu nous attarder dans le cadre de cette thèse, devra être entrepris.



*Le premier objectif qui consistait à préparer plusieurs structures polymérisables organosolubles susceptibles de se comporter comme des agents hydrophobes, hydrophiles ou amphiphiles avait été atteint. Il était dès lors nécessaire d'effectuer diverses expériences de cotélomérisation de ces monomères de façon à améliorer la synthèse ainsi que les propriétés physicochimiques et biologiques des amphipols.*

## 2.2) Synthèse des cotélomères

Il faut rappeler ici, que la taille et la HLB de la macromolécule devaient être parfaitement contrôlées, car ces deux paramètres définissaient les propriétés complexantes de l'amphipol.

Le  $\overline{DP}_w$  des amphipols dérivés de type polyacrylate évolue entre 70 et 280 ( $8000 < \overline{M}_w < 34\ 000$ ) et le taux de greffage des chaînes lipophiles par rapport aux unités monomères est de l'ordre de 25 %. Ce taux est assez élevé mais le polyacrylate conserve une très bonne hydrosolubilité.

La cotélomérisation des monomères protégés, dérivés du THAM, devait permettre d'élaborer une macromolécule amphiphile dont la distribution des chaînes latérales hydrophobes était aléatoire et dont la HLB et la taille devaient être facilement modulables.

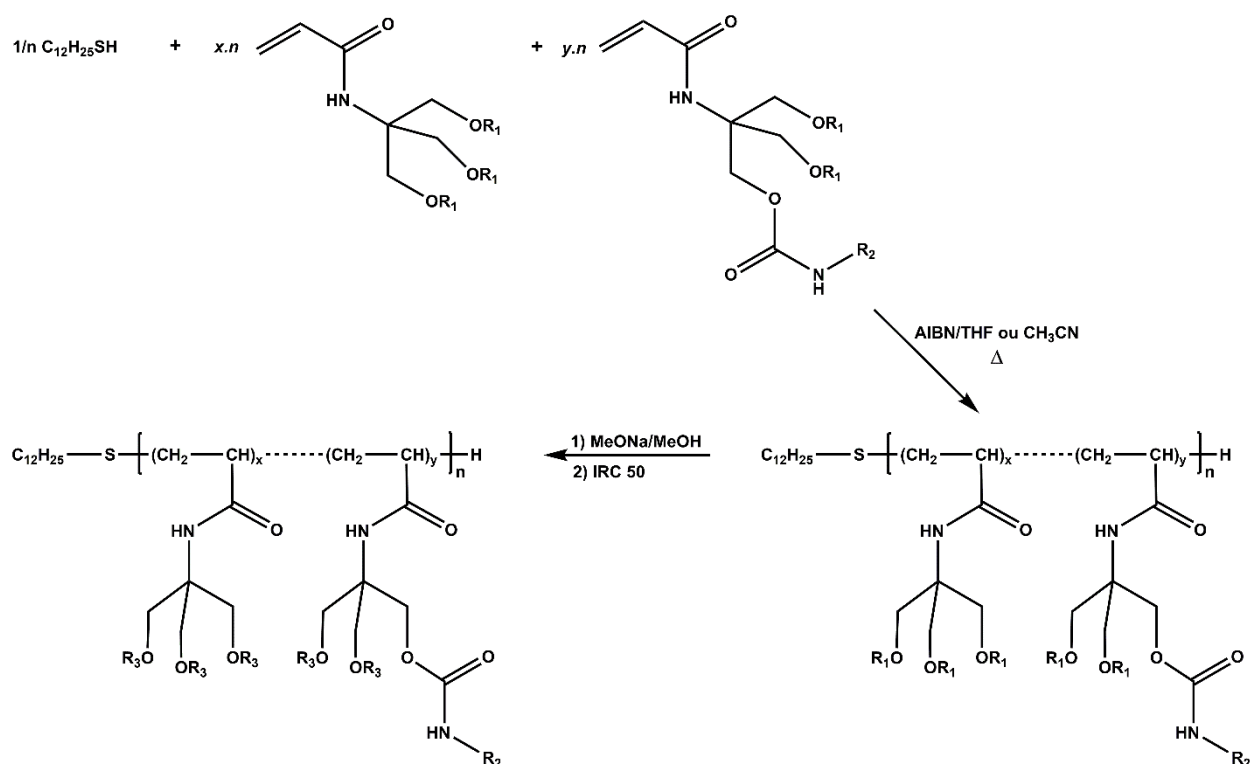
Pour vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à plusieurs essais en utilisant différents monomères dans différents solvants et à différentes concentrations. Le seul paramètre resté invariant au cours de ces expériences a été l'agent télégène, le dodécane-thiol. L'influence de l'agent télégène sur la réaction a donc été identique pour toutes les expériences.

### 2.2.1) *Procédé de synthèse*

Deux méthodes étaient envisageables compte tenu des deux catégories de monomère dont nous disposions.

#### 2.2.1.1) Synthèse d'amphipols neutres par cotélomérisation de dérivés acétylés du THAM

Les monomères acétylés ont été cotélomérisés dans le THF ou l'acétonitrile en présence d'AIBN (cf. figure 2.14). Les cotélomères obtenus ont été purifiés par exclusion de taille sur colonne Séphadex LH20 et leur structure ont été analysée en RMN  $^1\text{H}$  (cf. figure 2.15).

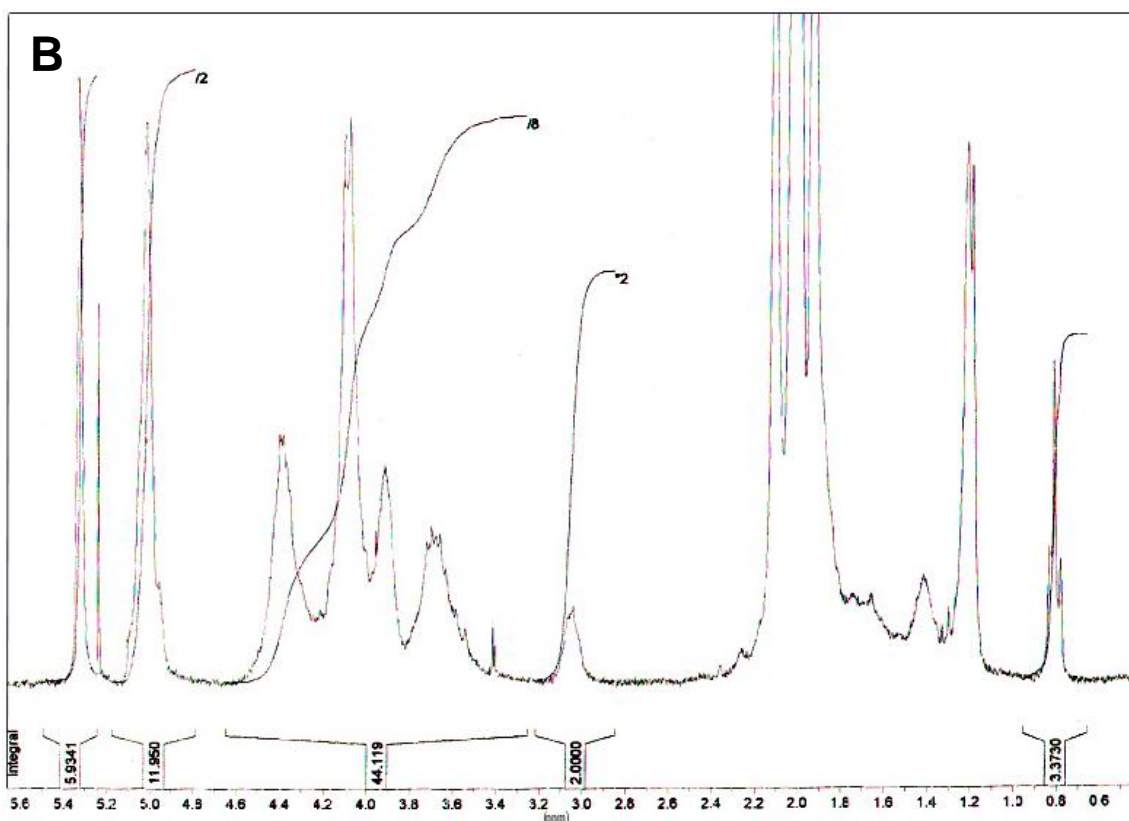
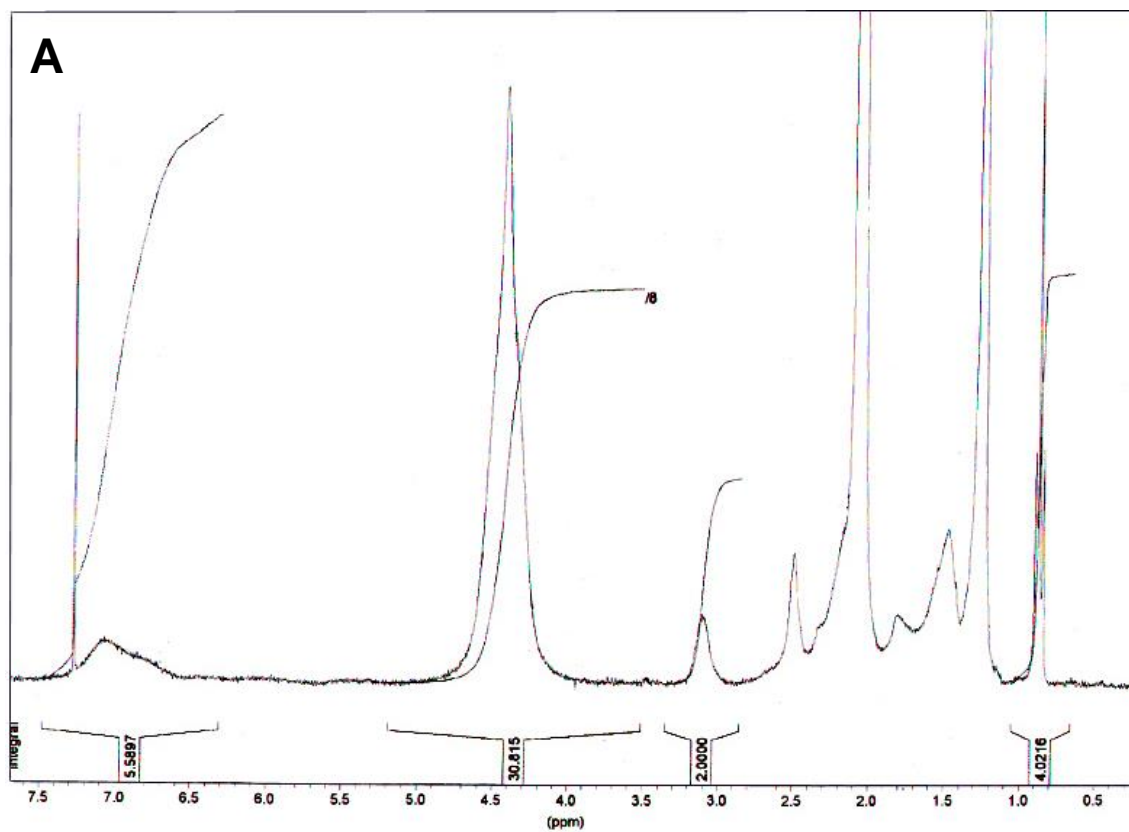


**Figure 2.14** : synthèse d'amphipol par cotélomérisation de monomères acétylés.  $R_1$  = acétyle ou 2,3,4,6-tétra(*O*-acétyl)- $\beta$ -D-galactopyranosyle ;  $R_2$  = *n*-heptyle (*n*-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>-) ou *n*-undécyle (*n*-C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>-) ou *n*-heptadécyle (*n*-C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>-) ou *n*-1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6-tridécafluorooctyle (*n*-C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) ou *n*-1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-heptadécafluorodécyle (*n*-C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) ;  $R_3$  = hydroxyle (-OH) ou  $\beta$ -D-galactopyranosyle.

La technique d'analyse structurale mise en œuvre (dont une description détaillée figure dans la partie expérimentale) présentait une certaine marge d'erreur sachant que les approximations effectuées lors des différentes opérations mathématiques de l'appareil de RMN (transformée de Fourier, intégration ...) pouvaient souvent compromettre l'exactitude des résultats. Cependant, comme nous le verrons plus loin dans l'exposé, elle a permis de retrouver des valeurs non aléatoires et proches de celles attendues.

La comparaison des intégrations des signaux des méthyles terminaux ( $\text{CH}_3$ -) à 0,88 ppm, des  $\alpha$ -amino méthylène ( $-\text{CH}_2\text{-NH}$ -) à 3,15 ppm et des acétoxyméthyles ( $-\text{CH}_2\text{-OAc}$ ) du Tris à 4,5 ppm a permis de définir le  $\overline{DP}_n$  et les rapports  $x$  et  $y$  pour chaque cotélomère.

Ces signaux, dans le cas des télomères acétylés, donnaient des massifs suffisamment distincts les uns des autres pour limiter le pourcentage d'erreur. Ceci n'a pas toujours été le cas, comme nous le verrons par la suite avec les télomères protégés par cétalisation.



**Figure 2.15** : **A**/Spectre RMN  $^1\text{H}$  du cotéomère **92** (dans le chloroforme deutéré).  $\text{R}_1 = \text{Ac}$ ,  $\text{R}_2 = -\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ,  $x \sim 0,8$  ( $n.x \sim 12$ ),  $y \sim 0,2$  ( $n.x \sim 3$ ),  $\overline{DP}_n = n \sim 15$ . **B**/Spectre RMN  $^1\text{H}$  du cotéomère **100** obtenu par cotéomérisation des monomères **70** ( $\text{R}_1 = \beta\text{-D-Gal(OAc)}_4$ ,  $\text{R}_2 = -\text{C}_7\text{H}_{15}$ ) et **7** ( $\text{R}_1 = \text{Ac}$ ),  $x \sim 0,67$  ( $n.x \sim 16$ ),  $y \sim 0,33$  ( $n.y \sim 8$ ),  $\overline{DP}_n = n \sim 24$ .

Plus avantageusement, l'utilisation de dérivés organosolubles a permis d'effectuer les analyses en milieu organique et donc de limiter la probabilité d'arrangements supramoléculaires susceptibles d'apparaître avec les agents amphiphiles dont l'ambivalence n'a pas été préalablement masquée.

En effet, l'autoassemblage peut parfois contribuer à compromettre ou fausser l'interprétation des spectres RMN<sup>278</sup>. Ceci peut s'expliquer par la ségrégation de certaines parties de la molécule étudiée dans des microdomaines où leur mobilité sera restreinte. Les temps de relaxation des noyaux concernés seront (très) différents des autres noyaux des parties non ségréguées.

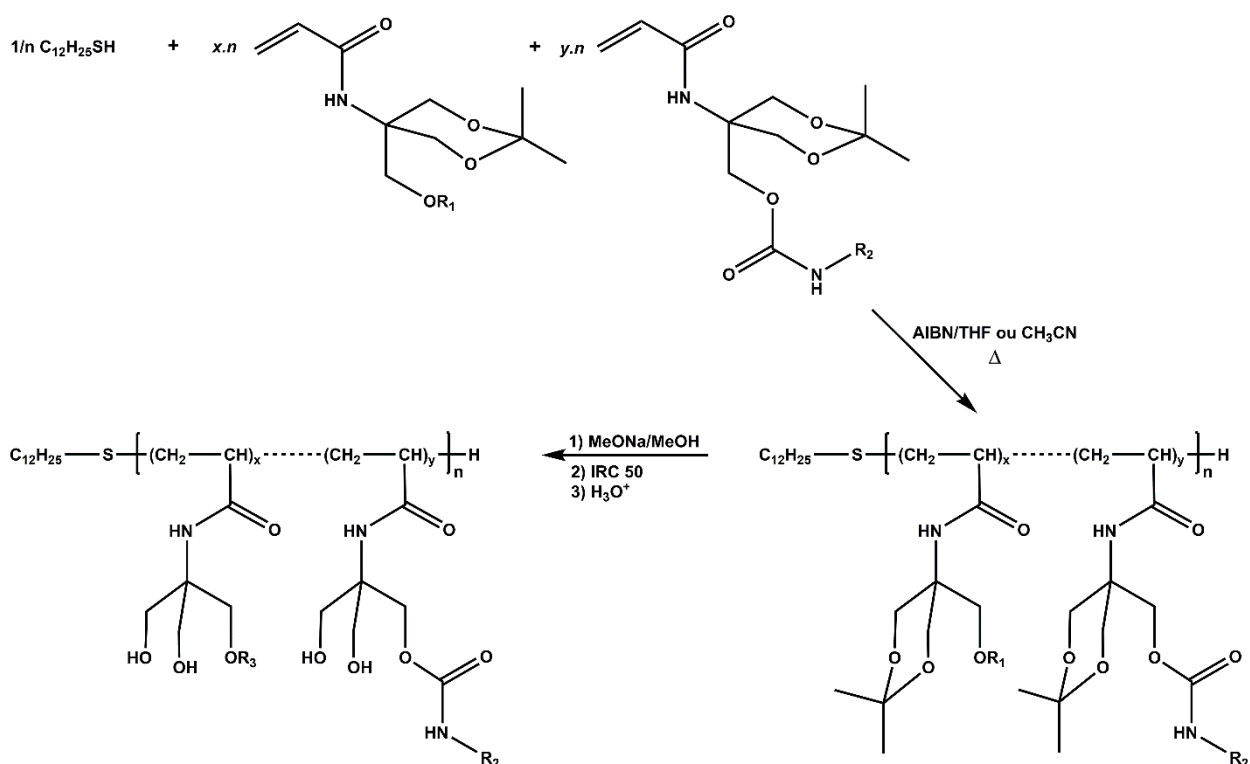
Nous avons déjà mentionné dans le premier chapitre l'observation que nous avons pu faire de ce type de phénomène (cf. chapitre I, cinétique de polymérisation du PAM). Il était donc important de s'assurer d'effectuer nos analyses RMN dans des conditions de bon solvant pour les cotélomères étudiés.

Nous avons justement pu observer et apprécier, dans le cas des structures les plus hydrophiles, les différences de résolution et de cohérence des intégrations de certains des signaux RMN obtenus avec les formes protégées dans le chloroforme et les formes déprotégées dans le DMSO ou dans l'eau lourde, les meilleurs résultats ayant été obtenus dans le chloroforme deutéré.

Après purification sur colonne Séphadex, les fonctions acétyles des cotélomères ont été solvolysées par action du méthylate de sodium en quantité catalytique dans le méthanol (cf. figure 2.14). Après neutralisation par une résine acide IRC50, les cotélomères ont été précipités dans l'éther puis lyophilisés. Les rendements des étapes de déprotection étaient de l'ordre de 90 % après précipitation.

#### 2.2.1.2) Synthèse d'amphipols neutres par cotélomérisation de dérivés du THAM protégés par cétylisation

Les monomères ont été cotélomérisés dans l'acétonitrile, le THF ou le méthanol en présence d'AIBN comme amorceur et de dodécane-thiol comme agent de transfert de chaîne (cf. figure 2.16). La purification du cotélomère a été effectuée par chromatographie par exclusion de taille sur colonne sephadex LH20 et l'analyse structurale a ici aussi été réalisée par RMN <sup>1</sup>H.

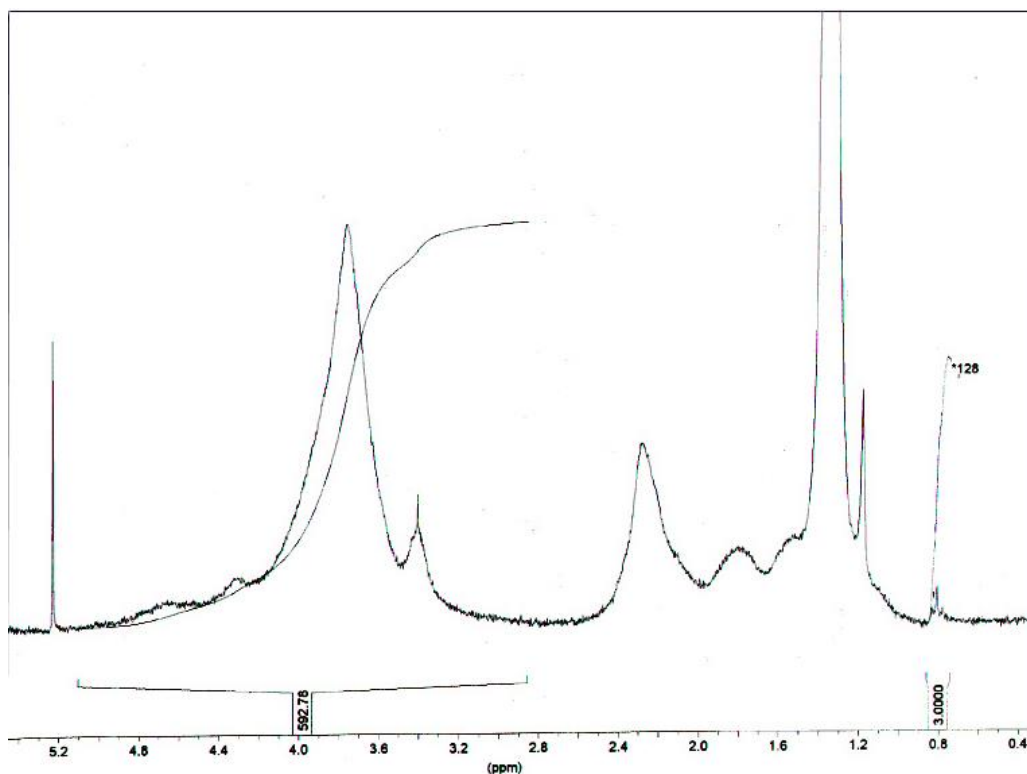


**Figure 2.16** : synthèse d'amphipol par cotélomérisation de monomères protégés par cétilisation.  $R_1 = -OH$  ou 2,3,4,6-tétra(*O*-acétyl)- $\beta$ -D-galactopyranosyle ;  $R_2 = n-C_7H_{15}-$  ou  $n-C_{11}H_{23}-$  ou  $n-C_{17}H_{35}-$  ou  $n-C_6F_{13}-CH_2-CH_2-$  ou  $n-C_8F_{17}-CH_2-CH_2-$  ;  $R_3 = -OH$  ou  $\beta$ -D-galactopyranosyle.

Dans ce cas l'analyse a été moins aisée car le pic des méthyles des chaînes grasses à 0,88 ppm était situé dans un intervalle de déplacement chimique où la présence des signaux des méthyles des isopropylidènes à 1,25 ppm provoquait une dérive importante de la ligne de base.

De plus lorsque les chaînes latérales sont de type tétrahydro1H,1H,2H,2H perfluorocarboné, le méthylène en  $\alpha$  de la fonction uréthane apparaissait vers des champs plus faibles. Les signaux des hydroxyméthyles ( $-CH_2OH$ ) du Tris à 3,6 ppm recouvraient en partie ceux des  $-CH_2NH-$  à 3,4 ppm (cf. figure 2.17). La marge d'erreur lors de la détermination de la structure fine de la macromolécule a donc été plus importante que celle observée pour les dérivés acétylés (cf. descriptif détaillé de la méthode en partie expérimentale).

Le cotélomère obtenu a été ensuite déprotégé par hydrolyse acide dans un mélange acide acétique/eau (7/3) porté à 50°C ou dans un mélange méthanol/HCl<sub>aq</sub> 1N (3/1). Dans le cas des cotélomères glycosylés, une étape supplémentaire de méthanolyse (intervenue avant l'hydrolyse acide) des acétyles a été nécessaire pour obtenir les cotélomères totalement déprotégés (cf. figure 2.16).



**Figure 2.17** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du cotéomère **90**.  $\text{R}_1 = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_8\text{F}_{17}$ ,  $\text{R}_2 = \text{H}$ ,  $x \sim 0,85$  ( $n.x \sim 80$ ),  $y \sim 0,15$  ( $n.y \sim 14$ ),  $\overline{DP}_n = n \sim 94$ .

Après déprotection et évaporation du solvant, les cotéomères ont été repris dans un minimum de méthanol et précipités dans l'éther sous forte agitation avant d'être lyophilisés. Les rendements de l'étape de déprotection ont été de l'ordre de 90 % après précipitation.

Cette deuxième technique de synthèse présentait quelques inconvénients majeurs :

- une étape de déprotection supplémentaire dans le cas des dérivés galactosylés ;
- l'utilisation d'un solvant aqueux qui rend l'élimination de ce solvant longue et laborieuse (les produits étant particulièrement moussants) ;
- des spectres de RMN souvent mal résolus ;
- moins de variantes possibles pour les comonomères dont deux fonctions hydroxyles ont été bloquées.

*Dans ces conditions nous avons préféré utiliser dans la majorité des cas des monomères acétylés, bien que comme nous l'avons déjà vu les réactions de télomérisation dans le méthanol provoquent des réactions de transestérification pouvant se révéler gênantes.*

## 2.2.2) Résultats obtenus et interprétation

### 2.2.2.1) Cotélomérisation de monomères non galactosylés

Nous avons travaillé dans un premier temps avec une concentration initiale totale en monomères de 0,1 M et de  $1,25 \cdot 10^{-3}$  M en AIBN et  $R_0 = 1/16$  ( $\overline{DP}_n$  théorique = 16). Les proportions initiales en monomère  $x$  et  $y$  étaient les mêmes dans chacune des expériences et le rapport  $x/y$  fixé égal à trois (soit 33,3 % molaire de chaînes hydrophobes). Les premiers résultats obtenus ont été répertoriés dans le tableau 2.5.

Solvant	Monomères	$\overline{DP}_n$ (n)	$n.x$	$n.y$	$x/y$	Rdt	Temps réaction	cotélomère n°
CH <sub>3</sub> CN	<u>57</u> + <u>7</u>	10,6	8,2	2,4	3,4	81%	> 48 h	<u>73</u>
MeOH	<u>57</u> + <u>7</u>	11,4	8,9	2,5	3,6	90 %	16 h	<u>74</u>
CH <sub>3</sub> CN + MeOH (1/1)	<u>57</u> + <u>7</u>	14	10,4	3,6	2,9	94 %	35 h	<u>75</u>
THF	<u>57</u> + <u>7</u>	23	17,4	5,7	3,1	68 %	3 h	<u>76</u>
THF	<u>58</u> + <u>7</u>	29	21	8	2,6	68 %	3 h	<u>77</u>
THF + CH <sub>3</sub> CN (1/1)	<u>58</u> + <u>7</u>	37	28,4	8,8	3,2	71 %	12 h	<u>78</u>
THF + MeOH (1/1)	<u>57</u> + <u>7</u>	18	14,3	3,8	3,8	93 %	3h < t < 12h	<u>79</u>

**Tableau 2.5** : résultats obtenus lors des premiers essais de cotélomérisation. Les  $\overline{DP}_n$ , nombres de monomères dépourvus de chaîne grasse ( $n.x$ ), nombres de monomères dotés de chaînes grasses ( $n.y$ ) et rendements massiques ont été exprimés pour les cotélomères protégés obtenus après purification sur colonne séphadex LH 20. Les différentes valeurs de  $x$ ,  $y$  et  $x/y$  ont été corrigées et arrondies au dixième supérieur. L'écart type des mesures devenu supérieur à 10 % pour des  $\overline{DP}_n > 15$ , leur valeur a été donnée à l'unité près.

Ces résultats ont montré que la nature du solvant avait une forte influence sur la réaction.

#### Influence sur la vitesse de réaction et les taux de conversion

Dans l'acétonitrile, nous avons pu constater que suivant les conditions précédemment définies, les taux de conversion n'excédaient jamais 85 %. La réaction semblait en effet très lente car après trois jours à reflux, il restait toujours du monomère dans le milieu réactionnel (vérifié par CCM) et ce, même après plusieurs ajouts d'amorceur radicalaire. Il se formait de plus, un résidu jaunâtre (produits de dégradation) difficile à éliminer qui contaminait le produit final même après purification.

Dans le THF, la réaction était nettement plus rapide, le temps de réaction ne dépassant jamais trois heures et les taux de conversion avoisinant les 100 %.

Ces résultats corroboraient ceux obtenus lors des expériences de cinétique, car comme nous avons pu le montrer dans le premier chapitre, le rapport  $fk_p^2/k_t$  était plus important dans le THF que dans l'acétonitrile pour un même monomère. Les agrégations des monomères étaient en effet plus fortes dans un solvant apolaire (THF) plutôt que dans un solvant polaire (acétonitrile).

Cette observation était certainement généralisable à la majeure partie des dérivés acryliques, Boutevin *et al.*<sup>279</sup> ayant télomériser l'acide acrylique en quatre heures dans le THF à reflux en présence de tétrahydro-1,1,2,2 perfluorooctanethiol, et ce, dans des conditions proches des nôtres.

Dans le méthanol, la réaction était totale au bout de 12 h.

#### Influence sur le $\overline{DP}_n$ et le rendement de la réaction

Dans l'acétonitrile, les rendements était de l'ordre de 80 % et le  $\overline{DP}_n$  est resté généralement inférieur au  $\overline{DP}_n$  théorique, ceci pouvant s'expliquer par le fait que la réaction n'était pas complète et donc une partie des monomères n'avait pas été incorporés dans la macromolécule. Cette explication s'appuie, bien sûr, sur l'hypothèse selon laquelle tout le thiol a réagi.

Dans le THF, bien que la réaction était totale, les rendements en amphipols était de l'ordre de 70 % et nous avons pu observer une importante dérive du  $\overline{DP}_n$ . Ce phénomène pouvait être attribué à une très mauvaise polymolécularité des télomères synthétisés, bien que nous ne l'ayons pas quantifiée.

Il se formait dans ce solvant une importante proportion de monoadduits (révélsés en CCM) ainsi que des macromolécules de masse beaucoup plus élevée que celle correspondant au  $\overline{DP}_n$  théorique attendu. Les monoadduits étaient éliminés lors de la purification par chromatographie par exclusion de taille, ce qui a causé la diminution du rendement massique. Seules les fractions lourdes ont été conservées, de ce fait le  $\overline{DP}_n$  global des télomères isolés était devenu nettement supérieur au  $\overline{DP}_n$  théorique attendu. Comme nous le verrons dans les sections suivantes, le  $\overline{DP}_n$  a été généralement 1,5 à 2 fois plus élevé que le  $\overline{DP}_n$  théorique lorsque la cotélomérisation était effectuée dans le THF.

Nous avons alors supposé que les réactions d'addition de type Michael entre le thiol et les monomères dérivés du THAM étaient favorisées dans le THF à ébullition. Cette hypothèse a pu



être vérifiée en portant à ébullition du THAM triacétylé **7** en présence de dodécane-thiol dans le THF. Au bout d'une heure de réaction une CCM indiquait l'absence d'absorption en U.V. et la présence du monoadduit.

Dans le méthanol, nous avons observé le phénomène inverse. Nous avons obtenu d'excellent rendements avec une forte limitation du  $\overline{DP}_n$ . En effet la réaction ayant été totale (une RMN  $^1\text{H}$  du brut a permis de vérifier l'absence de protons acryliques) et la polymolécularité certainement plus restreinte dans ce solvant, nous avons récupéré la quasi-totalité du télomère après purification sur Séphadex.

Des mélanges de solvants binaires ont également été utilisés, nous avons ainsi pu vérifier qu'il était possible de combiner les propriétés de chacun de ces solvants.

Par exemple, dans un mélange acétonitrile/méthanol (1/1), la réaction est restée lente mais elle est devenue totale. Le  $\overline{DP}_n$  des cotélomères obtenus après purification était proche du  $\overline{DP}_n$  théorique et le rendement était excellent.

Dans un mélange méthanol/THF 1/1, le  $\overline{DP}_n$  restait toujours supérieur à celui attendu, cependant la dérive était beaucoup moins importante que dans le THF pur et les rendements excédant 90 % rendaient compte d'une meilleure distribution en taille (peu de monoadduit observé en CCM). Nous avons noté aussi une augmentation du temps de réaction.

Donc, dans les deux cas, le méthanol a influé sur la taille de la macromolécule et le temps de réaction des monomères. Le mélange THF/méthanol (1/1) semblait être un solvant tout à fait convenable qui permettait d'obtenir le cotélomère attendu avec de très bons rendements. Malheureusement, les problèmes de solvolysse des dérivés acétylés du THAM intervenant dans le méthanol (déjà évoqués dans le premier chapitre) ont limité son utilisation au dérivé protégé par cétylisation.

Enfin, dernier point important, quel qu'a été le solvant employé, la composition des cotélomères obtenus était analogue à celle du rapport  $x/y$  des deux comonomères mis en réaction.

Ce résultat était somme toute logique, car comme nous avons pu le voir (cf. chapitre I), pour un même type de protection utilisée, les monomères présentaient des constantes de vitesse de polymérisation comparables. Une étude cinétique supplémentaire a permis d'évaluer le rapport

$f k_p^2 / k_t$  du monomère **46** à  $1,43 \pm 0,03 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ . Cette valeur rendait compte d'une réactivité proche de celle du monomère **3**.

Ainsi, bien que nous n'avions pas procédé à des mesures de cinétique de copolymérisation, nous pouvions considérer, sans commettre d'erreur importante, que les comonomères étaient plus ou moins indifféremment incorporés dans le cotélomère pour conduire à une distribution aléatoire des comonomères.

Ce résultat était très intéressant, car il garantissait un assez bon contrôle de la HLB et de la microstructure de la macromolécule.

Concernant l'aspect physicochimique, le rapport utilisé lors de ces essais préliminaires s'est cependant révélé mal adapté car l'hydrosolubilité des macromolécules obtenues après déprotection était insuffisante (solubilité dans l'eau inférieure à 1 % massique soit  $\sim 10 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Précisons justement que l'hydrophobie apportée par l'agent télégène était très certainement significative et ne pouvait être négligée qu'à partir d'une valeur suffisamment élevée du  $\overline{DP}_n$  et/ou du rapport  $x/y$ .

Nous avons donc procédé à d'autres essais en faisant varier plusieurs paramètres tels que le taux d'agent télégène et les proportions  $x$  et  $y$ , de façon à déterminer en quelles proportions devaient être utilisés les différents comonomères pour obtenir une structure suffisamment hydrophile. Les résultats ont été répertoriés dans les tableaux 2.6, 2.7 et 2.8.

Solvant	Monomères	1/R <sub>0</sub>	x <sub>0</sub> /y <sub>0</sub>	Cotélomère	x/y	$\overline{DP}_n$	Rdt (en %)
THF + MeOH (1/1)	<b>58 + 7</b>	24	5	<b>80</b>	5,5	28	80
THF	<b>58 + 7</b>	21	6	<b>81</b>	5,3	39	76
THF	<b>59 + 7</b>	50	5	<b>83</b>	5,1	53	78
THF	<b>57 + 7</b>	60	5	<b>84</b>	4,7	133	65
MeOH + CH <sub>3</sub> CN (1/1)	<b>60 + 7</b>	24	5	<b>85</b>	5	18	93
THF	<b>60 + 7</b>	24	5	<b>86</b>	4,2	23	70
THF	<b>59 + 7</b>	24	5	<b>87</b>	4	20	70
THF	<b>59 + 7</b>	50	5	<b>88</b>	3,5	58	68

**Tableau 2.6** : résultats obtenus après cotélomérisation de monomères protégés par acétylation. 1/R<sub>0</sub> et x<sub>0</sub>/y<sub>0</sub> définissent le  $\overline{DP}_n$  et le rapport hydrophile/hydrophobe attendu respectivement. Les valeurs expérimentales présentées ont été arrondi au dixième près. L'écart type des valeurs du  $\overline{DP}_n$  devient supérieur à 10 % dès que celles-ci sont supérieures à 15.

Les résultats obtenus ont confirmé les observations relevées dans le cadre des premiers essais et ont montré que la taille ( $\overline{DP}_n$ ) et la HLB étaient parfaitement maîtrisées lorsque la cotélomérisation était effectuée dans le mélange méthanol/THF 1/1.

Solvant	Monomères	1/R <sub>0</sub>	x <sub>0</sub> /y <sub>0</sub>	Cotélomère	x/y	$\overline{DP}_n$	Rdt (en %)
THF	<u>47</u> + <u>3</u>	50	5	<u>89</u>	6,8	40	80
THF	<u>50</u> + <u>3</u>	50	5	<u>90</u>	5,7	94	73

**Tableau 2.7** : résultats obtenus après cotélomérisation de comonomères protégés par cétylisation. 1/R<sub>0</sub> et x<sub>0</sub>/y<sub>0</sub> définis tel que précédemment. Précision des mesures donnée telle que précédemment.

Solvant	Monomères	1/R <sub>0</sub>	x <sub>0</sub> /y <sub>0</sub>	Cotélomère	x/y	$\overline{DP}_n$	Rdt (en %)
THF	<u>45</u> + <u>3</u>	23	5	<u>91</u>	4,6	30	70

**Tableau 2.8** : résultats obtenus après cotélomérisation d'un monomère acétylé avec un monomère protégé par cétylisation. 1/R<sub>0</sub> et x<sub>0</sub>/y<sub>0</sub> définis tel que précédemment. Précision des mesures donnée telle que précédemment.

Dans le cas des cotélomérisations effectuées dans les autres solvants, le contrôle du  $\overline{DP}_n$  a été en moyenne relativement satisfaisant. Sans obtenir les valeurs théoriques, la taille des macromolécules préparées répondait globalement à notre attente.

La solubilité en solution aqueuse devenait acceptable pour un rapport x/y supérieur à 4 et elle était excellente (> 4 % ou 40 g/l) lorsque celui-ci était supérieur ou égal à 5. Ces valeurs correspondaient à des taux de modification « hydrophobe » de l'ordre de, respectivement, 25 % et 20 %. Les amphipols neutres (comme les amphipols ioniques) conservaient donc une bonne solubilité dans l'eau malgré un taux de modification hydrophobe assez important.

En ce qui a concerné les rendements de préparation et la bonne reproductibilité des réactions, nous avons vu que l'acétonitrile offrait d'une part l'avantage de représenter un milieu réactionnel favorisant le contrôle du  $\overline{DP}_n$ , et d'autre part présentait l'inconvénient de donner des réactions relativement lentes dans les conditions réactionnelles mises en œuvre.

Pour résoudre ce problème, nous avons choisi d'augmenter les concentrations en réactifs. La concentration totale initiale en monomère était dès lors de l'ordre de 0,7 M et la concentration en AIBN initiale a été fixée approximativement égale à 20 % de celle en thiol.

Dans ces nouvelles conditions, le temps de la réaction a été fortement diminué (la consommation des monomères est pratiquement totale au bout de 16 h) et les cotélomères ont été

obtenus avec un rendement supérieur à 80 % avec une taille et une composition chimique très proches de celles attendues (cf. tableau 2.9). De plus, le jaunissement des produits (dû à une période de chauffage trop longue) n'a plus été observé.

Solvant	Monomères	$1/R_0$	$x_0/y_0$	Cotélobère	$x/y$	$\overline{DP}_n$	Rdt (en %)
CH <sub>3</sub> CN	<u>57</u> + <u>7</u>	15	4	<u>92</u>	4	15	80
CH <sub>3</sub> CN	<u>57</u> + <u>7</u>	30	3	<u>93</u>	3,2	30	88

**Tableau 2.9** : résultats obtenus après cotélobérisation de monomères protégés par acétylation en milieu concentré dans l'acétonitrile.  $1/R_0$  et  $x_0/y_0$  définis tel que précédemment. Précision des mesures donnée telle que précédemment.

Ces dernières expériences de cotélobérisation paraissaient définir les conditions optimales pour la synthèse d'amphipols neutres non galactosylés permettant de contrôler au mieux la taille et la HLB de la macromolécule.

Nous avons alors ensuite réalisé le même travail d'investigation en utilisant des monomères galactosylés.

#### 2.2.2.2) Cotélobérisation de monomères galactosylés

Le principe de la réaction est resté le même que celui décrit précédemment. Dans ce cas cependant, les essais de synthèse des cotélobères effectués dans l'acétonitrile s'étant révélés négatifs quelles qu'aient été les concentrations initiales utilisées, nous avons effectué ces réactions dans le THF pur ou en mélange avec le méthanol, avec des concentrations initiales en monomère égales à 0,2 M.

Les résultats obtenus se sont révélés satisfaisants (cf tableau 2.10). Les rendements étaient convenables et les réactions pratiquement totales, bien que la plupart des monomères utilisés étaient particulièrement encombrés et donc certainement peu réactifs.

Il faut noter ici, que dans cette série d'expérience le rapport  $x/y$  et donc la HLB de la macromolécule ont été parfaitement contrôlés.

Des résultats exceptionnels ont toutefois été rencontrés lors de la préparation des cotélobères **99** et **100**. Il semblait dans ce cas précis que le monomère trigalactosylé **63**, dont l'encombrement était important, avait tendance à former des monoadduits qui étaient éliminés lors de la purification sur colonne Séphadex.

Ceci pouvait expliquer pourquoi la macromolécule récupérée après purification était appauvrie en monomère trigalactosylé, le rapport  $x/y$  étant différent du rapport  $x_0/y_0$  défini initialement.

Solvant	Monomères	$R_0$	$x_0/y_0$	Cotélomère	$x/y$	$\overline{DP}_n$	Rdt (en %)
THF/MeOH 1/1	<b>46 + 61</b>	30	5	<b>94</b>	4,5	20	93
THF	<b>56 + 63</b>	21	3	<b>95</b>	2,6	38	33
THF/MeOH 1/1	<b>65 + 7</b>	30	4	<b>96</b>	4,2	40	98
THF/MeOH 1/1	<b>69 + 7</b>	25	4	<b>97</b>	5	23	73
THF/MeOH 1/1	<b>56 + 63</b>	24	3	<b>98</b>	2	9,8	50
THF	<b>56 + 63</b>	18	3	<b>99</b>	2	24	41
THF	<b>70 + 7</b>	15	3	<b>100</b>	3,3	29	69

**Tableau 2.10** : résultats obtenus après cotélomérisation de monomères galactosylés protégés par acétylation.  $1/R_0$  et  $x_0/y_0$  définis tel que précédemment. Précision des mesures donnée telle que précédemment.

La solubilité dans l'eau des structures galactosylées comportant sensiblement 1/3 de chaînes hydrophobes ( $x/y \sim 2$ ) était supérieure à 4 %. Contrairement à ce qui a été vu avec les amphipols non galactosylés, il n'a pas été nécessaire ici d'augmenter le nombre de monomères hydrophiles et donc la taille du cotélomère pour parvenir à un seuil d'hydrosolubilité suffisant, tout en conservant un nombre important de chaîne latérales hydrophobes. Il a suffi en fait d'augmenter le nombre de motifs saccharidiques par monomère.

Ainsi les cotélomères dont les parties hydrophiles étaient constituées par un monomère di- ou trigalactosylé, présentaient une solubilité dans l'eau supérieure à 6 % avec un rapport  $x/y = 1$  (résultats non exposés).

### 2.3) Conclusion

La synthèse d'amphipol par cotélomérisation a donc permis de contrôler efficacement la taille de la molécule et de moduler facilement sa HLB en faisant varier les proportions initiales  $x$  et  $y$  en monomères pour finalement obtenir les macrostructures attendues avec des rendements convenables.

L'utilisation de monomères galactosylés a permis d'augmenter considérablement l'hydrosolubilité de l'amphipol tout en conservant une faible masse moléculaire et un nombre important de chaînes latérales.

Toutefois, la méthode employée présentait l'inconvénient d'être longue et onéreuse, la rendant difficilement applicable à la synthèse d'amphipol à l'échelle multigrammes.

Elle impliquait plusieurs étapes de protection et déprotection qui s'accompagnaient de nombreuses purifications des monomères sur colonne de silice. Enfin la purification du cotéomère sur séphadex LH 20 ne permettait pas de disposer de quantité suffisante (à l'échelle du laboratoire) de produit final.

Nous avons donc envisagé d'utiliser une autre méthode de synthèse qui devait permettre de disposer assez rapidement d'une quantité importante d'amphipol. Cette méthode portait sur une modification chimique du polymère.

### **3) Synthèse d'amphipols par modification chimique d'un homotéomère d'un dérivé du THAM**

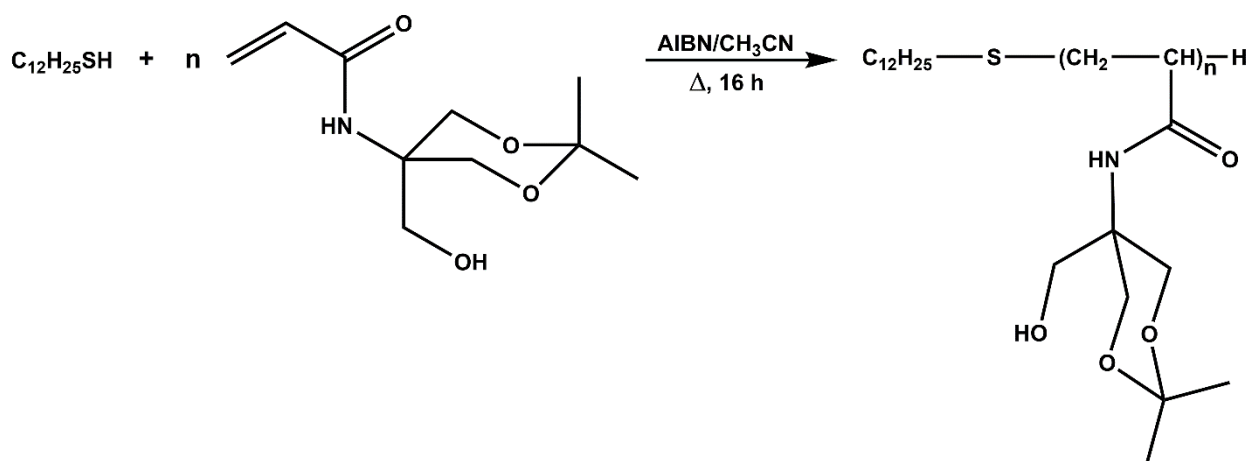
Ces structures ont été élaborées en prenant les structures **73** et **76** comme modèles, car ces amphipols se sont révélés actifs lors de tests effectués par l'équipe de C. Tribet et l'équipe de J.-L. Popot (cf paragraphe III Résultats biochimiques). Il serait donc intéressant de pouvoir en disposer en grande quantité.

#### 3.1) Synthèse de l'homotéomère du THAM isopropylidène

Le principe de la méthode utilisée a déjà été décrit dans le paragraphe **1** et a consisté à greffer un certain pourcentage de chaînes alkyle sur un homotéomère d'un dérivé du THAM présentant deux de ses trois fonctions alcool protégées. Notre choix s'est naturellement porté sur le THAM isopropylidène **3** comme monomère de départ pour préparer le téomère précurseur.

En effet, ce dérivé était obtenu pur et parfaitement cristallisé avec un bon rendement après cétylation du THAM. Sa protection était relativement labile et le produit de dégradation de celle-ci (acétone) est facilement éliminé par évaporation. Enfin, la réactivité de ce monomère avait été caractérisée lors des études cinétiques décrites dans le premier chapitre de ce manuscrit (cf. chapitre I).

La téomérisation du THAM isopropylidène a été effectuée dans l'acétonitrile avec une concentration initiale en monomère de l'ordre de 0,7 M, en présence de dodécane-thiol (agent téogène) et d'AIBN (amorceur) (cf. figure 2.18).



**Figure 2.18** : schéma de synthèse d'homotélocères du THAM isopropylidène.

La réaction était totale au bout de 16 h. L'homotélocère a été isolé après précipitation dans l'éther et le  $\overline{DP}_n$  a été déterminé par analyse RMN  $^1\text{H}$  en comparant l'intégration du méthyle à celle de l'ensemble des pics des oxyméthyles ( $-\text{CH}_2\text{O}-$ ) du Tris et du proton hydroxyle ( $-\text{OH}$ ) (cf. partie expérimentale).

Précisons que la dérive de la ligne de base et la mauvaise résolution des signaux observée pour ce type d'homotélocère a rendu difficile le calcul des aires des différents signaux en RMN  $^1\text{H}$ . De ce fait, le  $\overline{DP}_n$  a été estimé avec un pourcentage d'erreur d'environ 20 % (cf. tableau 2.11).

Télocères	$1/R_0$	$\overline{DP}_n$	Rendement (%)
<b>101</b>	30	$32 \pm 6$	86.7
<b>102</b>	15	$17 \pm 4$	84.7

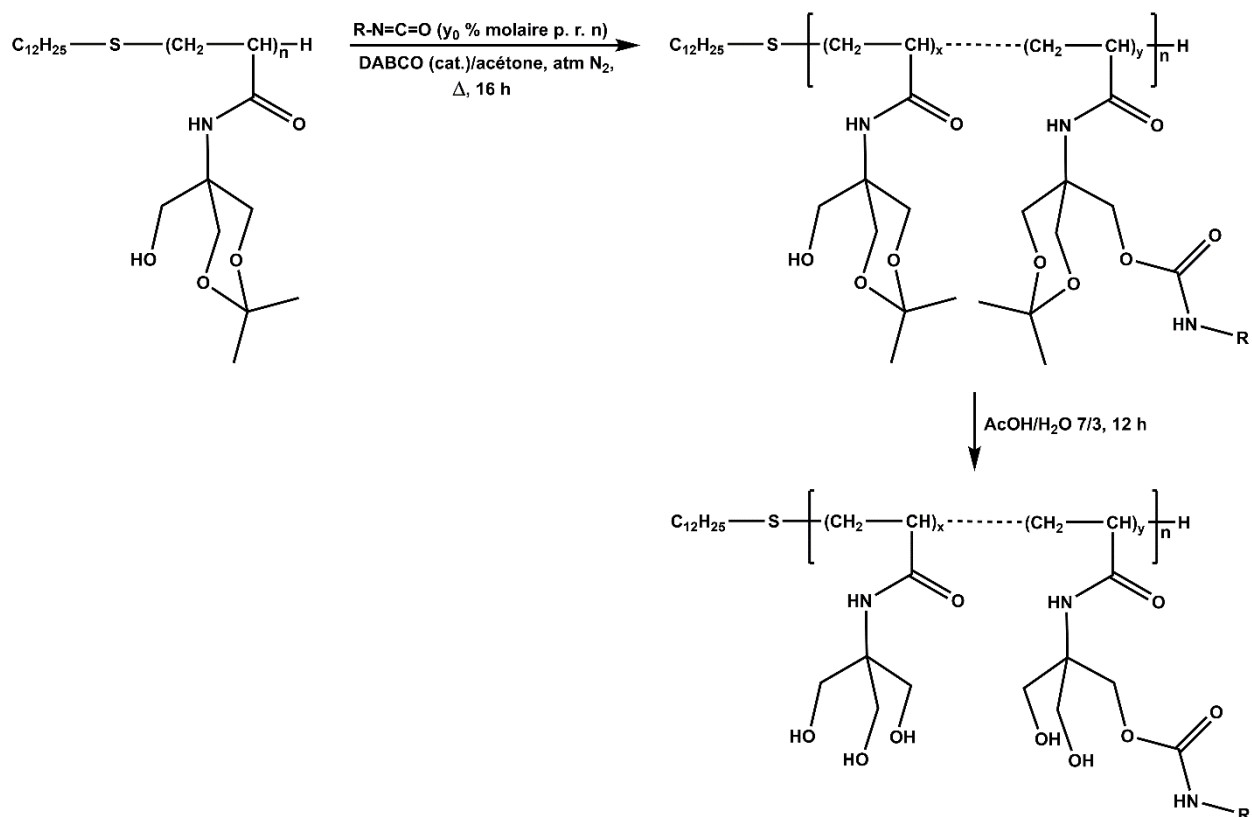
**Tableau 2.11** : résultats obtenus après homotélocérisation du THAM isopropylidène dans l'acétonitrile à reflux. La consommation du monomère étant totale et la réaction se déroulant dans un solvant avec lequel nous n'avons pas observé de dérive significative des  $\overline{DP}_n$  par rapport aux  $\overline{DP}_n$  théoriques ( $1/R_0$ ), nous avons choisi dans chaque cas de retenir les calculs les plus proches des valeurs attendues.

Nous disposons donc de deux homotélocères précurseurs caractérisés par des tailles variant du simple au double. Nous avons ensuite procédé à la modification hydrophobe de des deux différents homotélocères.

### 3.2) Modification hydrophobe de l'homotélocère

Nous avons fait réagir une quantité bien définie d'isocyanate avec l'homotélocère (les calculs permettant de déterminer la masse d'isocyanate devant être utilisée pour un taux de greffage de  $y_0$  % sont exposés dans la partie expérimentale). La réaction s'est déroulée dans l'acétone à reflux

sous atmosphère inerte durant 16 h en présence d'une faible quantité de DABCO comme catalyseur (cf. figure 2.19).



**Figure 2.19** : schéma de synthèse d'amphipols neutres par modification hydrophobe d'homotélomères du THAM isopropylidène.

Nous avons essayé de reproduire les structures des cotélomères **92** et **93** en greffant des chaînes undécyle avec des pourcentages compris entre 20 et 25 %. Nous avons obtenu ainsi le cotélomère **103** issu de la modification hydrophobe du télomère **101** et le cotélomère **104** issu de la modification du télomère **102**.

Bien que les cotélomères obtenus aient été précipité dans l'hexane ou l'éther de pétrole, nous ne pouvions être sûrs dans ces conditions d'avoir séparé le cotélomère de la totalité de l'urée (sous-produit connu de la réaction) formée au cours de la réaction.

Après déprotection du télomère dans le mélange acide acétique/eau (7/3), l'urée a été définitivement éliminée après filtration, après précipitation dans un minimum de méthanol aqueux. Le télomère amphiphile a ensuite été séché par distillation azéotrope sous pression réduite dans le toluène puis repris dans du méthanol et précipité dans l'éther. Nous avons ainsi pu obtenir les télomères **103'** et **104'** issus respectivement de la déprotection des télomères **103** et **104**.



La RMN  $^1\text{H}$  n'a pas permis de préciser la structure de ces télomères avec une bonne exactitude. En effet, avant hydrolyse acide, le cotélomère pouvait, comme précisé précédemment, contenir des traces d'urée et après hydrolyse le caractère amphiphile des produits perturbait notablement l'analyse.

Nous venions de nous confronter ici à l'inconvénient majeur de la méthode qui nécessitait des techniques d'analyse structurales plus précises et certainement plus complexes que la RMN du proton.

Il nous a donc paru plus judicieux de se fier aux analyses effectuées sur les télomères protégés dans le chloroforme deutéré sous la condition de parvenir à éliminer la quasi-totalité de l'urée susceptible de contaminer les échantillons. Dans ce but, différentes portions aliquotes de cotélomère ont été lavées et filtrées deux fois dans le n-hexane à chaud avant analyse. Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau 2.12.

Télomère	$y_0$ (%)	$y$ (%)	$n.x$	$n.y$	Rdts globaux (%)
<b>103'</b>	25	22	25	7	77
<b>104'</b>	20	18	14	3	80

**Tableau 2.12** : résultats des modifications chimiques des télomères **101** et **102** avec  $y_0$ ,  $y$ ,  $n.x$  et  $n.y$  tels que définis précédemment. Les valeurs de ces paramètres ont été déterminées en comparant l'intégration des méthyles à 0,88 ppm à celle des massifs dus aux protons uréthane et aux protons amide à 7,3 ppm (les calculs sont exposés dans la partie expérimentale). Les rendements exprimés sont les rendements globaux obtenus après modification hydrophobe du précurseur suivie de l'étape de déprotection et purification subséquente.

### 3.3) Conclusion

La synthèse d'amphipol neutre par modification hydrophobe d'un homotélomère du THAM isopropylidène était donc une méthode qui permettait de disposer facilement et rapidement de quantités importantes de produit.

Elle offrait l'avantage de pouvoir disposer de différents lots d'amphipols neutres tous issus d'un seul et même homotélomère précurseur et ne se distinguant les uns des autres que par la valeur de leur HLB respective, la taille et la distribution en taille étant la même pour chaque cotélomère dérivé d'un même précurseur.

Avantage appréciable dans le contexte d'études systémiques dont il n'était pas possible de bénéficier en appliquant la méthode de cotélomérisation.

La persistance d'impuretés résiduelles (telles que les dérivés de type urée) contaminant les produits finaux s'est révélée particulièrement gênante en pratique car elle a contribué à compromettre significativement les analyses de leur composition chimique.

Il a été nécessaire d'appliquer de façon répétitive des procédés de purification aux cotélomères intermédiaires et finaux avant d'être en mesure de les garantir (*a priori*) exempts de contaminants. Ces contaminants étant susceptibles de surcroît de perturber les analyses des propriétés physicochimiques et biochimiques des cotélomères.

D'un point de vue pratique, nous avons aussi pu noter, en RMN  $^1\text{H}$ , que l'étalement sur certains intervalles de déplacement chimique des signaux des protons des groupements protecteurs utilisés (isopropylidène), était souvent à l'origine d'une mauvaise résolution des pics.

Ainsi, en dépit de tous nos efforts visant à optimiser la pureté de nos amphipols, l'erreur expérimentale introduite lors des déterminations structurales, même si elle n'était certainement pas critique, elle restait significative et nous ne pouvions être sûrs avec les moyens utilisés (RMN), d'avoir parfaitement défini dans ces conditions de synthèse les paramètres structuraux de nos amphipols.

*En définitive, les résultats précédemment obtenus montraient que la cotélomérisation de deux monomères protégés par acétylation paraissait être la méthode de choix pour l'élaboration d'amphipols non ioniques dérivés du THAM. Elle offrait la possibilité d'introduire plusieurs motifs glucidiques par monomère sans impliquer d'étape de déprotection supplémentaire et permettait d'autre part une analyse structurale aisée et fiable.*

*La méthode de modification hydrophobe de l'homotélomère ne devait pas pour autant être définitivement abandonnée, car il restait à améliorer certains aspects de la technique qui pouvaient rendre celle-ci beaucoup plus intéressante. Il fallait pour cela utiliser un groupement protecteur dont les protons présentaient des signaux en RMN  $^1\text{H}$  suffisamment éloignés des pics dont les intégrations nous permettaient de déterminer la structure étudiée.*

*Cette proposition alternative n'a pu être abordée dans le cadre de cette thèse mais reste une perspective intéressante à envisager.*

### ***III) RÉSULTATS BIOLOGIQUES :***

#### ***Association de protéines membranaires avec des cotéломères amphiphiles.***

*L'ensemble de ces travaux a été effectué par M<sup>lle</sup> C. Prata et M. C. Tribet au laboratoire de physicochimie macromoléculaire de l'ESPCI, (PARIS) et M. Yann Gohon et M. J.L. Popot au laboratoire de physico-chimie macromoléculaire de l'institut de biologie physico-chimique (PARIS).*

Les tests effectués sur les cotéломères ont ciblé trois principaux objectifs :

- premièrement, la recherche des conditions permettant l'existence d'une association entre polymère et protéine qui conservait si possible la protéine native ;
- deuxièmement, une détermination de la stabilité des dispersions de complexes en absence de détergent libre et de polymère libre ;
- dans un troisième temps, la détermination de la taille (mesure des rayons) et de la composition (masse de polymère/protéine) des complexes PM/amphipols présentant la stabilité attendue et susceptible de conserver la forme native de la PM.

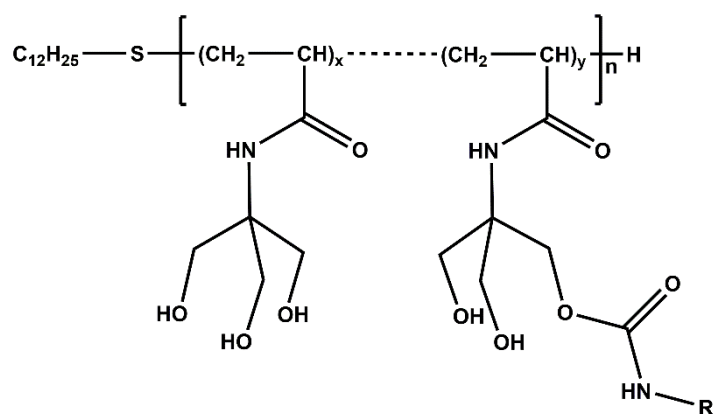
Il a été, de prime abord, nécessaire de tester la solubilité des cotéломères en phase aqueuse.

#### **1) Solubilité des cotéломères en solution aqueuse**

Les complexes protéine-amphipol ont été purifiés par centrifugation sur gradient de saccharose. Il était donc impératif que l'amphipol reste en solution une fois soumis à une force centrifuge. En fait, une sédimentation partielle a toujours été observée mais la solubilité a été jugée acceptable à partir du moment où les dimensions du culot obtenu étaient négligeables.

Les premiers tests ont été effectués sur les cotéломères déprotégés **74'**, **76'**, **80'**, **85'**, **86'** et **87'** qui ont été dissous à différentes concentrations et les solutions obtenues ont été centrifugées pendant 4 minutes à 1500 g. La structure de chaque composé et la concentration à laquelle a été testée la solubilité sont données dans la figure 2.20 et le tableau 2.13.

A l'exception du composé **80'**, tous les télomères testés ont été maintenus en solution après centrifugation. Les résultats de cette première expérience ont été confirmés par la suite en réalisant d'autres essais sur ces mêmes composés en utilisant la technique de l'air-fuge.



**Figure 2.20** : structure générale des cotélomères testés. La nature de R et les valeurs de  $n$ ,  $x$  et  $y$  sont données dans le tableau 2.13 ci-dessous.

Cotélomère n°	$n.x$	$n.y$	R	$\overline{DP}_n (n)$	$\overline{M}_n (\text{g.mol}^{-1})$	Testé à la concentration de :
<b>74'</b>	8,9	2,5	$-\text{C}_{11}\text{H}_{23}$	11,4	2700	0,8 g/L
<b>76'</b>	17,4	5,7	$-\text{C}_{11}\text{H}_{23}$	23,1	5200	1,3 g/L
<b>80'</b>	23,5	4,3	$-\text{C}_{17}\text{H}_{35}$	27,8	6300	59 g/L
<b>85'</b>	15	3	$-(\text{CH}_2)_2\text{C}_8\text{F}_{17}$	18	4800	55 g/L
<b>86'</b>	18,7	4,5	$-(\text{CH}_2)_2\text{C}_8\text{F}_{17}$	23,2	6500	88,5 g/L
<b>87'</b>	16,2	4,1	$-(\text{CH}_2)_2\text{C}_6\text{F}_{13}$	20,3	5400	52 g/L

**Tableau 2.13** : composition chimique, taille et masse moléculaire moyennes en nombre des cotélomères utilisés aux concentrations indiquées durant les tests de solubilité.

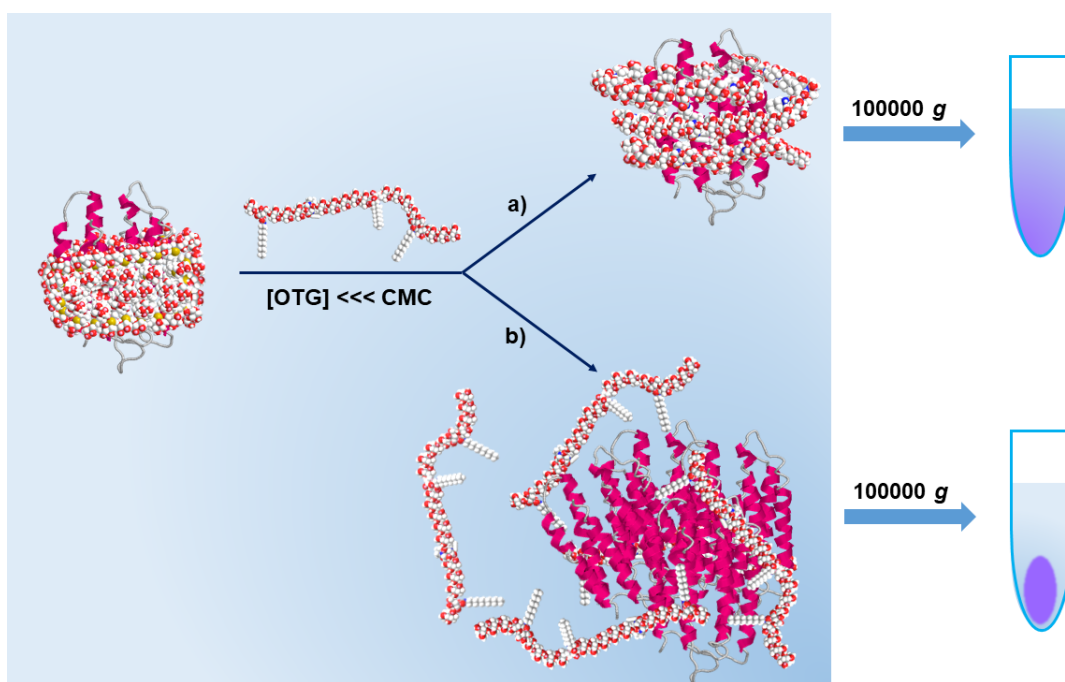
Cette méthode est basée sur le même principe que celui décrit précédemment, mais les temps de centrifugation sont plus longs (30 minutes) et les expériences sont effectuées à 100000 g. Après s'être assuré de la solubilité des cotélomères dans les conditions expérimentales choisies, les premiers essais d'associations avec des protéines hydrophobes ont été effectués.

## 2) Essais préliminaires d'association d'une protéine hydrophobe, la bactériorhodopsine, avec des amphipols non ioniques

Les propriétés biochimiques potentielles de ces amphipols ont été évaluées sur une protéine transmembranaire modèle, la bactériorhodopsine (BR).

Présente en grande quantité dans la membrane pourpre d'un microorganisme, *Halobacterium halobium*, elle convertit l'énergie lumineuse en gradient de protons<sup>280</sup>. Cette PM a fait et continue de faire l'objet d'études approfondies à l'IBPC<sup>235,281</sup> et sa structure tridimensionnelle est connue<sup>282</sup> (cf. introduction générale). Elle est donc un modèle fiable, d'autant que ses états natifs et dénaturés se distinguent très aisément en spectroscopie UV-Visible (*vide infra*).

L'expérience a consisté à ajouter à une solution de BR stabilisée en présence d'un tensioactif (le  $\beta$ -octylthiogluco-side), un volume déterminé d'une solution d'amphipol. Après une période d'incubation relativement courte (15 minutes), la solution a été diluée par un volume précis de tampon phosphate (pH = 7) de façon à ce que la concentration en détergent devienne inférieure à la CMC. La solution a ensuite été soumise à une centrifugation (airfuge) durant 30 minutes à 100000 g (cf. figure 2.21).



**Figure 2.21 :** illustration de l'expérience de maintien en solution de la BR en présence d'amphipol neutre. L'amphipol est échangé avec le tensioactif (OTG) et deux cas peuvent se présenter : a) l'amphipol s'est substitué au détergent et la BR est maintenue en solution, après ultracentrifugation le complexe BR-amphipol ne sédimente pas ; b) l'amphipol ne s'est pas adsorbé sur les domaines hydrophobes de la BR et après dilution du de l'OTG, la BR s'est agrégée pour sédimer après centrifugation. La structure de l'OTG a été optimisée (champs de force MM2) sous ChemDraw. Les modèles d'amphipols neutres ont été construits suivant une séquence aléatoire par assemblage arbitraire des structures optimisées de chaque comonomère (20 unités THAM et 4 unités THAM greffé en C<sub>11</sub>) et ne préfigurent en aucun cas la réelle conformation du cotélomère adoptée en solution ou en interaction avec la PM. De même, les structures des assemblages PM-détergents et PM-amphipol sont hautement spéculatives et ne sont pas représentatives de la réalité physicochimique de l'échantillon.

Le résultat a été jugé positif lorsque aucune sédimentation de la protéine n'a été observée. Dans le cas contraire, la formation d'un culot impliquait que le cotélomère testé ne présentait pas les propriétés requises pour maintenir la protéine en solution (cf. figure 2.21).

Une expérience similaire a ensuite été reproduite mais cette fois, sur gradient de sucrose et la centrifugation a été effectuée à 150 000 g durant plusieurs heures. Le complexe amphipol/protéine a été mis en évidence et localisé sur le gradient par spectrométrie U.V., la BR absorbant en U.V à 380 nm et dans le visible à 554 nm.

Ces expériences ont concerné les cotélomères **74'**, **76'**, **86'** et l'amphipol **A8-35** (cf. introduction, 25 % de chaîne octyle greffée) pris comme échantillon témoin.

Précisons que compte tenu, à masse molaire moyenne approximativement équivalente ( $\bar{M}_n \sim 5000 \text{ g.mol}^{-1}$ ), de la différence du nombre de chaîne pendantes subsistant entre l'amphipol A8-35 et les cotélomères neutres, les quantités de cotélomères à utiliser ont été déterminées en équivalents de chaînes grasses puis ramenées en masse et en mole pour chaque composé. Cette méthode a permis d'établir une comparaison des rapports du nombre de chaînes grasses présentes dans l'échantillon au nombre de mole de protéine en solution (nb. alkyle/nb. BR). Nous disposons ainsi d'une méthode cohérente de comparaison de l'efficacité de chaque amphipol.

Dans les conditions opératoires décrites précédemment, aucun phénomène de sédimentation de la protéine n'a été observé pour les cotélomères **74'**, **76'** et l'**A8-35**.

La formation de culot a été observée avec le composé **86'**, même après emploi d'une quantité nettement supérieure à celle habituellement utilisée en **A8-35**, ceci ayant traduit l'inaptitude de ce cotélomère à pouvoir se complexer à la protéine, les chaînes fluorées ne s'adsorbant pas sur les sites hydrophobes de la PM.

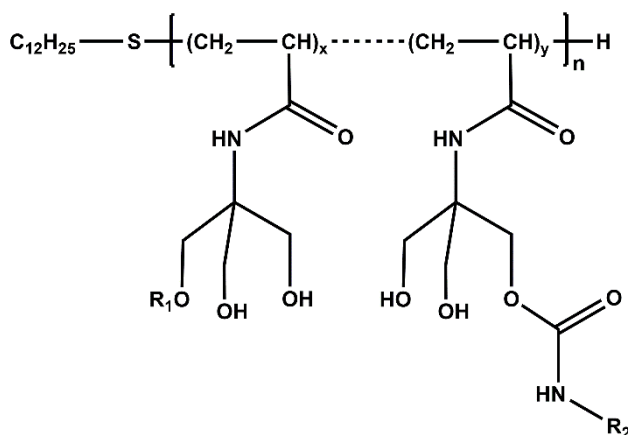
Les premiers résultats prometteurs ont donc été obtenus avec les cotélomères **74'** et **76'** porteur de chaînes alkyle perhydrogénées et avec lesquels le maintien de la BR en solution était vérifié que le rapport nb. alkyle/nb. BR ait été identique ou sept fois inférieur à celui observé pour un amphipol **A8-35**.

Des études plus approfondies ont donc été réalisées non seulement avec les cotélomères **74'** et **76'** mais également avec le cotélomère galactosylé **94'**, le cotélomère **91'** comportant une chaîne latérale plus courte en  $C_7$  et le cotélomère **84'** de  $\overline{DP}_n$  assez élevé.

### 3) Études complémentaires de l'association de protéines hydrophobes avec les cotélobères amphiphiles dérivés du Tris

Ces études ont été réalisées sur deux protéines membranaires : la bactériorhodospine (BR) dans une solution d'OTG à 33 mM et le cytochrome  $b_6f$  dans une solution d'hecameg (HG) à 20 mM et de phosphatidylcholine (PC) à 0,1 g.L<sup>-1</sup>. Le cytochrome  $b_6f$  est, précisons-le, une PM se retrouvant dans les membranes des thylakoïdes (organite subcellulaire des cellules végétales) et jouant un rôle essentiel dans les transferts d'électrons intervenant au niveau des systèmes photosynthétiques<sup>283</sup>.

Les structures des cotélobères testés sont indiquées dans la figure 2.22.



**Figure 2.22** : structure générale des cotélobères testés. La nature de R et les valeurs de  $n$ ,  $x$  et  $y$  sont données dans le tableau 2.14 ci-dessous.

Cotélobère n°/nom	$n.x$	$n.y$	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	$\overline{DP}_n (n)$	$\overline{M}_n (g.mol^{-1})$
<b>74'</b> ou C <sub>112</sub>	8,9	2,5	H	-C <sub>11</sub> H <sub>23</sub>	11,4	2700
<b>76'</b> ou C <sub>115</sub>	17,4	5,7	H	-C <sub>11</sub> H <sub>23</sub>	23,2	5200
<b>84'</b> ou PC	110	23	H	-C <sub>11</sub> H <sub>23</sub>	133	28000
<b>91'</b> ou PE	24,9	5,4	H	-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	30,3	6100
<b>94'</b> ou PF	16,2	3,6	$\beta$ -D-Gal	-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	19,8	6600

**Tableau 2.14** : composition chimique, taille et masse moléculaire moyennes en nombre des cotélobères utilisés.

#### 3.1) Existence et solubilité des complexes

Le contrôle standard de l'association polymère-protéine a été le même que celui décrit précédemment et consistait à diluer une solution micellaire de protéine purifiée, en dessous de la CMC du détergent mais en présence de polymère, ce qui dissociait au moins partiellement la

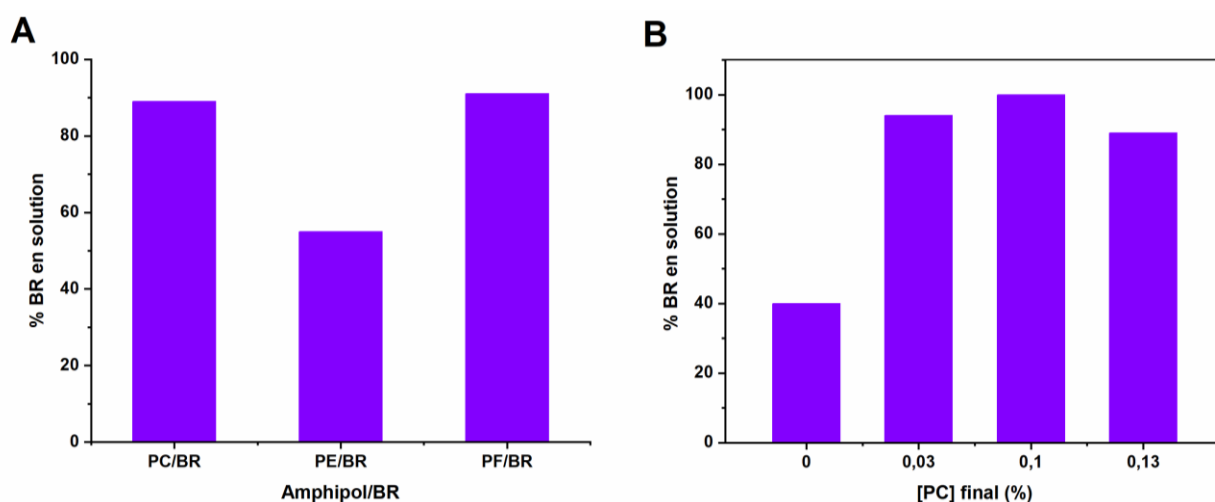
protéine et le détergent. En principe, la protéine devait s'agréger en absence de polymère alors qu'elle était susceptible de rester dispersée si le polymère l'enrobait suffisamment.

Dans les conditions utilisées avec la BR et le cytochrome  $b_6f$ , et en absence de polymère, cette expérience a conduit à une agrégation importante des protéines. En centrifugeant les solutions, il a été possible néanmoins de mesurer un taux résiduel de protéines solubles (non agrégées). Ce taux dépendait des temps d'incubation et des concentrations.

Dans les conditions utilisées (et décrites ci-après), il était voisin de 40 % pour la BR (elle n'a précipité que partiellement ici car le détergent résiduel n'était pas très dilué, la force ionique était faible et le temps d'incubation était court) et de l'ordre de 10 % pour le cytochrome  $b_6f$ . Ces deux valeurs constituaient la référence "précipitation en absence d'additifs".

Précisons que dans ces conditions expérimentales, les rapports en masse polymère/protéine ont toujours dépassé 6g/g. Sur la base du comportement des amphipols chargés, nous nous sommes assurés ainsi que la quantité d'amphipol non ionique était toujours assez importante pour que toutes les protéines puissent être associées au polymère. Toutefois, des mesures ont été effectuées afin de préciser dans quelques cas précis l'impact de la concentration massique globale du système amphipol/protéine sur la stabilité de la protéine.

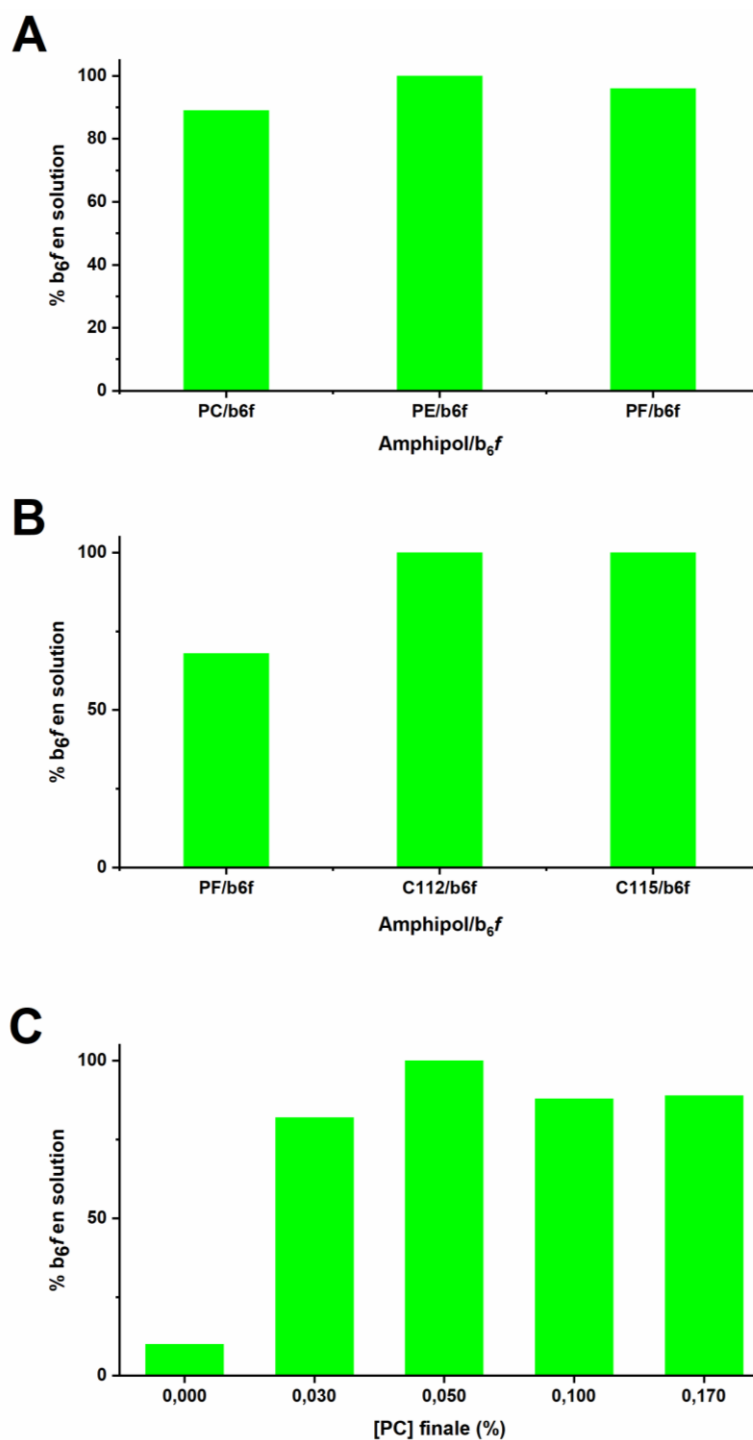
Dans le cas de la BR, les télomères **PC 84'** et **PF 94'** ont maintenu la majeure partie de celle-ci en solution alors que le télomère **PE 91'** s'est révélé moins efficace et n'a pas permis d'éviter la précipitation de la BR (cf. figure 2.23).



**Figure 2.23** : *A*/solubilité de la BR en fonction de chaque cotélomère présent en solution à la concentration de 0,13 %. *B*/solubilité de la BR en fonction de la concentration en cotélomère **PC (84')**. L'erreur de mesure des taux de solubilité est d'environ  $\pm 6$  %.



Avec le cytochrome *b<sub>6</sub>f*, exception faite pour le cotélomère **PF 94'** qui a induit une perte du *b<sub>6</sub>f* en solution quand la concentration massique de l'amphipol est tombée à 0,05 %, tous les télomères ont maintenu cette protéine en solution (cf. figure 2.24 A et B).



**Figure 2.24 :** solubilité du cytochrome *b<sub>6</sub>f* en fonction de chaque cotélomère présent en solution à la concentration de 0,17 % (A) ou 0,05 % (B) et en fonction de la concentration en amphipol PC (C). L'erreur de mesure des taux de solubilité est d'environ  $\pm 6$  %.

L'effet de la concentration en télomère sur l'association polymère/protéine a été testé avec le cotélomère **PC 84'** (figure 2.23B et 2.24C). Une concentration même faible en ce télomère de 0,025 % s'avère très efficace pour éviter l'agrégation de la PM après dilution en dessous de la CMC du détergent. Nous n'avons pas détecté de seuil limite jusqu'à 0,025% (des investigations menées dans des domaines de concentrations encore plus faibles auraient nécessité l'utilisation d'une solution de protéine très diluée, dont le dosage devenait plus délicat).

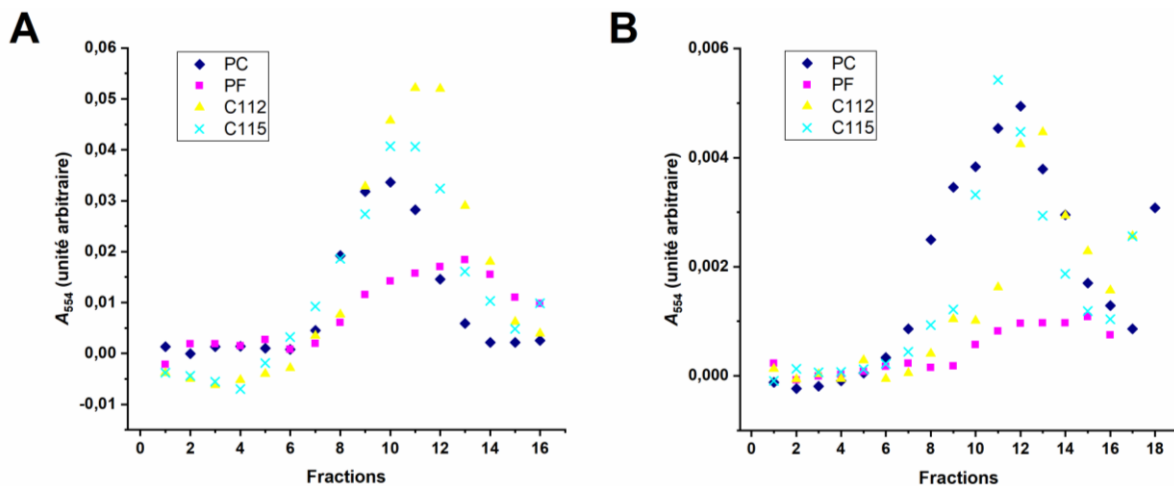
Toutes les préparations de BR présentaient un spectre U.V. "natif" caractérisé par un maximum d'absorption  $\lambda_{\max}$  voisin de 554 nm, peu ou pas de bandes à 380 nm (pic du rétinol libre) et un rapport  $A_{280}/A_{554}$  proche de 2.

### 3.2) Détermination de la polydispersion des associations amphipols-protéines formées et de leur stabilité après élimination de l'excès de polymère

Les complexes préparés comme ci-dessus, ont ensuite été soumis à une sédimentation à travers un gradient de saccharose ne contenant ni polymère libre, ni détergent. Au cours de leur migration, les molécules de détergent et de polymère qui ne sont pas associées à la protéine se séparent des complexes. Il faut également ajouter qu'une association réversible (de faible constante d'équilibre) conduit dans ces conditions à la dissociation des complexes, suivie d'une précipitation de la protéine "dénudée".

Les associations amphipols-protéine étaient censées sédimenter comme une espèce unique dans les conditions opératoires utilisées, mais dans certains cas, un étalement anormal de la zone contenant la protéine reflète la dispersité des complexes. Ces comportements ont été observés avec le polymère **PF 94'** et le polymère **PE 91'** qui ont donné des étalements anormaux aussi bien avec la BR que le  $b_{6f}$ .

En ce qui concerne la BR, les cotélomères **PC 84'**, **C112 74'** et **C115 76'** ont permis son maintien au sein d'une association apparemment assez homogène (cf. figure 2.25A) alors que le cotélomère **PC 84'** avait tendance à former des associations de tailles variées avec le  $b_{6f}$  (cf. figure 2.25B). L'existence d'un épaulement sur la courbe représentant l'évolution de la concentration en fonction des fractions pouvait traduire la présence de deux formes connues du  $b_{6f}$ , le monomère et le dimère. Il y aurait donc eu dans ce cas dénaturation de la protéine.



**Figure 2.25** : sédimentation de zone des complexes PM/amphipol suivie par absorption à 554 nm. *A/BR/amphipols*, la zone contenant la protéine compte 5 fractions pour le **PC 84'** et **C115 76'**, 6 fractions pour **C112 74'** et un étalement de la fraction 8 jusqu'au fond du tube pour le **PF 94'**. Une association PM/détergent homogène, comme le *b<sub>6</sub>f* natif, se retrouve typiquement dispersée sur 4 fractions dans les mêmes conditions de sédimentation et de vitesse. *B/b<sub>6</sub>f/amphipols*, la zone contenant la protéine comptait 5 fractions avec les amphipols **C112 74'** et **C115 76'**, 8 fractions avec l'amphipol **PC 84'** et un étalement de la fraction 10 jusqu'au fond du tube pour l'amphipol **PF 94'** (avec disparition importante de matériel probablement précipité).

En définitive, les résultats obtenus ont montré que les associations formées avec les télomères **C112 74'** et **C115 76'**, étaient assez homogènes. Toutefois ces associations s'avéraient nettement plus denses que les complexes formés entre amphipols chargés et PM.

En effet, un monomère de BR devait normalement sédimenter vers le milieu du tube de mesure servant de référentiel, en 15h environ (fraction 8-9), or cette fraction a été atteinte en seulement 6h30 par les trois complexes cotélomère/BR. Cette vitesse de sédimentation correspondait par exemple à celle d'un complexe de taille comparable au *b<sub>6</sub>f* de masse molaire 150-200 kDa, alors qu'une masse de 27 kDa était attendu, ce qui traduisait un taux d'agrégation important.

Néanmoins, l'effet amphipol a bien été démontré. Il restait sans doute à mieux maîtriser les phénomènes d'auto-agrégation qui semblaient intervenir au niveau des polymères et/ou des associations polymères/protéines afin de réduire suffisamment leur masse et leur rayon.

### 3.3) Mesures de l'activité enzymatique du cytochrome *b<sub>6</sub>f*

Le cytochrome *b<sub>6</sub>f* est un complexe particulièrement fragile. Quand il est exposé à un excès d'Hecameg ou de lauryl maltoside, il perd une de ses sous-unités et devient enzymatiquement inactif.

L'activité enzymatique est déterminée par la constante de vitesse de la réaction de transfert d'électron ( $k_{\text{esp}}$ ) entre la decylplastoquinone et la plastocyanine oxydée, réaction catalysée par le cytochrome  $b_6f$ .

Les mesures d'activité enzymatique du cytochrome  $b_6f$ , après piégeage avec le cotélomère, ont été effectuées dans un premier temps par dilution du complexe  $b_6f$ /cotélomère dans une solution à 0,25 mM de lauryl maltoside. Une seconde série de mesures a été effectuée, par dilution du complexe  $b_6f$ /télomère dans une solution du même télomère (0,25 mM de chaînes alkyle pendantes).

Enfin, l'activité enzymatique du complexe  $b_6f$ /télomère purifié dans un gradient de saccharose (donc exempt de détergent libre et de polymère libre), a été mesurée dans une solution à 0,25 mM de lauryl maltoside.

Immédiatement après piégeage avec les cotélomères, les associations  $b_6f$ /cotélomère se sont avérées actives dans une solution de lauryl maltoside (figure 2.26A). L'association avec ces polymères n'induisait donc pas de dénaturation.

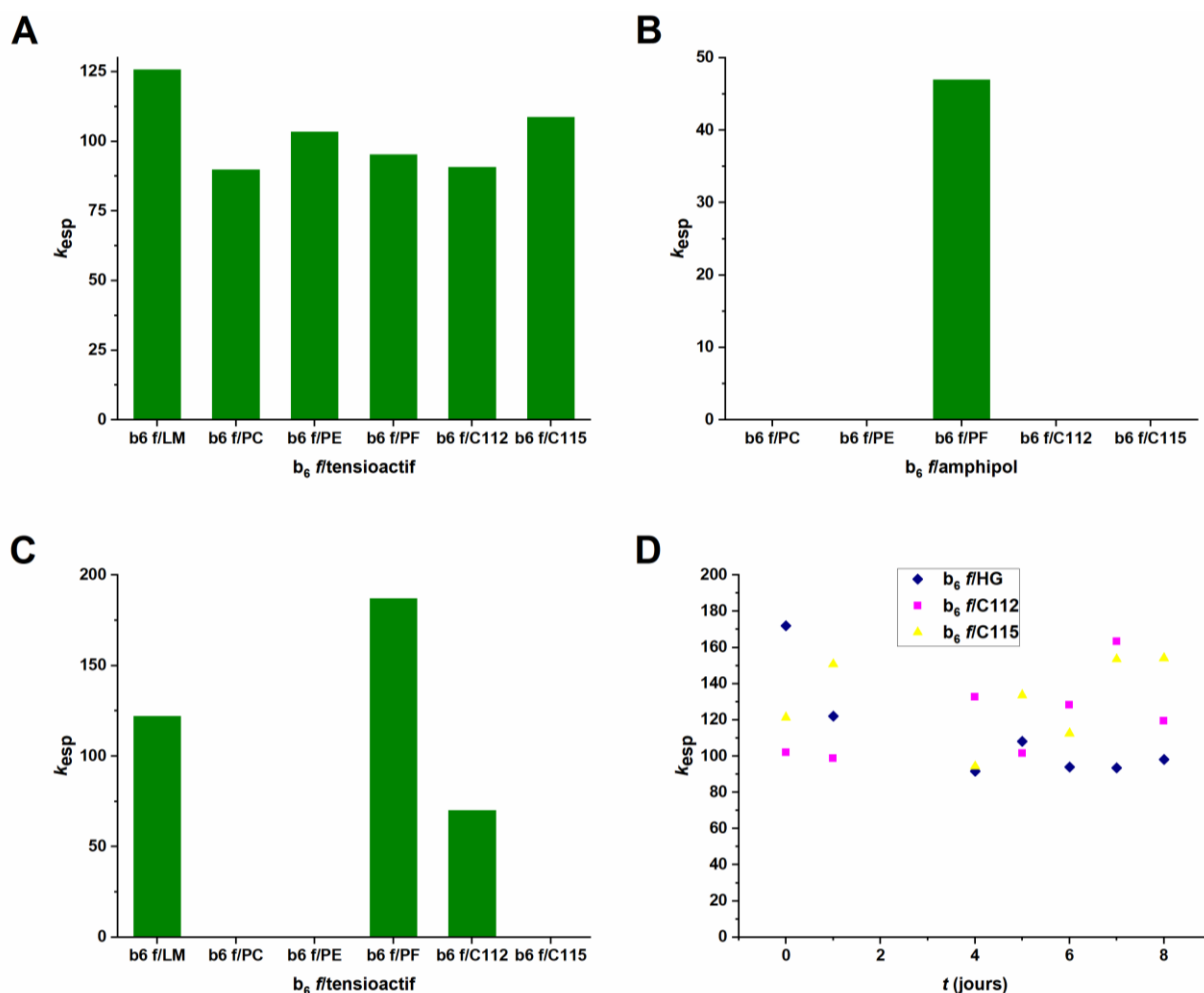
Lorsque le milieu de mesure de l'activité a été changé pour une solution de télomère, c'est à dire lorsque l'on a provoqué une dilution dans une telle solution, seul le complexe  $b_6f$ /**PF 94'** a montré une activité (figure 2.26B).

Une autre expérience a été effectuée afin de vérifier si le  $b_6f$  en Hecameg restait actif ou non dans les différentes solutions de télomères. Il a été constaté que le  $b_6f$  s'avèrait actif seulement dans les solutions de **PF 94'** et de **C112 74'** (cf. figure 2.26C).

Ces résultats montraient, d'une part, que le  $b_6f$  n'était pas dénaturé irréversiblement par les cotélomères (permettant une activité en milieu lauryl maltoside), et d'autre part, qu'en absence de détergents, l'activité disparaissait presque instantanément, sauf avec le télomère **PF 94'**.

Après la purification des associations PM/amphipols et l'élimination des détergents et polymères libres en solution, les complexes  $b_6f$ /**C112 74'** et  $b_6f$ /**C115 76'** possédaient une activité semblable à celle du  $b_6f$  conservé en Hecameg. Le complexe  $b_6f$ /**PC 84'** avait perdu la majeure partie de son activité et le complexe  $b_6f$ /**PF 94'** devenait inactif.

La stabilité des complexes  $b_6f/C112$  74' et  $b_6f/C115$  76' a été évaluée pendant une période de deux semaines. Ces associations se sont révélées très stables tout au long de cette période (cf. figure 2.26D).



**Figure 2.26** : tests de l'activité enzymatique du cytochrome  $b_6f$  en interaction avec différents amphiphiles. **A**/Activité des différents complexes après dilution dans une solution de LM. L'association préalable des différents cotélobères avec le  $b_6f$  n'a pas induit une perte d'activité des complexes dilués dans une solution de LM, celle-ci s'étant avérée semblable à celle du  $b_6f$  conservé en HG. **B**/Dilués dans une solution de cotélobère, les complexes  $b_6f$ /cotélobères se sont révélés majoritairement inactifs, l'activité n'ayant été conservée uniquement dans une solution de **PF 94'**. **C**/Le  $b_6f$  conservé dans une solution d'HG s'est avéré actif dans les solutions de lauryl maltoside, de **PF 94'** et de **C112 74'**. **D**/Les associations  $b_6f/C112$  74' et  $b_6f/C115$  76' purifiées dans un gradient de saccharose, ont retrouvé une pleine activité en LM. Les complexes se sont avérés très stables en conservant l'activité de la protéine pendant une période d'une semaine.

#### 4) Conclusion

Quand la protéine modèle a été mise en présence d'un excès d'un des cinq télomères testés, nous avons pu observer que la PM était maintenue en solution; l'effet "détergent" (c'est à dire le maintien de la protéine en solution) était démontré.

Une fois purifiés dans des solutions ne contenant ni détergent libre ni télomère libre, seuls les deux télomères **C112 74'** et **C115 76'** ont formé des associations (avec les deux PMs modèles) relativement homogènes et préservant l'état natif.

Le **PC 84'** a formé une association plutôt homogène avec la BR, mais beaucoup plus hétérogène avec le  $b_6f$ . Le **PE 91'** et le **PF 94'** ont montré une faible aptitude à l'association avec les protéines dont ils semblaient se détacher (ou bien formaient des complexes de tailles très variables) dès que le polymère et le détergent en excès étaient retirés.

Les associations  $b_6f$ /cotélomères se sont avérées actives dans une solution de lauryl maltoside mais inactives dans la solution de cotélomère. Les complexes purifiés de  $b_6f$ /**C112 74'** et de  $b_6f$ /**C115 76'** conservaient leur activité après une incubation à 4° C en milieu tampon durant 15 jours au moins (en fait cette période pouvait être prolongée à un mois ou plus).

Il n'était pas aisé de donner une explication à chacun de ces résultats. Il apparaissait notamment difficile de déterminer quelles étaient les causes engendrant une certaine dispersité des associations amphipol/protéine dont la taille semblait apparemment plus importante que celle des complexes amphipols chargés/protéine.

Ce phénomène pouvait être attribué aux propriétés associatives (mise en évidence et étudiées en détail dans le premier chapitre) des motifs Tris dans l'eau. Des expériences de diffusion quasi-élastique de la lumière (Q.E.L.S.) devaient permettre d'approfondir nos investigations dans ce domaine.

Les résultats obtenus montraient cependant, que l'association amphipol/protéine dépendait bien de la HLB de la macromolécule (les meilleurs résultats ont été obtenus pour des taux de greffage compris entre 25 et 30 % par rapport aux unités monomères) mais aussi de la longueur des chaînes latérales hydrophobes. Les télomères **PF 94'** et **PE 91'** greffés en C<sub>7</sub> donnaient des interactions hydrophobes moins importantes que celles établies avec les cotélomères **C112 74'** et **C115 76'** greffés en C<sub>11</sub>.

L'introduction d'un groupement galactopyranosyle hydrophile dont la fonction était d'améliorer l'hydrosolubilité de l'amphipol et donc du complexe, ne semblait pas avoir une grande influence sur l'association, mais il aurait été tout de même intéressant, dans le but de vérifier cette hypothèse, de réaliser une expérience supplémentaire avec un amphipol dont le  $\overline{DP}_n$  et le rapport monomères hydrophiles/monomères hydrophobes auraient été identiques à ceux du cotélomère **C112 74'** (ou **C115 76'**) sur lequel nous aurions introduit un ou plusieurs groupements saccharidiques par unité hydrophile.

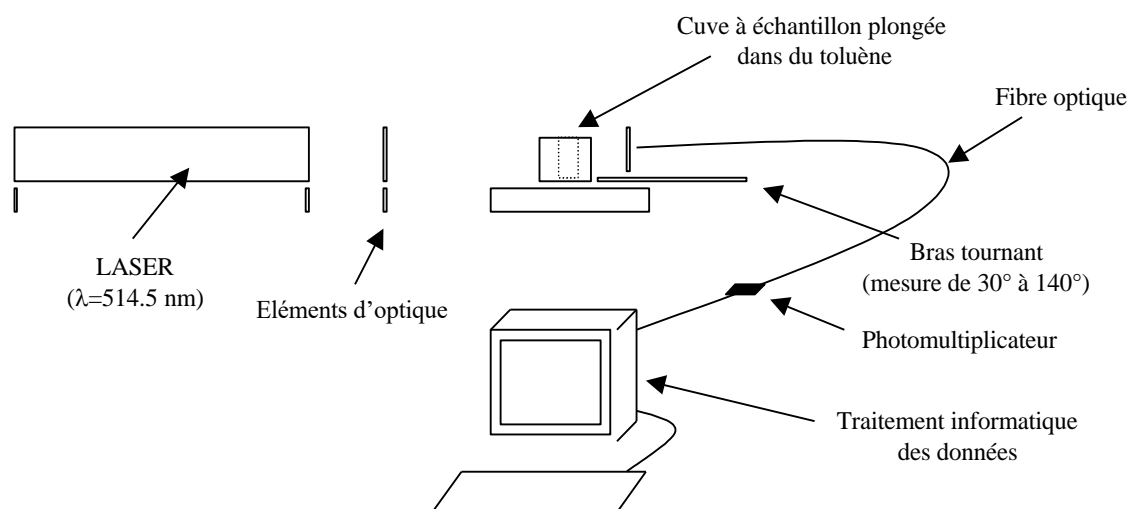
A ce propos, rappelons que plusieurs auteurs<sup>284-287</sup> ont déjà mentionné le fait que l'adsorption d'une protéine hydrophobe (fibrinogène) ou hydrophile ( $\gamma$  globuline, albumine de sérum de bœuf) à la surface d'un polymère amphiphile est fortement compromise lorsque le taux de monomères hydrophiles (2-glucosyloxy)éthyl méthacrylate, 2-(acryloyloxy)éthyl-phosphorylcholine) augmente et ce, même si le taux de monomères hydrophobes (styrène, acrylate ou méthacrylate d'alkyle) est encore assez important (80 %).

Une telle expérience fournirait donc des informations supplémentaires sur le comportement des amphipols neutres dérivant du Tris.

#### IV) ANALYSE DE LA COMPOSITION DES SOLUTIONS AQUEUSES D'AMPHIPOLS ET DES COMPLEXES AMPHIPOLS/PROTÉINE PAR DIFFUSION QUASI ÉLASTIQUE DE LA LUMIÈRE (Q.E.L.S.)

*L'ensemble de ces travaux a été effectué par M<sup>lle</sup> C. Prata et M. C. Tribet au laboratoire de physicochimie macromoléculaire de l'ESPCI, (PARIS).*

##### 1) Principe et théorie de la diffusion quasi-élastique de la lumière



**Figure 2.27** : schéma d'un montage d'analyse en Q.E.L.S.

Cette technique est généralement utilisée pour déterminer les dimensions des particules en suspension ou dispersées (liposomes, vésicules, micelles) dans une solution. Elle permet aussi d'accéder à certaines informations concernant la dispersité de ces suspensions.

Le principe de la diffusion quasi-élastique de la lumière (cf. figure 2.27) consiste à analyser les fluctuations du signal provenant du photomultiplicateur placé en un point d'observation du champ diffusé. Le signal, proportionnel à l'énergie lumineuse reçue par le photomultiplicateur, permet de déterminer la fonction d'autocorrélation de l'intensité diffusée  $G(q,t)$ , qui est liée à la fonction d'autocorrélation du champ diffusé  $g(q,t)$  par :

$$G(q,t) = A(1 + \beta g^2(q,t)) \quad (1)$$

où  $q$  est l'amplitude du vecteur de diffusion,  $A$  est un paramètre expérimental rendant compte de la ligne de base et  $\beta$  est la fraction de la lumière corrélée.

La fonction d'autocorrélation  $g$  est développée autour d'une valeur moyenne, sous forme d'une fonction polynomiale, dont les paramètres ajustables sont appelés « cumulants » :



$$\ln(g(t)) = K_0 - \bar{\Gamma}t + \frac{1}{2}\mu_2 t^2 - \frac{1}{3}\mu_3 t^3 + \dots \quad (2)$$

où  $K_0$  est une constante expérimentale et  $\mu_2$  est le second cumulant de la distribution.

Dans le cas d'une dispersion diluée d'un type unique de particules, pour un vecteur donné  $\vec{q}$ , les deux premiers cumulants de la distribution sont reliés au coefficient d'autodiffusion  $D$  de l'espèce diffusante par :

$$\bar{\Gamma} = \bar{D}q^2 \quad (3)$$

$$\text{et } \mu_2 = \langle D^2 - \bar{D}^2 \rangle q^4 \quad (4)$$

Nous pouvons donc obtenir, dans l'hypothèse où les interactions entre particules restent faibles, d'une part une mesure du coefficient d'autodiffusion  $D$ , grâce à la première relation (équation 1), ainsi que la valeur du rayon hydrodynamique apparent moyen des objets  $R_H$  donné par la relation de Stokes-Einstein :

$$R_H = \frac{k \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot D} \quad (5)$$

où  $k$  est la constante de Boltzmann,  $T$  est la température absolue et  $\eta$  est la viscosité du solvant.

D'autre part, nous pouvons calculer  $Cum2$ , indice de la largeur relative de la distribution des coefficients de diffusion.  $Cum2$  est défini par :

$$Cum2 = \frac{\mu_2}{\bar{\Gamma}^2} \quad (6)$$

Le paramètre  $Cum2$  peut être relié à l'indice de dispersion  $I_p$  défini par :

$$I_p = \frac{\bar{M}_n}{\bar{M}_w} \quad (7)$$

Dans le cas d'une distribution gaussienne des masses molaires du système étudié et dans le cas particulier des sphères creuses, comme les vésicules, ou des polymères dans un solvant  $\theta$ , nous avons :

$$Cum2 + 1 = I_p^{1/4} \quad (8)$$

Il est donc possible d'avoir également accès à la valeur de  $I_p$  en connaissant la valeur de  $Cum2$ .

## 2) Calcul des différentes valeurs accessibles par analyse de l'intensité diffusée.

La technique QELS permet d'accéder à différents paramètres dont les principaux sont le rayon hydrodynamique (cf. relation 5 ci-dessus), la masse apparente, la masse moyenne en poids et le rayon de gyration de l'objet étudié.

La masse apparente ( $M_{app}$ ) et le rayon de giration ( $R_g$ ) qui donne des informations sur la répartition des masses de l'objet par rapport à son centre de gravité sont donnés par les relations suivantes :

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M_{app}} \left( 1 + \frac{q^2 R_g^2}{3} \right) \quad (9)$$

$$\frac{1}{M_{app}} = \frac{1}{\bar{M}_w} (1 + 2A_2 C) \quad (10)$$

avec  $K$  une constante,  $C$  la concentration exprimée en g.mL<sup>-1</sup>,  $R_\theta$  le rapport de Rayleigh mesuré à l'angle  $\theta$  et  $A_2$  une constante appelée second coefficient du viriel.

Le rapport de Rayleigh  $R_\theta$  est déduit de la relation suivante :

$$R_\theta = R_{ref} \cdot \frac{I_{solution} - I_{solvant}}{I_{ref}} \quad (11)$$

$R_{ref}(\lambda_0) = 0,333 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  est le coefficient de Rayleigh du toluène (pris comme référence) mesuré à  $\lambda_0$  la longueur d'onde incidente,  $I_{solution}$ ,  $I_{solvant}$  et  $I_{ref}$  sont respectivement les intensités diffusées par la solution, le solvant de la solution et le toluène.

La constante  $K$  est donné par :

$$K = \frac{4\pi \cdot n_{ref}^2 \left( \frac{dn}{dc} \right)^2}{\lambda_0^4 \cdot N_A} \quad (12)$$

avec  $\lambda_0 = 514.5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}$ ,  $n_{ref}$  l'indice de réfraction du toluène ( $n_{ref} = 1,496$ ) et  $N_A$  le nombre d'Avogadro.

Le vecteur de diffusion  $q$  est donné par la relation suivante :

$$q = \frac{4\pi n_{solvant}}{\lambda_0} \sin(\theta/2) \quad (13)$$

avec  $n_{solvant} = 1,333$ .

### 3) Analyse de l'intensité diffusée par les solutions d'amphipols neutres dérivés du Tris

L'étude présentée a concerné les amphipols non-ioniques **C<sub>112</sub>** ou **74'**, **C<sub>115</sub>** ou **76'**, **PC** ou **84'**, **PF** ou **94'** et **100'**. Les résultats (cf. tableau 2.15) sont comparés avec ceux obtenus lors des mêmes analyses avec trois amphipols chargés : le **A8-35[25C8-40C3]**, le **A8-44[17C8-39C3]** et le **A34-0[25C8-55C2-20Glc]**.

La nomenclature de ces amphipols chargés désigne la masse de l'amphipol en kDa (premier chiffre), le pourcentage de fonctions anioniques non greffées (deuxième chiffre) et entre

parenthèses le pourcentage de chaînes octyles (**C8**) greffées, le taux de greffage en isopropyle (**C3**) ou en éthyle (**C2**) et le taux de greffage en glucosamine (**Glc**).

Amphipol	$R_H$ (nm) et %age de lumière diffusée		$\bar{M}_w$ (g.mol <sup>-1</sup> )	$N_{ag}$	$R_g$ (nm)	$I_p$
A8-35[25C8-40C3]	5,5	-	100 000	8	-	2,07
A8-44[17C8-39C3]	-	73,8	1 600 000	ag	-	5,34
A34-0[25C8-55C2-20Glc]	5,3	-	155 000	4,5	-	1,57
<i>PC</i> ( <b>84'</b> )	4,4 (80 %)	59,5 (20 %)	155 000	5,5	≈ 25,5	1,57
<i>PE</i> ( <b>91'</b> )	3,7 (90 %)	75,9 (10 %)	71 000	11	45,2	1,36
<b>C</b> <sub>115</sub> ( <b>76'</b> )	4,9 (90 %)	62,0 (10 %)	17 000	6	51,1	1,57
<b>C</b> <sub>112</sub> ( <b>74'</b> )	5,9 (85 %)	86,6 (15%)	330 000	61	10	1,57
<b>100'</b>	2,99 (88 %)	33,9 (12 %)	69 000	8	5,04	1,52

**Tableau 2.15** : résultats des analyses de l'intensité diffusée des différentes solutions d'amphipols. **Les  $R_g$  inférieurs à 20 nm ne représente pas des valeurs significatives.**  $N_{ag}$  représente le nombre d'agrégation (nombre de polymères associés). Tous les graphes relatifs aux différentes expériences ont été répertoriés dans la partie expérimentale.

Les résultats obtenus ont montré que les cotélomères formaient des agrégats en solution aqueuse assez homogènes en taille. Les amphipols non-ioniques s'associaient pour générer deux populations d'agrégats (petits et des gros) en proportions nettement différentes. Les gros agrégats étaient à l'origine de 15 % en moyenne de l'intensité diffusée correspondant à un pourcentage massique de l'ordre de 0,1 %. Cette valeur était faible et nous pouvions considérer que les amphipols non-ioniques formaient majoritairement de petits objets.

Nous ne sommes pas parvenus à apporter une explication formelle à ce phénomène. Plusieurs auteurs<sup>101,288-290</sup> ont pu observer des distributions bimodales de taille d'agrégats formés par des polymères amphiphiles neutres. Konak *et al.*<sup>291</sup> ont expliqué la formation des agrégats de taille importante par l'existence d'interactions hydrophobes aléatoires supplémentaires.

Ces auteurs ont rapporté qu'il s'établissait un équilibre entre des agrégats de taille réduite et dont les parties polaires constituaient une enveloppe compacte inhibant toute formation de nouvelle association hydrophobe et des agrégats de dimension plus importante où la structure plus fluide permettait l'insertion d'un nombre plus important de macromolécules.

Nous ne devons cependant pas négliger le fait que les groupements polaires de nos macromolécules présentent certaines propriétés associatives en solution aqueuse. Il était donc permis d'attribuer le phénomène une fois de plus au probable établissement de liaisons hydrogène

entre les motifs Tris dans l'eau. De telles associations étaient susceptibles de conduire à la formation d'agrégats de plus grande dimension.

Nous pouvons noter qu'il est à ce niveau très difficile de tirer des conclusions quant à l'influence des différents paramètres de structures sur la composition et la taille des agrégats. Il est en effet impossible de connaître ici le lien existant entre la composition et la taille de l'amphipol et les dimensions des agrégats formés.

Nous ne connaissons pour le moment ni l'influence des groupements saccharidiques ni celle de la HLB de la macromolécule. Le  $\overline{DP}_n$  semble cependant avoir une influence sur le nombre d'agrégation ( $N_{ag}$ ), ce dernier augmentant lorsque la taille de la macromolécule diminue.

La détermination du rayon de giration permet de disposer d'informations sur la géométrie des agrégats. Celle-ci est préfigurée par la valeur du rapport  $R_g/R_H$ . Plus ce rapport est élevé plus l'objet aura tendance à adopter une géométrie oblongue voire cylindrique.

Les rayons de giration des agrégats formés par les amphipols **76'**, **84'** et **91'** se sont révélés nettement plus importants que les rayons hydrodynamiques respectifs de ces derniers. Les objets formés par ces trois cotélomères semblaient donc posséder une géométrie plutôt allongée alors que les amphipols **100'** et **74'** formaient des agrégats dont les formes étaient plutôt sphériques.

Nous constatons encore une fois qu'il est actuellement très difficile de tirer des conclusions et d'exprimer la relation pouvant exister entre la structure de l'agrégat et celle de l'amphipol.

Dans le cas opposé des amphipols ioniques, nous avons observé que le pourcentage de chaînes greffées ou plutôt le taux de fonctions acides libres a été un paramètre décisif quant aux propriétés de la structure supramoléculaire formée. La taille des agrégats dépendait fortement du pH de la solution et lorsque celui-ci devenait inférieur à 7, les amphipols ioniques avaient tendance à précipiter. A noter enfin que les indices de dispersion en taille de ces particules étaient du même ordre que celles observées avec les particules formées par les amphipols non-ioniques.

#### **4) Analyse des associations amphipols/protéines par Q.E.L.S.**

Les expériences ont été effectuées sur le complexe  $b_6 f$ /amphipol et ont permis de mettre en évidence le fait que la taille des associations formées avec les amphipols non-ioniques était plus importante que celle des complexes formés avec les amphipols ioniques (cf. tableau 2.16).

Complexe	$R_h$ (nm)	$I_p$
$b_6f/hecameg$	12,5	3,41
$b_6f/C112$	14,6	1,48
$b_6f/A34-0[25C8-55C2-20Glc]$	6,9	2,24
$b_6f/A34-0[25C8-75C2]$	-	-

**Tableau 2.16** : résultats des analyses Q.E.L.S des complexes  $b_6f$ /amphipols.

Nous avons pu ainsi montrer que les dimensions du complexe  $b_6f/C112$  étaient deux fois plus importantes que celles du complexe  $b_6f/A34-0[25C8-55C2-20Glc]$  et du même ordre de grandeur que celles de la même protéine conservée en Hécameg.

Une possible interprétation de ce phénomène s'appuyait à nouveau sur la théorie des liaisons hydrogène intervenant entre motifs Tris et conduisant à une agrégation des complexes.

Nous pouvions cependant très bien imaginer que certaines propriétés particulières de ces amphipols autres que les liaisons hydrogène pouvaient induire des comportements différents de celui des amphipols ioniques. Les énergies et les mécanismes de solvation des sites hydrophiles étaient très différents pour chacun de ces polymères.

Il est connu que les fonctions alcool solvatées dans l'eau comportent 4 à 5 molécules d'eau dans la première sphère de coordination<sup>292,293</sup> alors que les fonctions carboxylate interagissent, dans les mêmes conditions, avec 7 à 8 molécules d'eau<sup>294</sup>. Ces interactions étant plus nombreuses et plus fortes dans le cas des carboxylates ( $\Delta G \sim -65 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) que dans le cas des alcools ( $\Delta G \sim -20 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ), impliquent la formation d'une cage de solvation plus dense et plus fine autour des carboxylates.

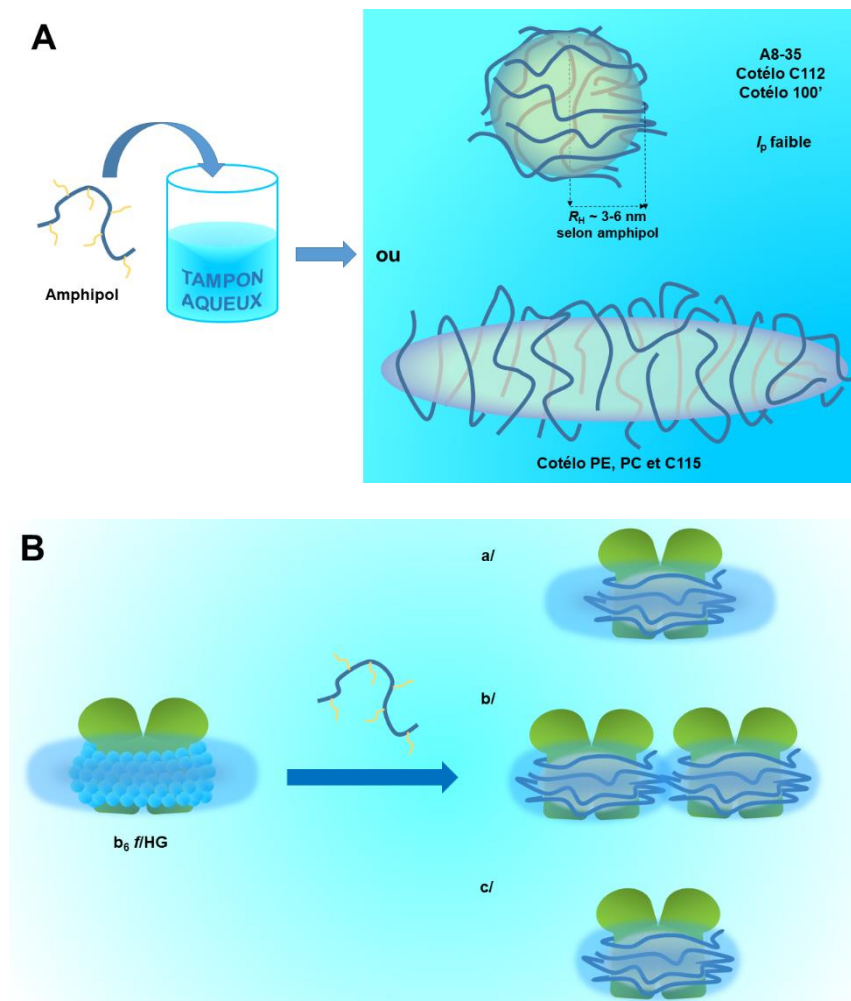
Il n'était donc pas exclu que la cage de solvation des motifs Tris, plus diffuse et plus épaisse que celle des motifs carboxylates, engendrait alors une exclusion de volume et impliquait le maintien de la protéine au sein d'une coque de dimension relativement importante (plus importante que celle d'une coque formée d'amphipols ioniques).

Ceci a déjà été observé dans le cas de la comparaison de la taille d'une micelle de détergents neutres à tête poly(oxyéthylénique) avec celle d'une micelle de détergents cationiques, l'épaisseur de la coque d'hydratation s'étant avérée significativement plus importante dans le cas de la micelle non chargée (20 Å pour une micelle de triton X-100 contre 6-9 Å pour une micelle de CTAB)<sup>295</sup>.

On aura également noté que l'indice de dispersion en taille de ces particules est relativement faible par rapport à celui des complexes formés avec les amphipols ioniques.

La valeur trouvée pour la taille de la protéine conservée en Hécameg n'était pas vraiment significative, car il était fort probable que la présence d'impureté ait pu fausser les mesures. Dans le cas des complexes amphipols-protéines les valeurs obtenues faisaient sens et correspondaient à celles attendues. L'indice de dispersité en taille des complexes amphipols non ioniques-protéines correspondait à celui d'une dispersion de protéine purifiée en détergent.

Un résumé des principaux résultats obtenus lors des expériences de Q.E.L.S. est donné dans la figure 2.28 ci-dessous.



**Figure 2.28** : résumé des résultats de l'analyse du comportement des amphipols en phase aqueuse par Q.E.L.S. **A/**Les amphipols seuls en solution ont formé, suivant l'amphipol considéré, soit des particules sphériques homogènes soit des particules oblongues (ou autre type de morphologie allongée). **B/**L'amphipols non ioniques C112 a formé des complexes avec le cytochrome  $b_6f$  de taille et dispersité comparables à celles du complexe  $b_6f$ /HG (cas a) et b)) alors que l'amphipol chargé A34-0[25C8-55C2-20Glc] a formé des complexes deux fois plus petits avec la même PM (cas c)). La différence de taille observée pouvait s'expliquer soit en faisant intervenir des cages de solvation de même ordre de grandeur pour les complexes en HG ou en C112 soit en faisant intervenir l'agrégation des complexes en C112 générée par l'établissement de liaisons hydrogène au niveau des tête Tris. Dans ce cas les tailles des complexes en C112 et en amphipol ionique étaient similaires.

## V) CONCLUSION

Dans le présent travail, des amphipols non-ioniques ont été préparés suivant deux méthodes distinctes correspondant d'une part à la cotélomérisation de deux monomères et d'autre part à la modification d'un homotélomère précurseur du THAM.

Les résultats obtenus lors des travaux décrits dans le premier chapitre et de quelques expériences préliminaires nous ont conduits à cotélomériser en phase organique homogène deux dérivés du THAM dont la protection des fonctions alcool assurait leur parfaite solubilité dans les solvants utilisés.

Nous avons pu constater au cours de ce travail que ces réactions de télomérisation étaient très sensibles aux effets de solvant et nous avons retrouvé certains phénomènes (clivage des acétyles dans le méthanol, augmentation des vitesses de réaction dans les solvants apolaires) déjà rencontrés au cours des expériences de cinétique décrites dans le premier chapitre de cette thèse.

La cotélomérisation de monomères protégés par acétylation s'est révélée la technique la mieux adaptée à la synthèse d'amphipols non-ioniques dérivés du Tris. Elle a permis, d'une part, le contrôle des paramètres de structure de la macromolécule et d'autre part une analyse structurale fiable. Par contre, la méthode impliquant la modification hydrophobe d'un homotélomère du THAM isopropylidène a conduit à la formation de macromolécules pour lesquelles il a été difficile de déterminer et de proposer une structure sans commettre certainement une erreur non négligeable sur l'estimation des tailles et pourcentages de greffage.

Les tests biochimiques ont montré que plusieurs de ces cotélomères pouvaient maintenir une protéine hydrophobe en solution aqueuse sous sa forme native et que l'aptitude à former des complexes stables avec les protéines dépendait essentiellement de la HLB de l'amphipol non ionique et de la longueur des chaînes latérales hydrocarbonées.

Ils ont aussi permis de mettre en évidence le fait que les complexes amphipols neutres/protéine avaient une taille supérieure à celle des complexes amphipols ioniques/protéine. Ce phénomène pouvait s'expliquer par une auto-agrégation des associations amphipols/protéine dues aux propriétés associatives en solution aqueuse des motifs Tris ou par la formation d'une cage de solvation plus importante pour les particules non chargées.

Cette dernière observation a motivé une étude Q.E.L.S. qui a permis de confirmer que la taille des agrégats formés par les amphipols non-ioniques en présence de protéines était supérieure à celles des complexes PM/amphipols ioniques. Il a été de même montré que ces agrégats présentaient une faible dispersité.

L'ensemble de ce travail a permis de montrer les potentialités offertes par les télomères amphiphiles pour stabiliser les protéines membranaires. Il est bien évident que les études exposées ici doivent être considérées comme une toute première approche et ne sauraient prétendre à définir ou à caractériser tous les paramètres intervenant dans ce problème complexe.

Elles valident toutefois le concept et ouvrent ainsi la voie à de nouvelles recherches susceptibles non seulement de préciser l'impact et l'importance de paramètres tels que la taille du télomère, la longueur, la nature et la proportion de chaînes hydrophobes, le rôle des liaisons hydrogène intervenant dans les associations mais également de mettre au point un procédé (sur le plan chimique) capable de favoriser la compréhension et le suivi des associations qui se créent entre les protéines et l'amphipol.



# **CHAPITRE III**

*Synthèses et études des propriétés  
rhéologiques de polymères associatifs  
dérivés du Tris.*

## *D) INTRODUCTION*

A l'aube du troisième millénaire, si bien des maladies encore redoutées il y a quelques décennies ont été vaincues et ne représentent plus actuellement un quelconque danger pour le genre humain, il en est d'autres bien plus redoutables contre lesquelles aucune des méthodes thérapeutiques proposées ne se sont encore révélées efficaces.

Ces maladies font intervenir des mécanismes d'infection complexes faisant appel à des interactions cellule hôte-parasite encore mal connues et mal définies. Ce sont des maladies virales (cancer, sida, virus ebola...) ou microbiennes (paludisme) dont les agents pathogènes (virus, bactérie, eucaryotes) sont dotés d'une très grande aptitude à la mutation. Cette dernière propriété est un véritable obstacle à l'isolement et à la caractérisation de l'agent infectieux dont la composition et la structure du génome subit périodiquement des variations. C'est cette même propriété qui a permis aux éléments pathogènes de développer des mécanismes de résistance capables de tenir en échec pendant longtemps bon nombre de tentatives de traitement (notamment la vaccination).

Très vite, il s'est avéré plus judicieux d'élaborer un moyen qui permettrait d'inhiber la prolifération du microbe au sein de l'organisme infesté plutôt que de tenter de procéder à l'élimination systématique de l'élément pathogène. Les progrès réalisés dans ce domaine permettent aujourd'hui de disposer d'un choix important de principes actifs dont l'efficacité n'est plus à remettre en cause. Cependant, si ces médicaments sont efficaces, ils présentent toujours une certaine toxicité car leur activité non spécifique peut entraîner l'apparition de complications au sein de l'organisme traité.

Le traitement des maladies telles que le cancer par chimiothérapie en est indiscutablement l'exemple le plus classique. Les principes actifs utilisés (doxorubicine ou adriamycine, ara-C, 5-Fu) sont des agents antimétaboliques dont la fonction est de bloquer la prolifération cellulaire anarchique au niveau de la tumeur en inhibant les mécanismes de la mitose.

Ces principes actifs agiront indifféremment sur une cellule saine ou une cellule tumorale. De plus, à cause de leur mauvaise biodisponibilité et biodistribution, ils seront en grande partie métabolisés et désactivés.

Le développement de thérapies nouvelles et efficaces mais non spécifiques a très vite mis en évidence l'absolue nécessité de conceptualiser et de créer des méthodes qui permettraient de cibler

sélectivement l'organe infecté et d'assurer de meilleures conditions de l'acheminement *in-vivo* de la drogue.

Le concept de ciblage est un concept très ancien qui préoccupait déjà les praticiens de la médecine chinoise traditionnelle il y a près d'un millénaire. Paul Ehrlich<sup>296,297</sup> l'a ensuite repris et a proposé, il y a pratiquement un siècle, des structures qu'il baptisait alors « haptophores », composées de deux parties : une partie active et une partie porteuse. Cependant, il a fallu attendre 1958 pour que la première réelle tentative de ciblage ait été effectuée : un anticorps spécifique des cellules leucémiques fut couplé au méthotrexate<sup>298</sup>.

Depuis, de nombreux travaux ont été réalisés et ont conduit à l'élaboration de nombreuses structures présentant les critères recherchés d'un potentiel système vectoriel. Deux approches de la vectorisation sont envisageables :

- Soit la drogue est liée au vecteur par liaison chimique covalente et le vecteur est alors généralement une macromolécule naturelle ou synthétique.

- Soit le principe actif est encapsulé par le vecteur qui est dans ce cas un agrégat (micelle, liposome) de molécules ou macromolécules amphiphile au sein duquel le principe actif est maintenu, suivant sa nature lipophile ou hydrophile, dans des sites hydrophobes ou aqueux.

## 1) Vecteurs macromoléculaires

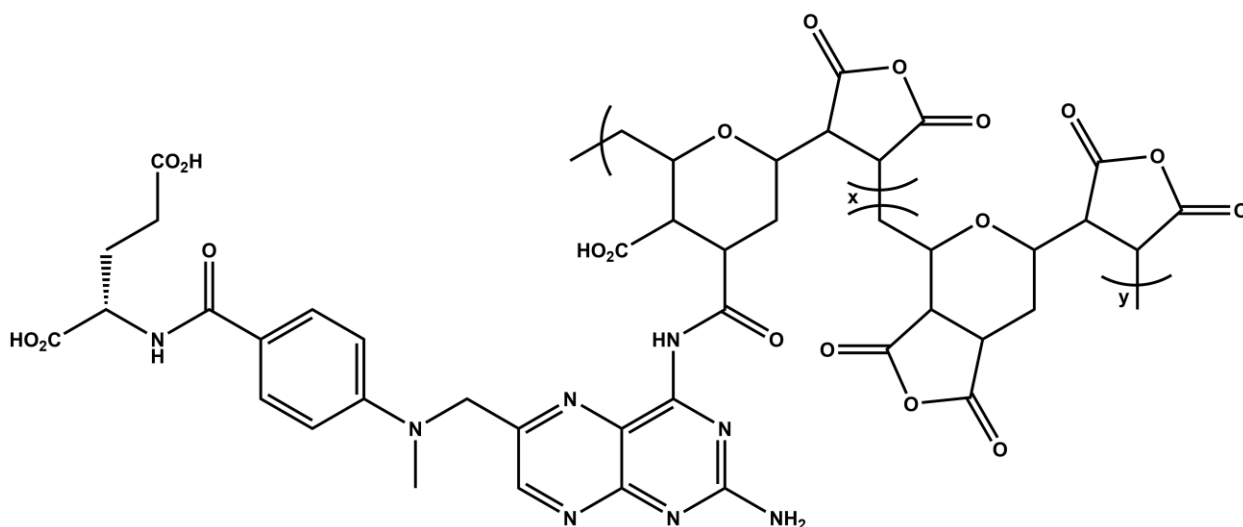
Ringsdorf<sup>299</sup> a établi le premier un modèle de vecteur macromoléculaire constitué d'une chaîne macromoléculaire biocompatible dotée de trois types de groupements latéraux : les groupements conférant à la structure des propriétés particulières de solubilité (hydrophilie, lipophilie), les groupements ayant pour fonction de permettre un ciblage sélectif et enfin le principe actif lié au polymère par l'intermédiaire d'un bras écarteur susceptible d'être hydrolysé par certaines enzymes *in-vivo* et conférant au principe actif, maintenue à distance de la macrostructure, un certain degré de liberté.

Le choix d'un vecteur macromoléculaire est justifié par le fait que si une molécule de faible masse moléculaire peut diffuser facilement à travers la membrane plasmique de n'importe quelle cellule par transport passif ou actif, lorsque la masse du vecteur est suffisamment importante, le passage dans le milieu intracellulaire est alors effectué par pinocytose et toutes les molécules actives greffées sont internalisées.

Il est ainsi possible de bénéficier d'un effet de dépôt à condition bien sûr, que la métabolisation du vecteur dans le milieu extracellulaire soit particulièrement lente. Après pénétration dans le cytoplasme, le vecteur et le bras écarteur lié au principe actif seront alors dégradés par les enzymes lysosomales. Un relargage lent et continu du médicament au sein de la cellule cible devrait être ainsi assuré.

Précisons qu'il a été démontré que plusieurs polymères et copolymères dépourvus de tout principe actif, présentaient déjà une activité biologique. C'est le cas, par exemple, pour les cyclo-copolymères de divinyl éther et d'anhydride maléique (DIVEMA) qui présentent, pour une masse molaire définie, une certaine activité antitumorale et la propriété d'activer les macrophages<sup>300</sup>.

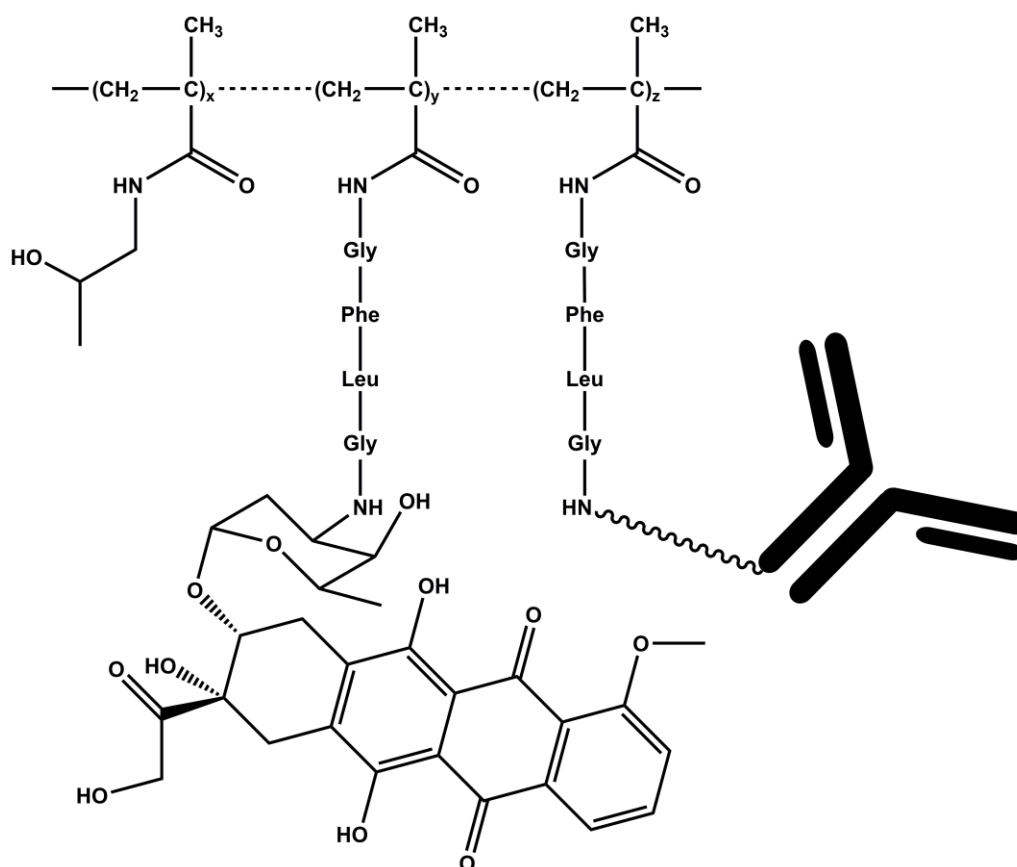
Plusieurs structures ont été depuis élaborées à partir du modèle proposé par Ringsdorf. Przylbisky *et al.*<sup>301</sup> ont greffé un certain pourcentage de méthotrexate (agent antitumoral présentant une activité immunodépressive) sur un copolymère de divinyléther et d'anhydride maléique de manière à conjuguer les propriétés intrinsèques du copolymères à celles du méthotrexate (cf. figure 3.1).



**Figure 3.1** : structure d'un copolymère DIVEMA greffé à 20 % ( $y/x = 4$ ) de méthotrexate

Les essais biologiques ont permis de mettre en évidence le fait que le polymère greffé avait une meilleure activité antitumorale que le méthotrexate libre ou que le copolymère non greffé. Cependant, les propriétés immuno-stimulantes du copolymère greffé étaient légèrement moins marquées que celles du copolymère non greffé.

Les poly-*N*-(2-hydroxypropyl) méthacrylamides (HPMA), du fait de leur très bonne biocompatibilité, ont été très utilisés dans la synthèse de vecteurs macromoléculaires<sup>302-306</sup>. La structure d'un de ces vecteurs est schématisée dans la figure 3.2.



**Figure 3.2** : schéma d'un polyHMPA vecteur de l'adryamicine (doxorubicine). La séquence Gly-Phe-Leu-Gly est facilement reconnue par les enzymes lysosomales et l'anticorps anti-OV TL16 assure la vectorisation jusqu'à l'hôte cible.

Ce type de structure présente la particularité de comporter des groupements latéraux ayant des affinités différentes pour les milieux aqueux. Si certains de ces groupements sont suffisamment lipophiles, il peut alors s'établir des interactions hydrophobes intra- ou intermoléculaires entre les différentes macromolécules s'accumulant à la surface de la cellule ou dans les compartiments subcellulaires (lysosome..).

Kopecek *et al.*<sup>303</sup> ont étudié cette éventualité et ont montré que lorsque ces associations existaient, elles étaient relativement faibles, les masses molaires des vecteurs dépassant rarement  $100000 \text{ g.mol}^{-1}$ . D'autre part, l'importance des associations hydrophobes est dépendante de l'hydrophobie des groupements latéraux (bras espaceurs constitués d'acides aminés hydrophobes, principe actif de type anthraquinonique glycoconjugué) qui sont rarement des groupements exclusivement lipophiles.

Les interactions hydrophobes mises en jeu ne sont pas comparables à celles existant avec une structure amphiphile associative hydrosoluble classique. Il a été cependant établi par les mêmes

auteurs, que de telles interactions aussi faibles soient-elles, compromettaient d'une part le ciblage spécifique et ralentissaient aussi le processus d'hydrolyse des bras écarteurs et donc le relargage du principe actif.

Bien d'autres travaux ont été réalisés sur la vectorisation de principes actifs liés à des macromolécules hydrosolubles. Arranz *et al.*<sup>307</sup> ont fait réagir une certaine proportion de chlorure de chloroacétyle sur les fonctions hydroxyle d'un polyalcool vinylique et ont greffé sur les groupements  $\alpha$ -chloro ester obtenus, des molécules d'acides bioactifs (acide 1-naphtylacétique et acide 6-méthoxy- $\alpha$ -méthyl-2-naphthalène acétique).

Yolles *et al.*<sup>308</sup> ont utilisé l'hydroxypropyl cellulose comme vecteur de stéroïdes sur lequel les motifs stérols sont greffés par l'intermédiaire de liaisons carbonate.

Les différentes structures des polymères proposées et les différentes techniques de ciblage utilisées au cours de ces deux dernières décennies, ont conduit à la synthèse de nombreux vecteurs macromoléculaires qui ont souvent révélé une meilleure activité biologique que la drogue libre et une toxicité plus faible. Les nombreux travaux réalisés dans ce domaine ont rarement abouti à des échecs et ont contribué à valider, à plusieurs reprises, le modèle de Ringsdorf.

Toutefois, l'un des inconvénients de la méthode est de lier le principe actif *de manière covalente au vecteur*. Il est nécessaire dans ce cas, d'utiliser des méthodes de greffage douces et non dénaturantes pour le principe actif. De plus, la liaison mise en jeu doit être suffisamment stable dans le milieu extracellulaire et suffisamment labile dans le milieu intracellulaire. La structure du bras écarteur doit donc être parfaitement adaptée aux critères recherchés. Dans le meilleur des cas, le relargage du médicament doit avoir lieu exclusivement dans le milieu intra cellulaire avec une vitesse contrôlée et continue.

En fait, la cinétique de relargage du médicament ne dépend pas seulement de la structure du bras écarteur mais aussi de celle du vecteur. Pitt *et al.*<sup>309</sup> ont étudié l'influence de la composition chimique du vecteur, du pH et de la température sur cette cinétique avec trois modèles de vecteurs différents, dont les chaînes macromoléculaires sont des copolymères de dérivés de type acrylamide et acrylate. Le principe actif hydrophobe est lié au polymère par des liaisons ester.

Les auteurs ont ainsi montré que bien évidemment la vitesse de relargage dépend de la solvation du polymère. Plus l'hydratation est importante, plus la chaîne macromoléculaire a

tendance à adopter une conformation étendue et plus le site de fixation du principe actif devient accessible par les enzymes.

De ce point de vue, la LCST du polymère est un facteur limitant car si celle-ci est inférieure à la température *in-vivo*, le relargage sera particulièrement lent, la pelote macromoléculaire se trouvant alors sous sa forme contractée. Cependant, si l'hydrolyse de la liaison médicament-vecteur provoque l'apparition de sites hydrophiles supplémentaires le long de la chaîne macromoléculaire, alors la LCST du polymère augmente et la conformation de la chaîne a tendance à se linéariser. La vitesse de relargage va alors augmenter graduellement au cours du temps.

Il apparaît ainsi évident que la cinétique de relargage sera fonction de la HLB de la macromolécule dont l'affinité pour le milieu aqueux va augmenter au fur et à mesure de l'hydrolyse des liaisons vecteur-drogues hydrophobes.

En définitive, le relargage du principe actif doit être assuré quel que soit la structure et la propriété du polymère, cependant il serait difficile d'en contrôler la cinétique, l'ordre des réactions variant en fonction des réponses du polymère aux stimuli extérieurs.

Ce problème de cinétique d'hydrolyse n'est théoriquement plus rencontré lorsque le principe actif est lié au vecteur par *des interactions physiques*.

## 2) Vecteurs vésiculaires

Le vecteur est dans ce cas constitué d'un agrégat de tensioactifs. Les arrangements formés de type micellaire ou vésiculaire permettent le maintien du principe actif au sein de compartiments moléculaires dont les constituants présentent tous la même affinité pour l'eau. La drogue est dite encapsulée. Lorsque celle-ci est hydrophile, elle est localisée dans la cavité aqueuse du liposome et lorsqu'elle est plutôt hydrophobe, elle est localisée dans la bicouche liposomale ou dans le cœur hydrophobe d'une micelle<sup>310</sup> (cf. introduction générale).

Cependant l'accumulation de différents groupements à la surface du liposome favorise souvent les phénomènes d'opsonisation et de capture par le système réticulo-endothélial.

Plusieurs solutions ont été proposées pour stabiliser une structure vésiculaire *in-vivo*. Ces différentes solutions ont été passées en revue par Ringsdorf *et al.*<sup>311</sup>. Les plus intéressantes sont la

polymérisation de phospholipide et le recouvrement de la surface du liposome par des polymères amphiphiles ou hydrophiles.

Les vésicules polymérisées sont en effet très stables et relarguent le principe actif lentement mais les techniques de polymérisation (irradiation U.V,  $\gamma$ ) peuvent se révéler parfois particulièrement dénaturantes pour le médicament encapsulé.

La présence d'un polymère hydrophile, tel qu'un polyéthylène glycol adsorbé ou greffé à la surface du liposome, permet d'inhiber tout phénomène d'opsonisation<sup>253,254</sup>. Le mouvement des chaînes de polyoxyéthylène et le réseau dense qu'elles constituent, induit une gêne stérique empêchant l'approche des apoprotéines de la surface du liposome. La durée de vie dans le sang de telles vésicules est environ 100 à 1000 fois supérieure à celle de liposomes de structure et composition identiques, mais dépourvus de polymères ancrés à leur surface.

L'adsorption de *polymères amphiphiles* sur la bicouche lipidique est une méthode qui permet aussi d'éviter l'opsonisation des vésicules et stabilise la membrane par incorporation de ses groupements latéraux hydrophobes au sein de cette même membrane. Comme nous l'avons reporté dans l'introduction générale, cette technique permet d'introduire des facteurs assurant la déstabilisation thermo-<sup>102,103,312</sup> ou pH-contrôlée de la vésicule<sup>111,313</sup>.

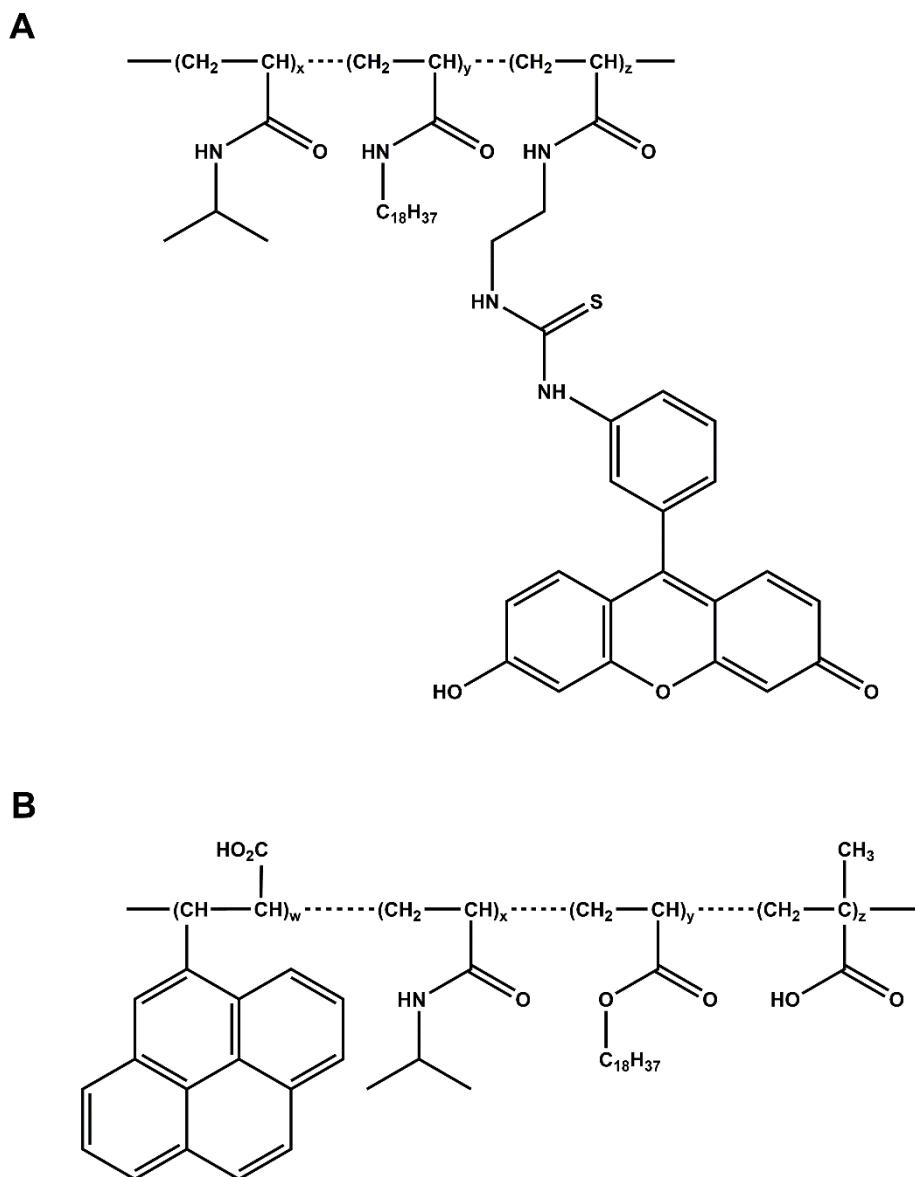
Les polymères amphiphiles utilisés sont des copolymères du NIPAM (cf. figure 3.3). Lorsque le copolymère est non ionique, sa LCST est en général inférieure à la température physiologique. A cette température, les chaînes macromoléculaires ancrées à la surface de la vésicule se contractent et induisent de fortes courbures locales sur le liposome qui a tendance à bourgeonner et à donner des fissions pour former des vésicules de taille réduite (cf. figure 3.4). Le polymère reste ancré dans la membrane durant ces transformations. La déstabilisation de la vésicule est dite transitoire et est parfaitement réversible.

Lorsque le copolymère est un copolymère ionique, la LCST dépendra du pH. Pour un pH physiologique, le polymère sous forme ionique présentera une LCST supérieure à la température physiologique, par contre à un pH plus bas la LCST du copolymère devient inférieure à 37 °C et il s'en suit une déstabilisation transitoire de la vésicule.

L'existence de tels phénomènes offre de nouvelles perspectives dans l'élaboration de nouveaux systèmes vectoriels thermo- et pH-sensibles. En effet, les transitions de taille des vésicules sont accompagnées par l'apparition de pores dans la membrane. Il est donc possible, *in-vitro*,

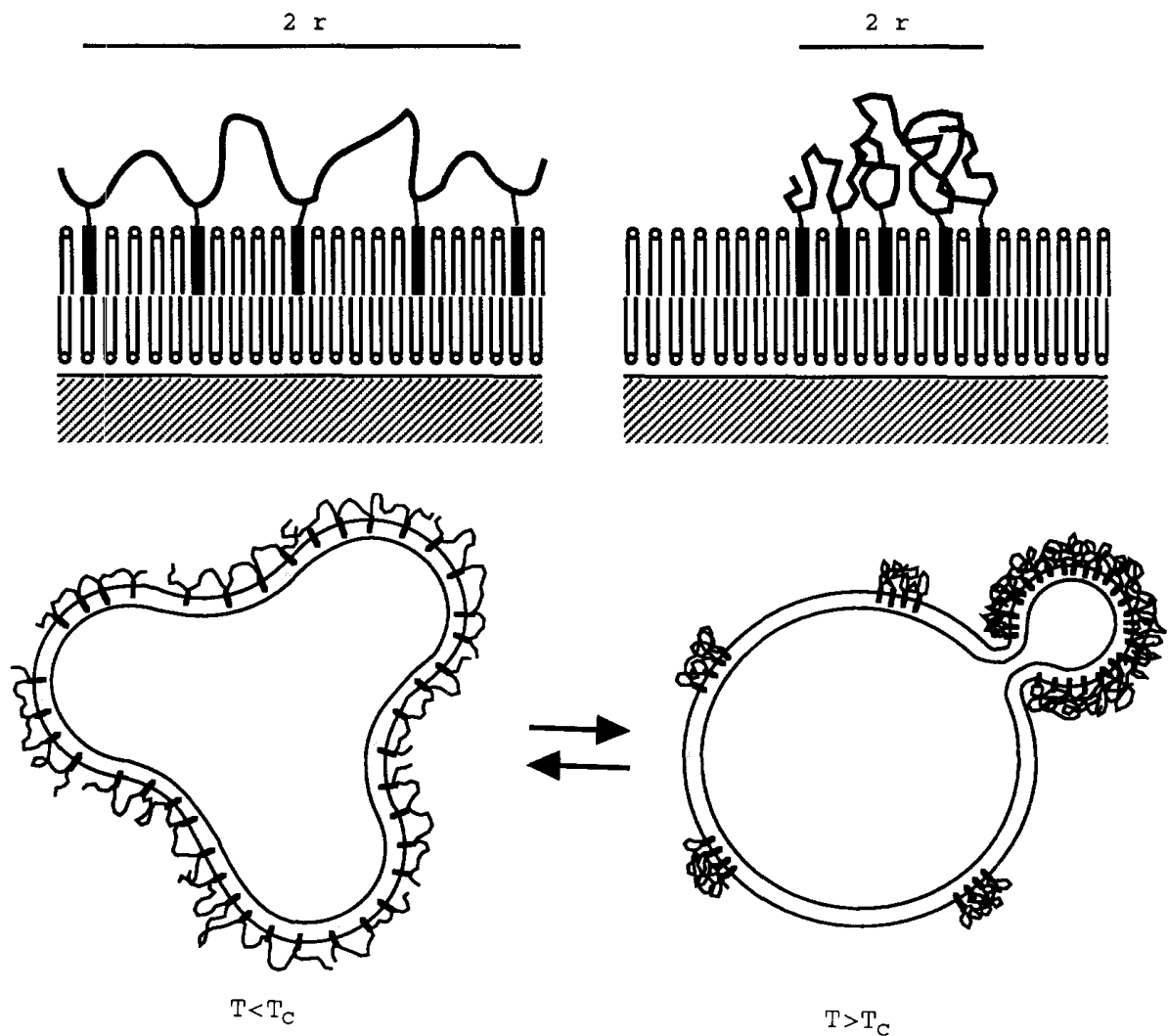


d'encapsuler un principe actif a des conditions de température et de pH données, puis de le relarguer dans des conditions de température et de pH déstabilisantes.



**Figure 3.3 :** **A**/Structure du copolymère utilisé par Simon *et al.*<sup>312</sup> sur des liposomes géants.  $x/y = 200$ ,  $z/y = 3$ . Le copolymère est marqué à la fluorescéine. **B**/Structure du copolymère amphiphile utilisé par Zignani *et al.*<sup>313</sup>. La sonde fluorescente greffée sur le polymère est le pyrène.

Ceci a été montré par Zignani *et al.*<sup>313</sup> qui ont étudié le relargage d'une sonde fluorescente (pyranine) avec des liposomes greffés (PEG) et non greffés en présence d'un copolymère amphiphile. La cinétique de relargage est lente et continue. Ce modèle semble parfaitement adapté à la vectorisation d'un médicament *in-vivo*, car son transport serait assuré par des vésicules à temps de demi-vie élevé et son relargage ne s'effectuerait, alors seulement qu'à un pH acide tel que le pH lysosomal.

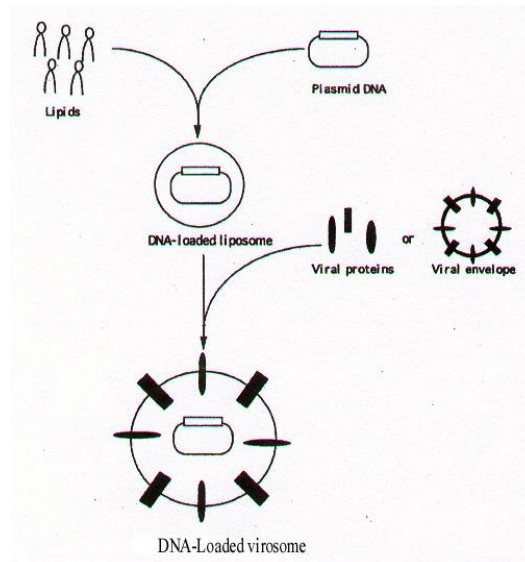


**Figure 3.4 :** Illustration schématique de l'étape transitoire grande vésicule-petite vésicule induite par les variations de conformation et la séparation de phase d'un polymère suivant la température ( $T < LCST$  ou  $T > LCST$ ).  $r$  est le rayon hydrodynamique du polymère ancré dans la bicouche lipidique. D'après Simon *et al.*<sup>312</sup>.

### 3) Les vecteurs de type virosomes

Enfin, l'une des techniques les plus récentes de vectorisation employant des systèmes vésiculaires est l'utilisation de virosomes<sup>314-316</sup>. Elle consiste soit à encapsuler le liposome dans une enveloppe virale, soit à incorporer dans la bicouche phospholipidique des protéines virales (cf. figure 3.5). Cette technique est très utilisée pour le transport de gènes (transfection), la présence de protéines virales au sein du système vectoriel permettant de disposer d'un ciblage efficace (les propriétés de fusion cellulaire sont identiques à celles du virus) des membranes cellulaires et nucléaires. En effet, les essais réalisés *in-vitro* ont permis de montrer que généralement le relargage du contenu d'un virosome au niveau du noyau cellulaire était effectué en quelques secondes.

Les virosomes apparaissent comme des systèmes vectoriels très prometteurs, mais il reste à maîtriser les réactions hyperallergéniques qu'ils provoquent une fois injectés *in-vivo*. Des essais cliniques se sont révélés récemment fatals pour les patients.



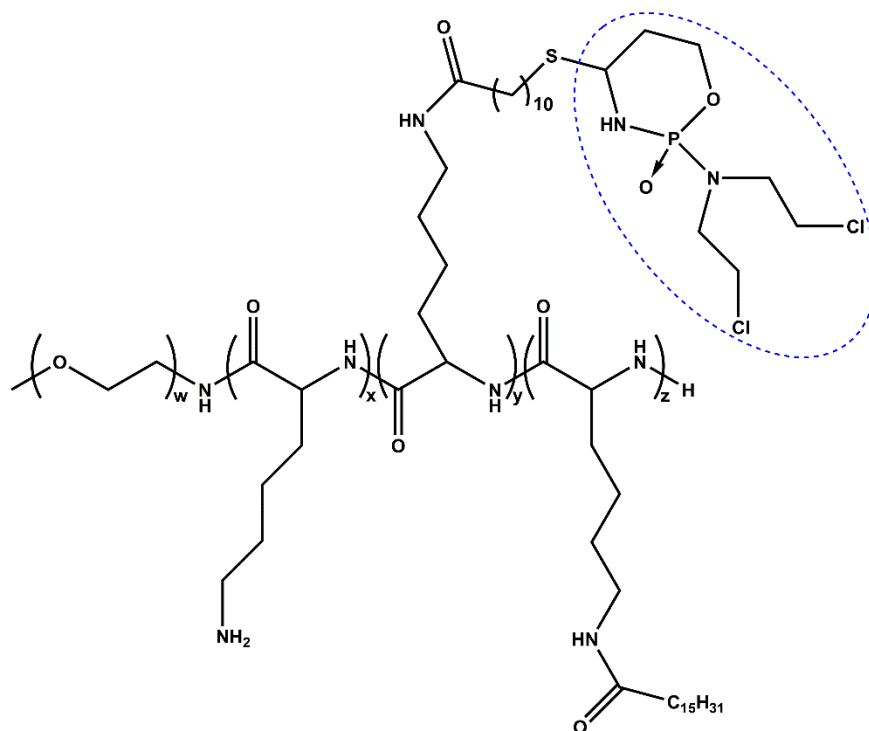
**Figure 3.5 :** développement d'un virosome d'après Kaneda<sup>314</sup>. Un plasmide d'ADN est encapsulé dans un liposome et celui-ci est ensuite doté de protéines virales ou d'une enveloppe virale.

La stabilisation des systèmes vésiculaires vectoriels et l'amélioration de leurs propriétés de ciblage ont donc motivé de nombreuses recherches dans ce domaine. De la même manière, beaucoup de chercheurs se sont préoccupés d'élaborer des systèmes micellaires stables en vue d'une utilisation potentielle en tant que vecteur de principes actifs.

#### 4) Les vecteurs micellaires

Ringsdorf *et al.*<sup>317</sup> ont proposé l'utilisation de tensioactifs polymérisables. Les micelles polymérisées sont en effet très stables et permettent la solubilisation d'une quantité importante de composés hydrophobes. Cette idée a été reprise par de nombreux autres auteurs<sup>45,318</sup> et a catalysé l'apparition d'un autre concept qui est celui des micelles polymères.

Ces micelles sont généralement des agrégats de copolymères amphiphiles diblocs. Le premier modèle de micelle polymère a été élaboré par Ringsdorf et ses collaborateurs<sup>319</sup> (cf. figure 3.6). La partie polaire est constituée par un polymère hydrosoluble, un polyoxyéthylène. La partie hydrophobe est constituée d'une poly(lysine) sur laquelle ont été greffées en partie des chaînes grasses et le principe actif hydrophobe (cyclophosphamide).



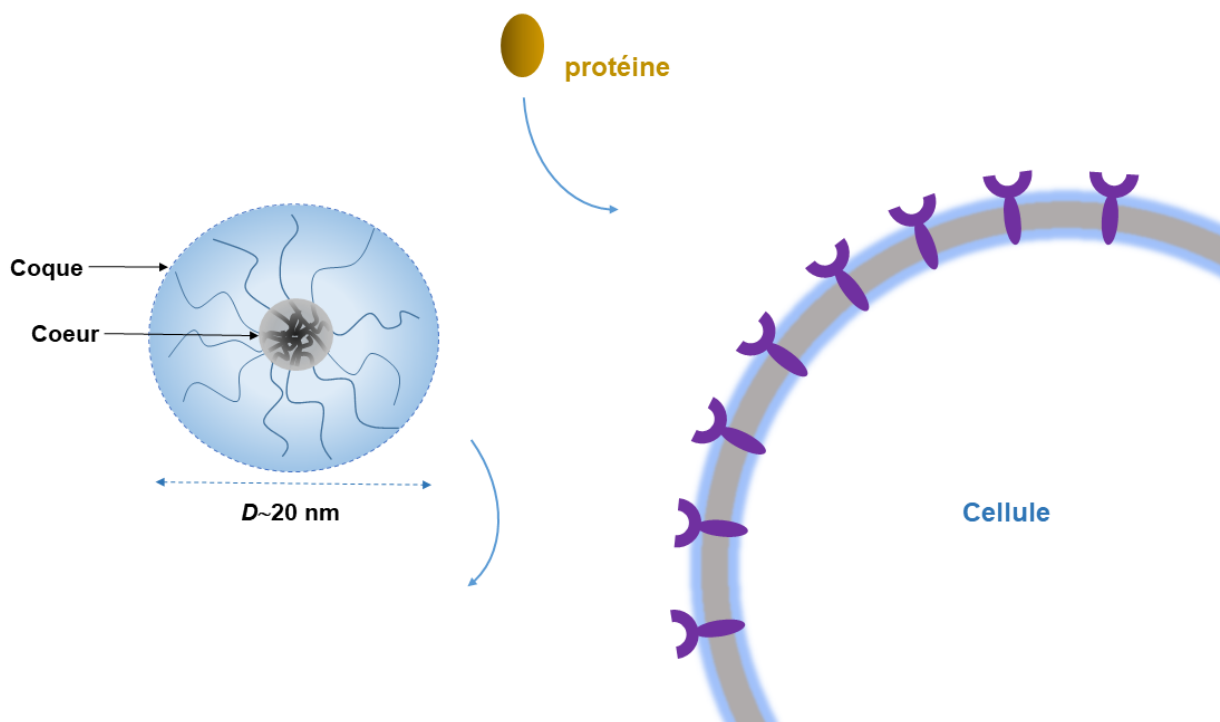
**Figure 3.6** : Premier modèle de copolymère amphiphile destiné à former des micelles polymères d'après Dorn *et al.*<sup>319</sup>. Les tirets bleus délimitent le motif cyclophosphamide.

Ces tensioactifs polymères possèdent une partie polaire très hydrophile et une partie apolaire très hydrophobe. Les micelles formées sont très stables et présentent des CMC près de 1000 à 10000 fois inférieures aux CMC de micelles constituées des tensioactifs usuels (de faible masse moléculaire). Le cœur hydrophobe de la micelle est dit « quasi-solide », ses éléments constitutifs possédant une température de transition vitreuse élevée.

Une fois formée, ces micelles restent stables même en milieu dilué. De plus, le réseau dense constitué à la surface des micelles par les chaînes polyoxyéthyléniques, exclut systématiquement (comme dans le cas des liposomes greffés) toute possibilité d'opsonisation ou de capture par les macrophages (cf. Figure 3.7).

Ces nanoparticules (leur taille ne dépasse pas 50 nm), dont les propriétés sont analogues à celles des liposomes à temps de demi-vie élevé, se révèlent parfaitement adaptées à la vectorisation de principes actifs antitumoraux par ciblage passif.

Si dans le modèle de ringsdorf le médicament est lié au vecteur, plusieurs auteurs<sup>320,321</sup> ont montré que les micelles polymères étaient suffisamment stables pour assurer la vectorisation d'une drogue telle que l'adryamicine (doxorubicine) par simple encapsulation.

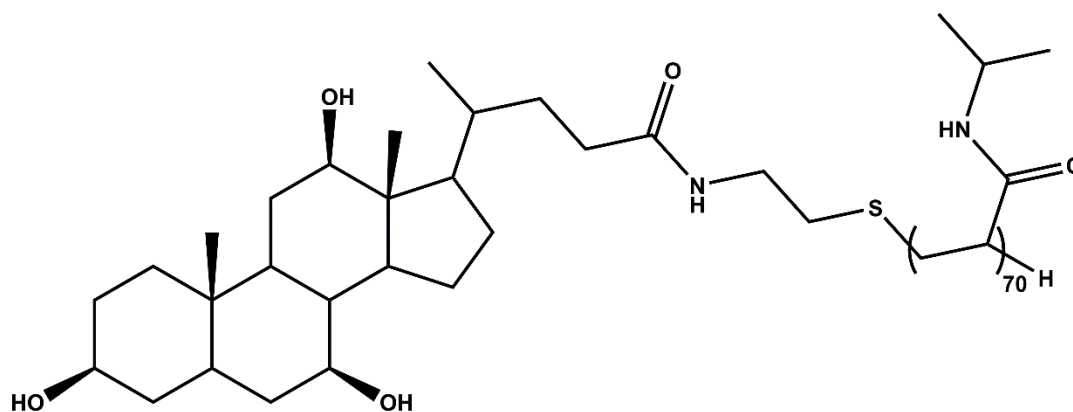


**Figure 3.7 :** structure d'une micelle polymérique (d'après Kwon et Kataoka<sup>320</sup>) et prévention des mécanismes d'opsonisation ou d'adhésion cellulaire par la « brosse » polyoxyéthylénique recouvrant le coeur hydrophobe (d'après Kwon et Okano<sup>321</sup>).

D'autres structures formant des micelles polymères ont été depuis proposées. La partie hydrophile est toujours constituée par un polyoxyéthylène et c'est la structure de la partie hydrophobe qui est variable. Dans certains cas celle-ci correspond à un poly(benzyl-*L*-aspartate)<sup>322</sup>, un polyglycolide<sup>323</sup>, un *ter*polymère d'acide acrylique, de méthacrylate de méthyle, de méthacrylate d'octadécyle<sup>290</sup>, un ionomère constitué de poly(éthylène ammonium) complexé à des sels d'acide gras<sup>324</sup>.

Récemment Kim *et al.*<sup>325</sup> ont élaboré un nouveau agent amphiphile télomère constitué d'un poly(NIPAM) couplé à l'acide cholique (cf. figure 3.8). Les propriétés de ces micelles sont différentes de celles des micelles polymères classiques, leur partie apolaire n'étant pas macromoléculaire. De ce fait la CMC est plus élevée. Cependant de telles structures permettent le relargage thermocontrôlé *in-vitro* d'une drogue telle que l'indométhacine.

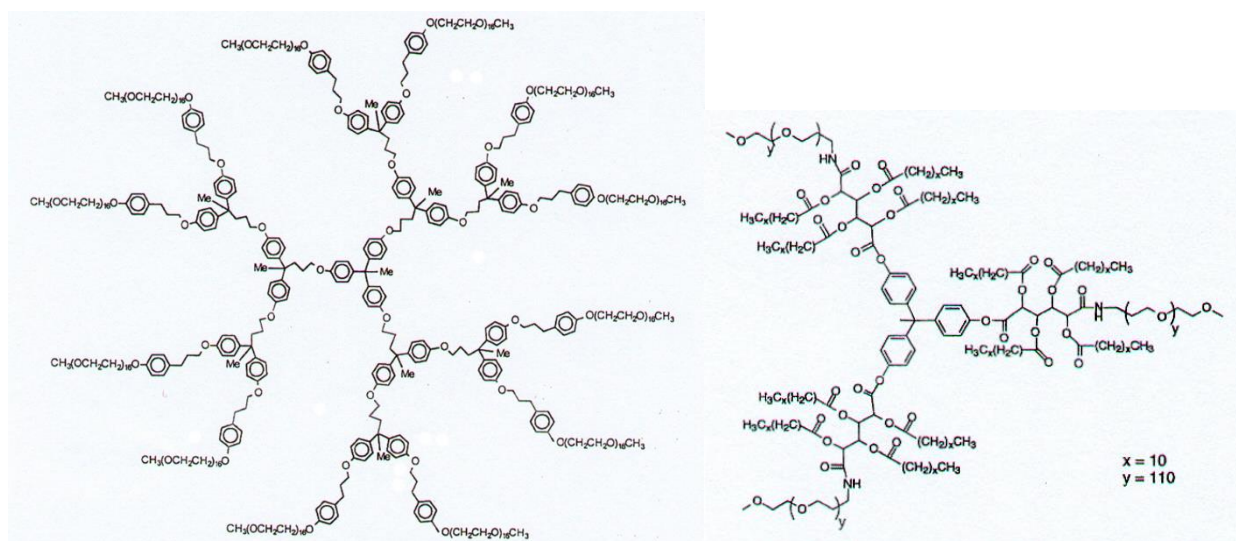
A température physiologique et donc au dessus de la LCST du polymère, les chaînes macromoléculaires sont contractées et la taille de la micelle ne dépasse pas 50 nm. La structure est rigide et le relargage est lent. A une température inférieure à la LCST du polymère, la linéarisation des chaînes hydrophiles provoque une forte augmentation de taille de la structure (337 nm) et la fluidité de celle-ci permet un relargage rapide.



**Figure 3.8** : structure d'un télomère amphiphile destiné à former des micelles polymériques thermosensibles d'après Kim *et al.*<sup>325</sup>.

Un des modèles micellaires des plus modernes est la micelle unimoléculaire (cf. figure 3.9). Les micelles unimoléculaires sont des micelles dendritiques dont le cœur est constitué de plusieurs motifs aromatiques hydrophobes plurivalents de type 4,4-bis(4'-hydroxyphényl)pentanol<sup>326</sup> ou 1,1,1-tris(4'-hydroxyphényl)éthane couplé à des esters gras de l'acide mucique<sup>327,328</sup> et la partie hydrophile de polyoxyéthylène.

Ces structures ont été baptisées « microcontainer » car elles ont la faculté de piéger une quantité importante de composé lipophile au sein de leur coeur hydrophobe. Ces micelles ne présentent pas de CMC et sont donc très stables. De plus, leur taille réduite et leurs propriétés conférées par la présence de plusieurs chaînes polyoxyéthyléniques (inhibition de l'opsonisation) en font des systèmes macromoléculaires parfaitement adaptés à la vectorisation de principe actifs antitumoraux par ciblage passif des tumeurs solides.



**Figure 3.9** : exemples de micelles unimoléculaires d'après Liu *et al.*<sup>326-328</sup>.

*Les stratégies développées ces vingt dernières années visant à améliorer l'acheminement de principes actifs encapsulés dans des systèmes micellaires ou vésiculaires sont nombreuses et variées, cependant d'autres techniques basées sur le même principe (encapsulation-relargage) ont été développées et ouvrent des perspectives encore plus intéressantes. Ces techniques font appels à l'utilisation d'**hydrogels**.*

## **5) Les vecteurs de type hydrogels**

Un hydrogel est un réseau macromoléculaire hydrophile. L'existence d'interactions attractives entre plusieurs macromolécules hydrophiles aboutit à la formation d'un réseau macromoléculaire tridimensionnel. Les interactions peuvent être physiques (interactions hydrophobes, force de Van der Waals, liaisons hydrogène) ou chimiques (interactions ioniques entre un polyanion et un cation bivalent, liaisons covalentes)<sup>47</sup>.

Ces hydrogels ont la capacité d'absorber près de mille fois leur masse en eau. Les mailles des réseaux ainsi formées constituent donc un ensemble de compartiments aqueux. Les dimensions de ces mailles varient en fonction du taux d'hydratation de l'hydrogel. Il a donc été très vite envisagé d'utiliser ces hydrogels comme système vectoriel.

Le principe est le suivant :

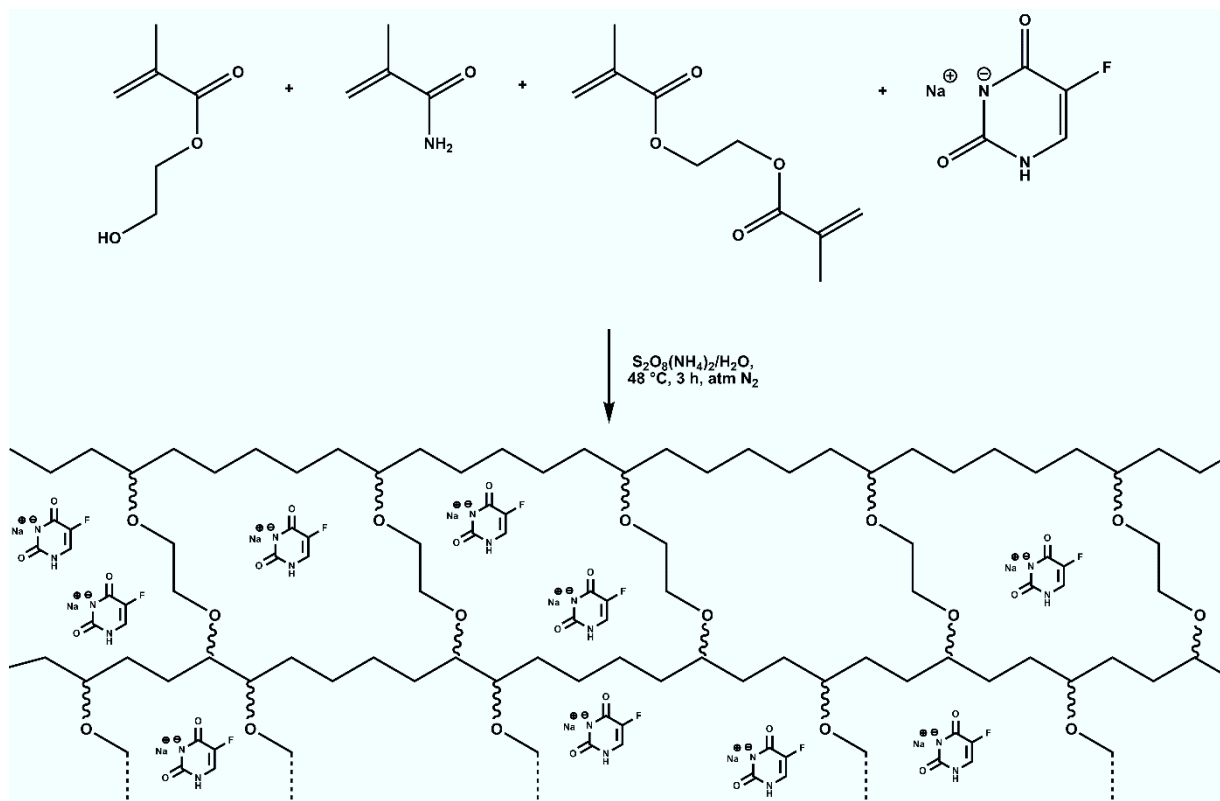
- Doper ces hydrogels en principe actif en se plaçant dans les conditions permettant sa capture et son maintien au niveau des compartiments aqueux ;
- administrer l'hydrogel *in-vivo* où les conditions sont telles que le principe actif va diffuser lentement à travers le réseau macromoléculaire déstabilisé ou fluidifié vers l'organe cible.

Deux faits importants doivent être soulignés :

- L'utilisation d'hydrogel est une technique particulièrement innovatrice en ce sens qu'elle permet l'administration du vecteur par implant sous-cutanée<sup>329</sup> ou par voie orale. Le relargage du médicament est lent et continu, et dépend de la structure et des propriétés physiques du gel ;
- cependant elle présente l'inconvénient de n'être directement applicable uniquement dans le cas où le principe actif à vectoriser est hydrosoluble.

Par exemple, le 5-Fluorouracile a été ainsi maintenu sous forme de sel (imidure de sodium) dans un hydrogel obtenu par copolymérisation de l'acrylamide avec le méthacrylate de 2-hydroxyéthyle et le méthacrylate d'éthylène glycol assurant l'interconnexion entre les mailles du

réseau<sup>330</sup> (cf. figure 3.10). Le principe actif est dans ce cas inclus dans le gel lors de la polymérisation.



**Figure 3.10** : schéma de synthèse d'un hydrogel dopé en 5-Fu<sup>330</sup>.

Le relargage a été effectué *in-vitro* après forte dilution du système sous l'effet d'un cisaillement (fluidification du gel). Les auteurs ont montré que la cinétique de relargage dépendait du taux de connexion du réseau. Plus ce taux est important et plus la cinétique de relargage est faible, la réticulation du système étant plus importante.

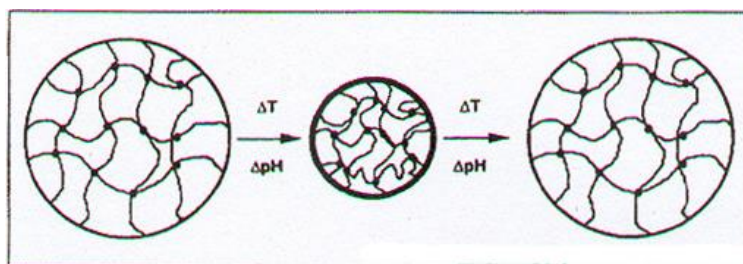
Diverses autres méthodes ont été proposées pour s'assurer du contrôle du relargage d'un principe actif inclus dans un hydrogel<sup>331</sup>.

Le relargage peut être thermo- et pH-contrôlé. Lee et Hung<sup>332</sup> ont synthétisé des hydrogels thermotropes obtenus par polymérisation de monomères de type *N*-alkoxyalkylacrylamide (*N*-éthoxypropylacrylamide et *N*-tétrahydrofurfurylacrylamide). Les connexions dans ces systèmes sont assurées par des liaisons hydrogène entre groupements amides. Les auteurs ont observé que la structure avait tendance à se contracter et à se déshydrater à température physiologique, celle-ci étant supérieure à la LCST des polymères. Le relargage d'un principe actif modèle tel que la caféine est donc plus lent à 37°C qu'à 20°C. Ceci est d'autant plus vrai lorsque la même expérience



est réalisée avec un copolymère de *N*-alkoxyalkylacrylamide et d'acrylate de butyle. La présence de groupements hydrophobes tend aussi à ralentir sa diffusion au sein de la matrice.

D'autres auteurs<sup>333</sup> ont obtenu un hydrogel pH et thermosensible en copolymérisant du NIPAM avec le méthacrylate de 2-hydroxyéthyle, l'acide acrylique et le diméthacrylate d'éthylène glycol. A pH élevé, la LCST du *ter*polymère est supérieure à la température physiologique et le gel est parfaitement hydraté. A pH acide, la LCST du polymère est inférieure à la température physiologique et le réseau se contracte (cf. figure 3.11).



**Figure 3.11** : schéma de l'évolution d'un hydrogel thermo- et pH-sensible en fonction de la variation de chacun des deux paramètres, d'après Peppas<sup>331</sup>.

Les auteurs ont montré que la perte en masse d'eau est plus importante lorsque la distribution des monomères constituant le *ter*polymère est de type bloc (perte de 19 % de la masse d'eau initiale) plutôt que de type aléatoire (perte de 5 % de la masse d'eau initiale). Une structure bloc est donc mieux adaptée au relargage thermo-contrôlé de principes actifs.

Kopecek et ses collaborateurs<sup>334,335</sup> ont élaboré un hydrogel thermosensible particulier, destiné à être administré par voie orale et à relarguer spécifiquement son contenu au niveau du colon. Ce gel est un *ter*polymère d'acide acrylique, de *N,N*-diméthylacrylamide et de *N-ter*Butylacrylamide.

Les connexions sont assurées par formation de liaisons amide en faisant réagir le *N,N'*-( $\omega$ -caproyle)-4'-4'-diaminoazobenzène sur les fonctions acides activées (esters actifs) ou en copolymérisant le dérivé bis(acrylamide) correspondant avec les différents monomères. Ce composé diazo aromatique est métabolisable par des enzymes (azoréductases) produites par certains microbes de la flore intestinale.

Une fois dans l'estomac, l'hydrogel est supposé se trouver sous sa forme contractée, le pH étant acide (pH =3) et la température physiologique étant supérieure à la LCST. Le contenu de l'hydrogel est protégé de l'acidité gastrique. Mais une fois le vecteur passé dans le petit intestin où le pH est proche de la neutralité, plusieurs groupements carboxyliques sont alors ionisés. La

LCST du polymère devient supérieure à la température physiologique et la structure beaucoup plus fluide de l'hydrogel hydraté permet la métabolisation des groupements azo par les azoréductases. L'hydrogel est ainsi petit à petit dégradé et son contenu relargué au sein du colon.

Des essais réalisés *in-vitro* et *in-vivo* ont révélé que la cinétique et le mécanisme de métabolisation dépendait de la méthode de synthèse de l'hydrogel utilisé. Lorsque la connexion est réalisée après polymérisation, le système obtenu est très réticulé. Lorsque la connexion est effectuée durant la copolymérisation, le nombre de connexions est moins important. Dans le premier cas, la dégradation de l'hydrogel s'effectue au cœur du système et elle est plus lente que dans le second où l'hydrogel est dégradé par érosion de surface.

Les hydrogels sont des systèmes biocompatibles dont les propriétés physico- et chimico-modulables en font des assemblages moléculaires tout à fait adaptés à la vectorisation de principes actifs. Le seul inconvénient de la méthode réside dans le fait qu'il est difficile de concevoir le maintien d'un principe actif hydrophobe dans une cavité aqueuse du réseau, mais les nombreux travaux effectués actuellement sur le sujet contribueront très certainement à résoudre ce problème. Une solution a été proposée et a consisté à encapsuler le principe actif (héparine) dans des micelles polymères (copolymères bloc polyoxyéthylène/polylactide) séquestrées dans un hydrogel composé d'alginate de calcium<sup>336</sup>.

*Ces quelques exemples de systèmes macromoléculaires vectoriels nous ont permis de constater l'importance de la place occupée par les polymères amphiphiles dans le domaine des applications biomédicales. Plusieurs des résultats positifs obtenus par les différentes équipes de recherche, nous ont encouragés à envisager la synthèse de polymères amphiphiles dérivés du THAM que nous destinons à la vectorisation de principes actifs. Rappelons en effet que le THAM et les poly(Tris) sont parfaitement biocompatibles. D'autre part, des essais biologiques ont permis de montrer qu'un cotéromère du THAM et de l'acrylGABA sur lequel est greffé un motif ARA-C présente une meilleure activité que l'ARA-C libre et une très faible toxicité (absence de DL 50)<sup>130-132</sup>. Les structures polyTris semblent donc parfaitement se prêter à la fonction de système vectoriel. Notre choix se révèle de ce fait, pleinement justifié.*

Notre premier objectif est donc de synthétiser un polyTris amphiphile, en vue d'une application potentielle dans le domaine biomédical suivant les différents modèles précédemment exposés. Le but ultime de notre travail est de parvenir à synthétiser *un système micellaire polymère multicompartimental*.

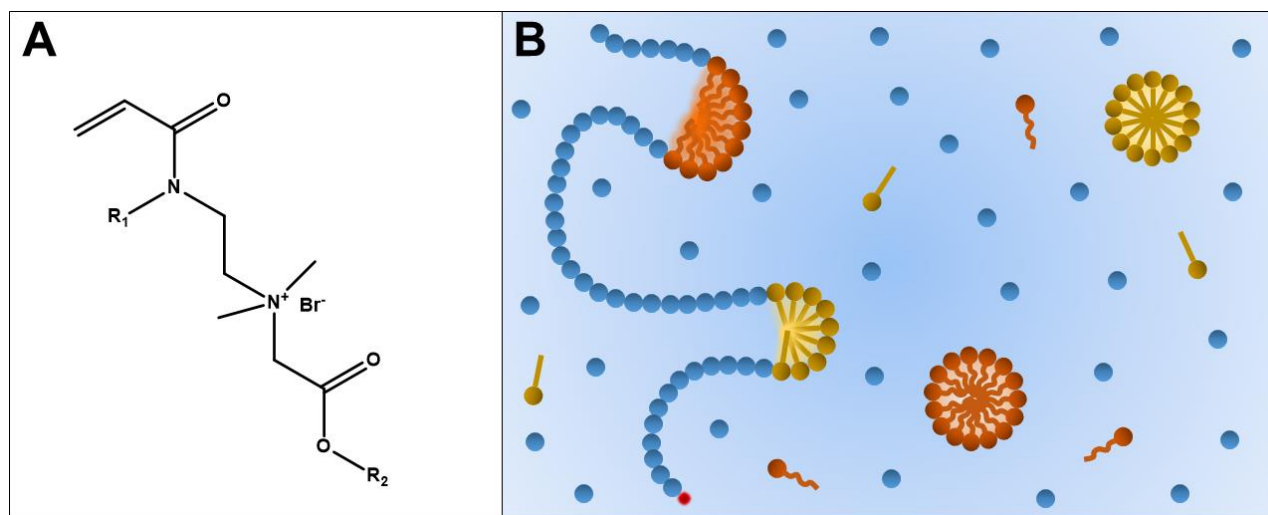
## 6) Les vecteurs micellaires polymères pluricompartimentaux

Ce modèle correspond à la plus récente proposition de Ringsdorf. La structure proposée est un système macromoléculaire dans lequel plusieurs micelles dont les propriétés et les affinités sont différentes coexistent sans aucune interférence. Ce travail a déjà été entrepris et bien avancé par l'équipe de F. Candau<sup>337,338</sup> et par Weberskirch *et al.*<sup>339</sup>.

Les méthodes proposées sont respectivement les suivantes :

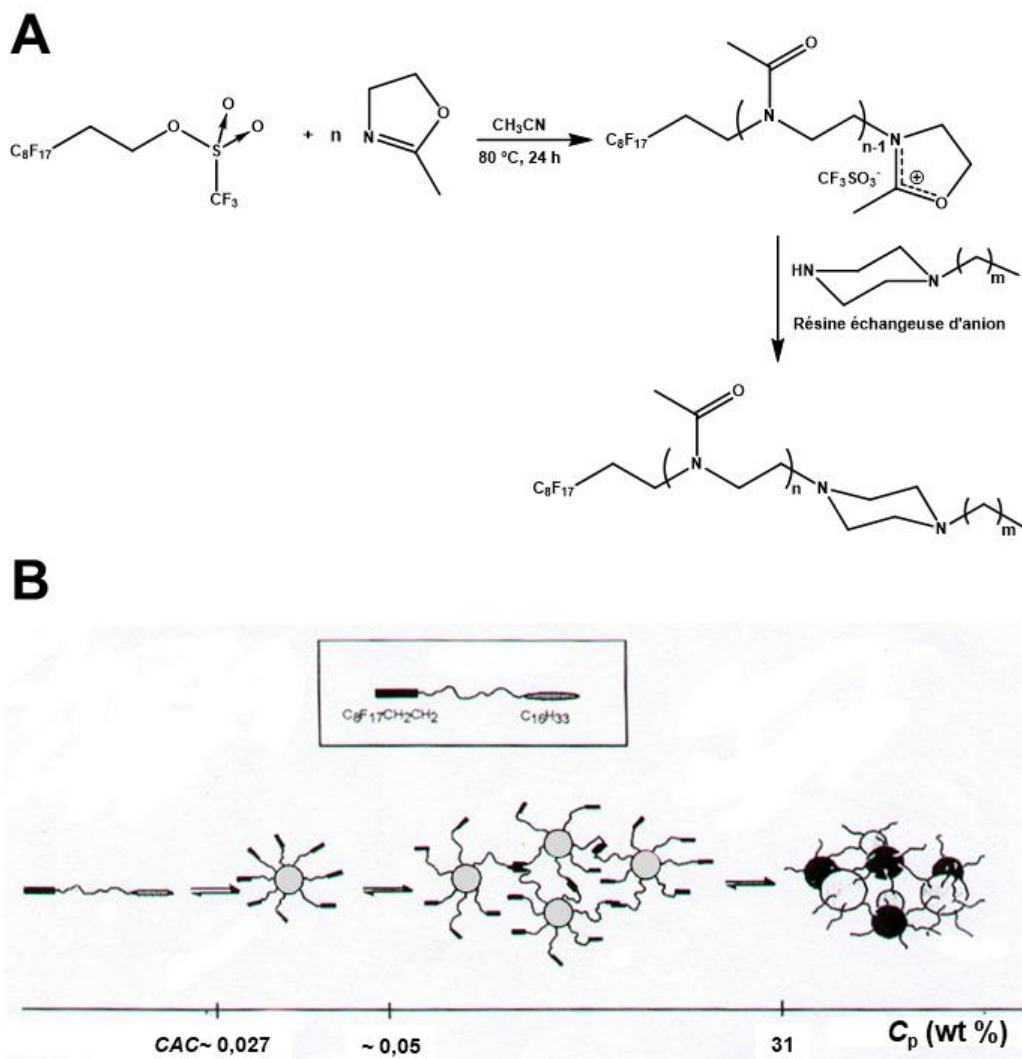
- La première consiste à copolymériser un monomère hydrophile (l'acrylamide) avec deux tensioactifs polymérisables différents de type bromure de *N*-alkoxycarboxyméthyle, *N*-[2'-(*N*-alkylacrylamido)éthyl]-*N,N*-diméthylammonium (l'un fluoré et l'autre perhydrocarboné) non compatible (formant des micelles distinctes) au dessus de leur CMC. Le copolymère multibloc présente une alternance de blocs hydrophobes entièrement fluorés ou entièrement hydrocarbonés (cf. figure 3.12).

- La deuxième consiste à initialiser la polymérisation cationique de la 2-méthyl-2-oxazoline par le triflate d'un alcool gras fluoré (le 1-éthyl perfluorooctyl) ou hydrocarboné (l'heptadécanol), puis à traiter le polymère obtenu par une résine échangeuse d'anion (cf. figure 3.13A). La structure obtenue est une structure tribloc qui forme deux types de micelles (cf. figure 3.13B).



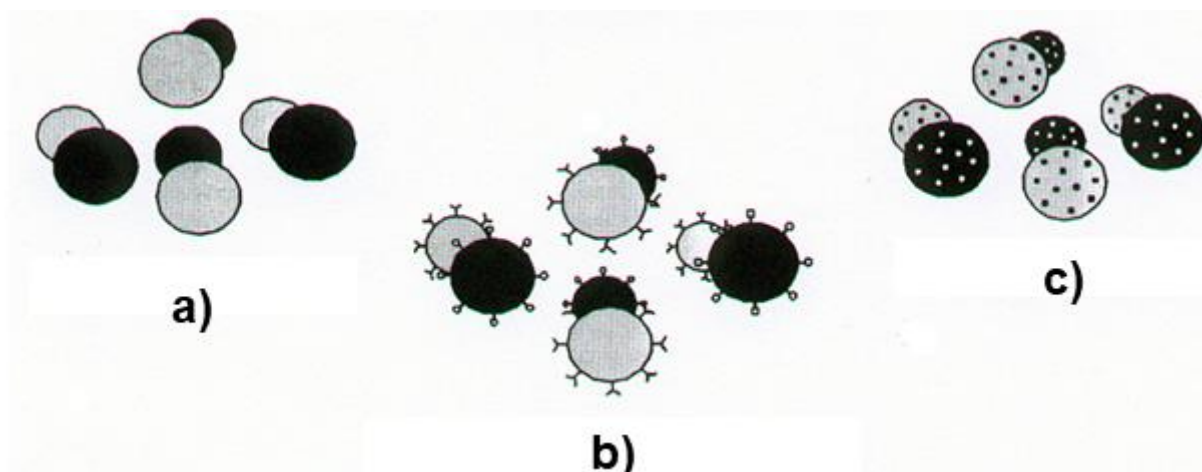
**Figure 3.12 :** A/Structure des différents tensioactifs polymérisables (« surfmères ») utilisés par l'équipe de F. Candau<sup>337</sup>. R<sub>1</sub> = H- ou Et- et R<sub>2</sub> = -C<sub>14</sub>H<sub>29</sub> ou -C<sub>16</sub>H<sub>33</sub> ou -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>. B/Structure de micelles polymériques pluricompartimentales d'après Stälher *et al.*<sup>338</sup> (●) monomère hydrophile, (●~) surfmère hydrocarboné, (●—) surfmère fluorocarboné, (●) amorceur radicalaire.

Ces nouveaux systèmes offrent l'opportunité d'envisager l'incorporation simultanée de deux composés de structures et de fonctions différentes au sein de l'édifice macromoléculaire. Ceci présente une avancée considérable dans le domaine de la vectorisation de principes actifs où les différents compartiments ne seront pas fonctionnalisés de la même façon. *La pluricompartimentation entraîne la plurifonctionnalité* (cf. figure 3.14).



**Figure 3.13** : **A**/Structure des polymères tribloc obtenus par Weberskirch et *al.*<sup>339</sup> ( $n = 6, 8, \dots, 17$ ). **B**/Agrégation des polymères tribloc en fonction de la concentration en polymère  $C_p$  d'après les mêmes auteurs. L'agrégation conduit à la formation de micelles hydro- et fluorocarbonées interconnectées.

Nous ne pouvons procéder directement à l'élaboration de structures micellaires polymères multicompartimentales dérivées du THAM sans procéder à des études préliminaires de macrostructures amphiphiles associatives moins complexes.



**Figure 3.14** : Plurifonctionnalisation d'un système micellaire multicompartimental d'après Weberskirch *et al.*<sup>339</sup>. Le système peut s'adapter à la solubilisation sélective de molécules de différente polarité (a), ou à la fonctionnalisation sélective de la surface de chaque type de micelle (récepteurs de surface impliqués dans les mécanismes de reconnaissance, la liaison de ligands et le transport spécifique) (b) et enfin à la fonctionnalisation sélective du cœur des micelles (c).

Nous avons donc relaté, dans ce troisième chapitre, ce travail préliminaire que nous avons effectué en nous basant sur un modèle simple de polymère associatif. Nous avons envisagé d'élaborer un poly(tris) associatif dont la distribution des groupements hydrophobes latéraux serait statistique. Dans un second temps, nous avons étudié les propriétés rhéologiques de ce dernier en solution, de manière à mieux appréhender le comportement de nos polymères hydrosolubles en milieu aqueux.

## *II) SYNTHÈSE DE POLYMÈRES AMPHIPHILES ASSOCIATIFS DÉRIVÉS DU TRIS*

### **1) Méthode de synthèse envisagée**

Notre but a été de parvenir à synthétiser un polymère du tris modifié hydrophobiquement, présentant des propriétés associatives intéressantes et dont les groupements hydrophobes latéraux sont répartis aléatoirement le long de la chaîne macromoléculaire, chaque monomère hydrophobe ne comportant qu'une chaîne grasse.

Comme nous l'avons déjà vu dans le deuxième chapitre, de telles structures macromoléculaires amphiphiles dérivées du THAM peuvent être obtenues, soit par copolymérisation de monomères hydrophiles et hydrophobes, soit par modification chimique hydrophobe d'un homopolymère préexistant.

Par ailleurs, nous avons pu montrer que dans le cadre d'une application biologique, il était préférable de copolymériser deux monomères de façon à connaître le mieux possible la structure utilisée. Dans le cadre d'une étude physicochimique il est plus intéressant de disposer de différentes structures amphiphiles issues d'un seul et même homopolymère que l'on a diversement modifié. Il est ainsi possible de disposer de différents échantillons présentant une bonne homogénéité de masse molaire.

Nous avons donc envisagé de synthétiser une quantité importante d'homopolymère dérivé du Tris, puis de procéder à sa modification chimique en greffant différentes chaînes grasses à des taux variables sur la macromolécule. Les études rhéologiques des différents polymères amphiphiles obtenus devaient nous permettre de préciser quelle était la structure qui présentait les propriétés physicochimiques les mieux adaptées.

Il faut rappeler ici, que les poly(Tris) sont très facilement obtenus par polymérisation du THAM dans l'eau, solvant dans lequel la très grande réactivité de ce monomère est telle que nous n'avons pu la quantifier correctement (cf. chapitre I). Elle rend très difficile le contrôle de la masse de ces polymères. De plus, les poly(Tris) forment des agrégats dans l'eau, ce qui compromet particulièrement la détermination de la masse molaire de l'homopolymère.

Enfin, nous ne sommes pas certains que la modification chimique d'un poly(Tris) puisse conduire à une structure amphiphile dont les chaînes latérales seraient réparties de manière aléatoire le long de la chaîne macromoléculaire. La modification chimique pourrait très bien se faire sur une, deux ou trois fonctions alcool d'une même unité monomère.

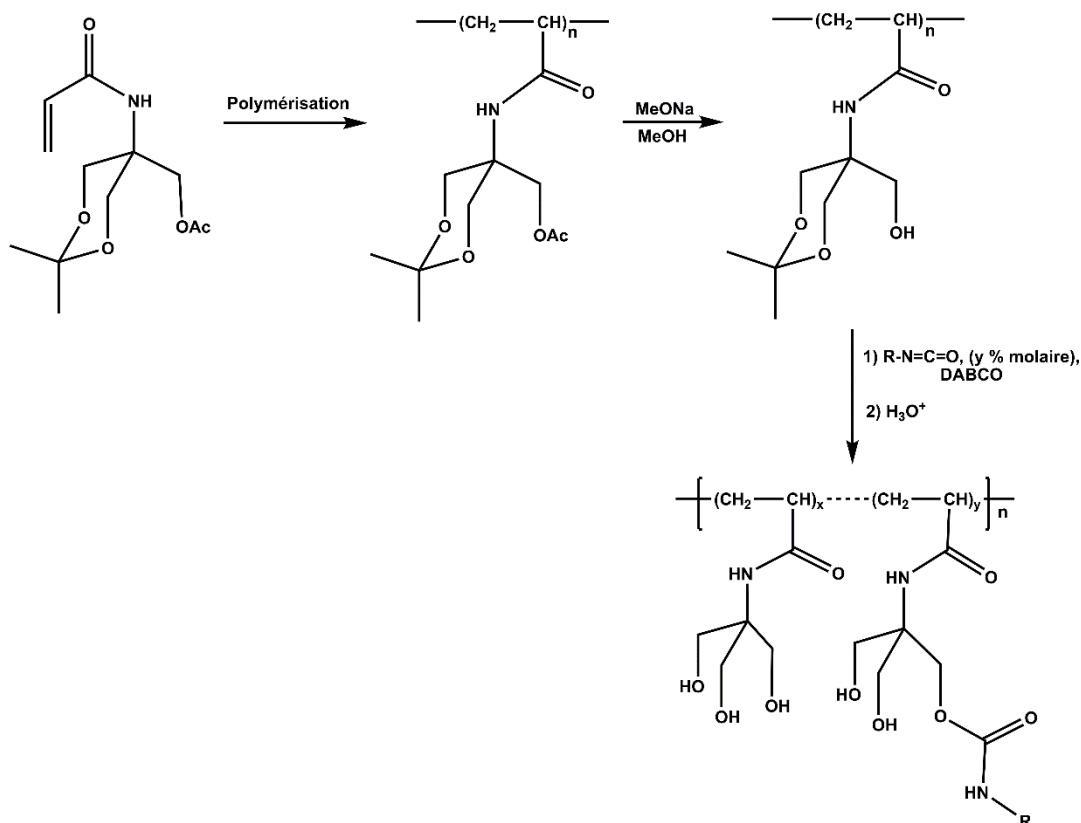
En nous basant sur les résultats obtenus dans les chapitre I et II, nous avons choisi de synthétiser un polymère du THAM isopropylidène acétylé **4**. Ce monomère est parfaitement soluble dans les solvants organiques et présente une réactivité trois fois inférieure à celle du THAM dans le méthanol. La polymérisation radicalaire d'un tel monomère dont les trois fonctions hydroxyle sont protégées, devait d'une part conduire à la formation d'une macromolécule organosoluble et d'autre part réduire l'influence sur la polymérisation des mécanismes associatifs intervenant souvent dans le cas des monomères présentant des fonctions hydroxyle libres.

Précisons aussi que les protections utilisées avec le THAM isopropylidène acétylé **4** sont parfaitement orthogonales, le groupement acétyle étant éliminé dans des conditions n'affectant pas l'intégrité du groupement cétal. Après polymérisation, une simple méthanolyse des esters en milieu basique devait permettre d'obtenir un polymère du THAM isopropylidène. Le greffage des chaînes hydrophobes effectué en milieu organique sur cet homopolymère, suivi de l'hydrolyse acide des groupements cétal du copolymère alors obtenu, devait permettre alors de disposer de la structure amphiphile attendue (cf. figure 3.15).

Il est vrai que l'utilisation du THAM isopropylidène **3** plutôt que du monomère **4** permettait de raccourcir le nombre d'étapes de la synthèse, mais l'homopolymère du THAM isopropylidène n'aurait certainement pas présenté la même affinité pour les solvants organiques qu'un polymère du monomère **4**. De plus, notre but étant de réduire au maximum l'influence des mécanismes d'association sur la réaction de polymérisation, l'emploi d'un tel monomère ne semblait pas justifié.

Le premier objectif de ce travail a donc consisté à déterminer les conditions permettant de contrôler au mieux la masse de la macromolécule obtenue par polymérisation radicalaire du monomère **4** et conduisant à l'homopolymère attendu avec un rendement quantitatif.

Par la même occasion nous avons étudié brièvement l'influence de différents paramètres (effets de solvants, influence de la température, influence des concentrations en réactifs...) sur la réaction de polymérisation des dérivés du THAM.



**Figure 3.15** : stratégie de synthèse envisagée pour l'élaboration des copolymères amphiphiles associatifs dérivés du THAM à partir du monomère **4**.

## 2) Synthèse des homopolymères par polymérisation radicalaire

Nous avons voulu obtenir un poly(Tris) dont la masse moyenne en nombre  $\bar{M}_n$  avoisinerait 200000 g.mol<sup>-1</sup>. Nous verrons par la suite que pour des raisons de solubilité du polymère nous n'avons pu que difficilement dépasser cette limite.

Le but a été de contrôler le mieux possible la polymérisation de façon à ce que la dispersion moléculaire soit minimale, le rendement de la réaction acceptable et la masse de la macromolécule obtenue proche de celle attendue. Plusieurs essais ont été effectués à cet effet en utilisant les monomères **3** et **4**. Le monomère **3** a été ici utilisé dans le but d'obtenir des informations supplémentaires sur la polymérisation des monomères dérivés du THAM.

### 2.1) Mise au point de la réaction de polymérisation des dérivés protégés du THAM

Nous avons réalisé plusieurs essais de polymérisation radicalaire des monomères **3** et **4** dans le but de déterminer des conditions expérimentales permettant de contrôler la masse du polymère. Les masses molaires des différentes macromolécules obtenues ont été déterminées par GPC (gel



permeation chromatography ou SEC : size exclusion chromatography) en prenant le polystyrène (PS) ou le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) comme référence ou en utilisant un détecteur DDL (diffusion de la lumière) (cf. partie expérimentale).

Les premiers essais effectués avec le monomère **4** dans le THF à ébullition (67°C), dans le dioxane (101°C) ou dans le méthanol (67°C avec le monomère **3**) en présence d'AIBN ou de peroxyde de benzoyle à différentes concentrations, se sont révélés particulièrement décevants et ont conduit inexplicablement à des polymères de faibles masses molaires (inférieures à 20000).

Il faut également noter qu'à haute température, en présence d'AIBN (dans le dioxane par exemple), la décomposition totale de cet amorceur est très rapide. On assiste alors (après amorçage) à une polymérisation de type thermique qui a pour effet essentiel d'accroître la polymolécularité du polymère.

Compte tenu de ces résultats pour le moins surprenants et des observations que nous avons déjà pu effectuer sur l'influence de la polarité du solvant sur les réactions de polymérisation du tris (cf chap. I), nous nous sommes intéressés à l'influence de ce dernier paramètre sur nos synthèses. Nous avons mené en parallèle des essais de polymérisation à des températures de l'ordre de 80 °C en présence d'AIBN dans un solvant polaire l'acétonitrile ( $T_{eb} = 82\text{ °C}$ ) et dans un solvant apolaire le benzène ( $T_{eb} = 80\text{ °C}$ ) (cf. Tableau 3.1).

Polymère	Monomère	Solvant	$T\text{ (°C)}$	$[M]_0$	$[M]_0/[I_2]_0$	$\bar{M}_n$	$\bar{M}_w$
<b>105</b>	<b>4</b>	Acétonitrile	82°C	0,575	10123	70000 <sup>a</sup>	140000
<b>106</b>	<b>4</b>	Acétonitrile	82°C	1	9213	130000 <sup>b</sup>	180000
<b>107</b>	<b>4</b>	<i>Benzène</i>	80°C	0,575	9190	480000 <sup>a</sup> 123000 <sup>b</sup>	940000 760000

**Tableau 3.1** : récapitulatif des premiers essais d'homopolymérisation réalisés dans l'acétonitrile ou le benzène à reflux, les concentrations  $[M]_0$  et  $[I_2]_0$  sont données en mol.L<sup>-1</sup>. Détermination de la masse (en g.mol<sup>-1</sup>) : <sup>a</sup> par mesures effectuées en SEC avec un détecteur DDL en ligne, <sup>b</sup> par mesures effectuées en SEC en équivalent PMMA.

L'influence de la polarité du solvant est donc considérable car pour une même concentration en monomère et avec des températures d'ébullition très proches, les masses du polymère obtenu sont très différentes suivant le solvant utilisé.

Nous avons obtenu une masse plus élevée dans le benzène qui est un solvant apolaire. Nous retrouvons donc l'un des principaux résultats de nos expériences de cinétique, à savoir que la réactivité des monomères dérivés du Tris est plus importante dans un solvant organique apolaire

que dans un solvant organique polaire. Ce résultat est également à rapprocher de ceux obtenus dans des solvants polaires tels que le THF, le dioxane ou le méthanol.

Il a donc paru intéressant de continuer nos expériences dans le benzène ou plutôt dans le toluène beaucoup moins cancérigène (cf. tableau 3.2).

Polymère	Monomère	$[M]_0$	$I_2$	$[M]_0/[I_2]_0$	$\bar{M}_n$	$\bar{M}_w$	$I$
<b>108</b>	<b>4</b>	0,2	AIBN	9660	46000 <sup>a</sup> 10700 <sup>b</sup>	54000 <sup>a</sup> 24000 <sup>b</sup>	-
<b>109</b>	<b>4</b>	0,575	AIBN	9425	47000 <sup>b</sup>	-	-
<b>110</b>	<b>4</b>	0,575	AIBN	2000	49000 <sup>b</sup>	-	-
<b>111</b>	<b>4</b>	0,575	AIBN	47399	55000 <sup>b</sup>	-	-
<b>112</b>	<b>4</b>	1	AIBN	20000	77000 <sup>b</sup>	130000	1,7
<b>113</b>	<b>4</b>	1	AIBN	10015	83000 <sup>b</sup>	120000	2,19

**Tableau 3.2** : récapitulatif des essais d'homopolymérisation effectués dans le toluène à reflux ( $T = 110,6$  °C). les concentrations  $[M]_0$  et  $[I_2]_0$  sont données en mol.L<sup>-1</sup>. Détermination de la masse (en g.mol<sup>-1</sup>) : <sup>a</sup> par mesures effectuées en SEC avec un détecteur DDL en ligne, <sup>b</sup> par mesures effectuées en SEC en équivalent PMMA.

Les masses des macromolécules restent relativement faibles quelles que soient la concentration en monomère et en amorceur, mais elles restent supérieures (polymère **109**) aux masses obtenues dans les mêmes conditions, dans le dioxane plus polaire.

Il faut par ailleurs remarquer qu'à la température d'ébullition du toluène (110,6 °C) le temps de demi-vie de l'AIBN est de l'ordre de 20 minutes. Après une heure de réaction, l'amorceur se sera totalement dégradé et il y aura auto-entretien de la réaction par polymérisation thermique. Les masses ne dépendront donc plus de la concentration en initiateur mais uniquement de la concentration en monomère.

Nous avons alors effectué les polymérisations à température moins élevée dans le toluène. Les premières expériences réalisées à concentration molaire du monomère, avec des rapports de concentrations monomère/amorceur inférieurs ou égaux à 1000 et avec une température variant entre 65 et 80 °C selon les essais, se sont soldées par des échecs (cf. tableau 3.3).

Monomère	$T$ (°C)	$(M)_0$	$I_2$	$(M)_0/(I_2)_0$
<b>4</b>	65	1 M	AIBN	9984
<b>4</b>	68	1 M	AIBN	19922
<b>4</b>	66	1 M	AIBN	1000
<b>4</b>	79	1 M	AIBN	983
<b>4</b>	65	1 M	AIBN	503

**Tableau 3.3** : récapitulatif des essais de polymérisation ayant échoué dans le toluène.

La polymérisation semblait inhibée, bien que toutes les précautions eussent été prises pour éliminer toutes les espèces antiradicalaires du milieu (bidistillation des solvants, recristallisations répétées de l'AIBN et du monomère, réactions sous atmosphère inerte ...etc...).

Nous n'avons en fait, obtenu des résultats positifs qu'à partir du moment où nous avons utilisé un rapport  $(M)_0/(I_2)_0$  supérieur ou égal à 200 (cf. tableau 3.4). Cette valeur a été préalablement déterminée de façon arbitraire.

Polymère	Monomère	$T$ °C	$[M]_0$	$I_2$	$[M]_0/[I_2]_0$	$\bar{M}_n$	$\bar{M}_w$	I
<b>114</b>	<b>4</b>	68	1 M	AIBN	199,4	430000 <sup>a</sup> 160000 <sup>b</sup>	650000 430000	1,5-1,8
<b>115</b>	<b>4</b>	65	1 M	AIBN	148,9	190000 <sup>b</sup>	350000	1,8-1,9

**Tableau 3.4** : récapitulatif des essais de polymérisation effectués dans le toluène à 65 °C. Détermination de la masse : <sup>a</sup> par mesures effectuées en SEC avec un détecteur DDL en ligne, <sup>b</sup> par mesures effectuées en SEC en équivalent PMMA.

Nous sommes donc parvenus à définir des conditions expérimentales où la concentration en amorceur est réellement le facteur limitant. Ce sont donc ces conditions, voisines de celles proposées par Tobolsky que nous utiliserons pour synthétiser nos polymères.

Précisons que nous n'avons pas poussé nos investigations jusqu'à définir la concentration en amorceur à partir de laquelle la polymérisation était possible, car nous avons jugé les résultats obtenus satisfaisants. Nous avons tout de même tenu à réaliser, par curiosité, d'autres essais à température peu élevée dans l'acétonitrile.

Les essais effectués dans l'acétonitrile à 65 °C nous ont permis de constater qu'il était également nécessaire dans ce cas d'utiliser une quantité d'amorceur suffisante pour que la réaction de polymérisation ait lieu. Nous avons donc utilisé une concentration en amorceur très proche de celle employée pour la synthèse du polymère **114** et nous avons obtenu le polymère **116** (cf. tableau 3.5).

Polymère	Monomère	$[M]_0$	$T$ (°C)	$I_2$	$[M]_0/[I_2]_0$	$\bar{M}_n$	$\bar{M}_w$	I
<b>116</b>	<b>4</b>	1 M	68	AIBN	198,2	160000	270000	1,7

**Tableau 3.5** : résultat obtenu à l'issue de l'essai de polymérisation effectué dans l'acétonitrile à 65 °C. Détermination de la masse par mesures effectuées en SEC avec un détecteur DDL en ligne.

Bien que la concentration en AIBN soit devenue dans ce cas aussi le facteur limitant, le toluène semblait donc plus approprié à nos réactions de polymérisation, car c'est le solvant qui nous a permis d'obtenir les masses molaires les plus élevées.

Cependant, si des paramètres tels que la polarité du milieu réactionnel ou la constante de transfert au solvant interviennent en tant que facteurs limitants, leur influence est négligeable devant celle de la température. Cette dernière commande en effet la vitesse de décomposition de l'amorceur, donc la vitesse d'initiation  $V_a$  et ainsi la longueur cinétique de chaîne  $\lambda$  définie par la relation :

$$\lambda = \frac{V_p}{V_a} \quad (1)$$

Nous avons donc déterminé des conditions satisfaisantes de contrôle de la masse moléculaire des polymères. Nous avons ensuite procédé à leur modification chimique de façon à obtenir des structures amphiphiles associatives après déprotection.

## 2.2) Synthèse et modification hydrophobe des homopolymères du THAM isopropyldène

La modification a été effectuée sur les homopolymères **114'** et **115'** issus de la méthanolyse des fonctions esters des homopolymères **114** et **115** dont les masses molaires ( $\bar{M}_w = 400-600000$ ) se sont révélées suffisamment importantes pour satisfaire nos objectifs.

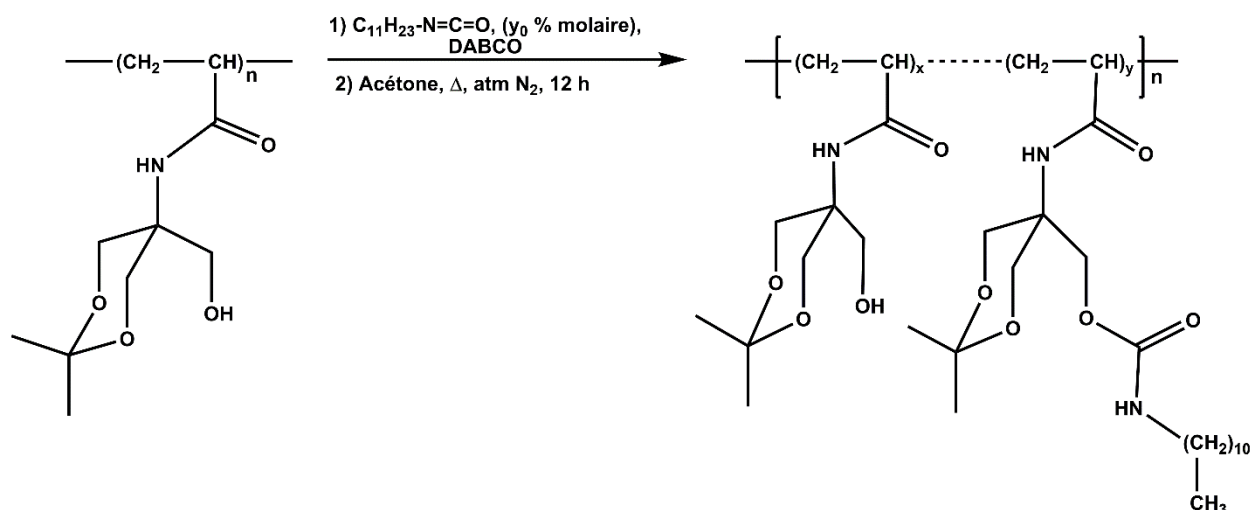
Nous avons choisi d'utiliser des alkylisocyanates pour la modification chimique des polymères, car les chaînes grasses sont ainsi facilement introduites avec des rendements quantitatifs.

Volpert *et al.*<sup>97,98</sup> ont obtenu un polymère amphiphile associatif en copolymérisant l'acrylamide avec un monomère hydrophobe dialkylé, le *N-N*-dihexylacrylamide. Les très bons résultats obtenus avec ce type de copolymère ont motivé notre choix vers une chaîne à douze carbones. L'undécylisocyanate étant plus facilement obtenu que le dodécylisocyanate, nous avons opté pour l'utilisation de l'undécylisocyanate **42**.

De plus, de manière à étudier l'influence de la longueur des chaînes hydrophobes latérales sur les propriétés rhéologiques des poly(Tris) amphiphiles, nous avons décidé d'employer également une chaîne lipophile plus longue à 17 atomes de carbone en utilisant l'heptadécylisocyanate **43**.

Etant donné que nous ignorions le taux de greffage nécessaire permettant de disposer d'une macrostructure parfaitement associative, nous avons utilisé plusieurs taux de greffage variant de 1 à 12 % par unité molaire.

La réaction de couplage de l'isocyanate avec le polymère a été effectuée dans l'acétone à ébullition en présence de DABCO (cf. Figure 3.16).



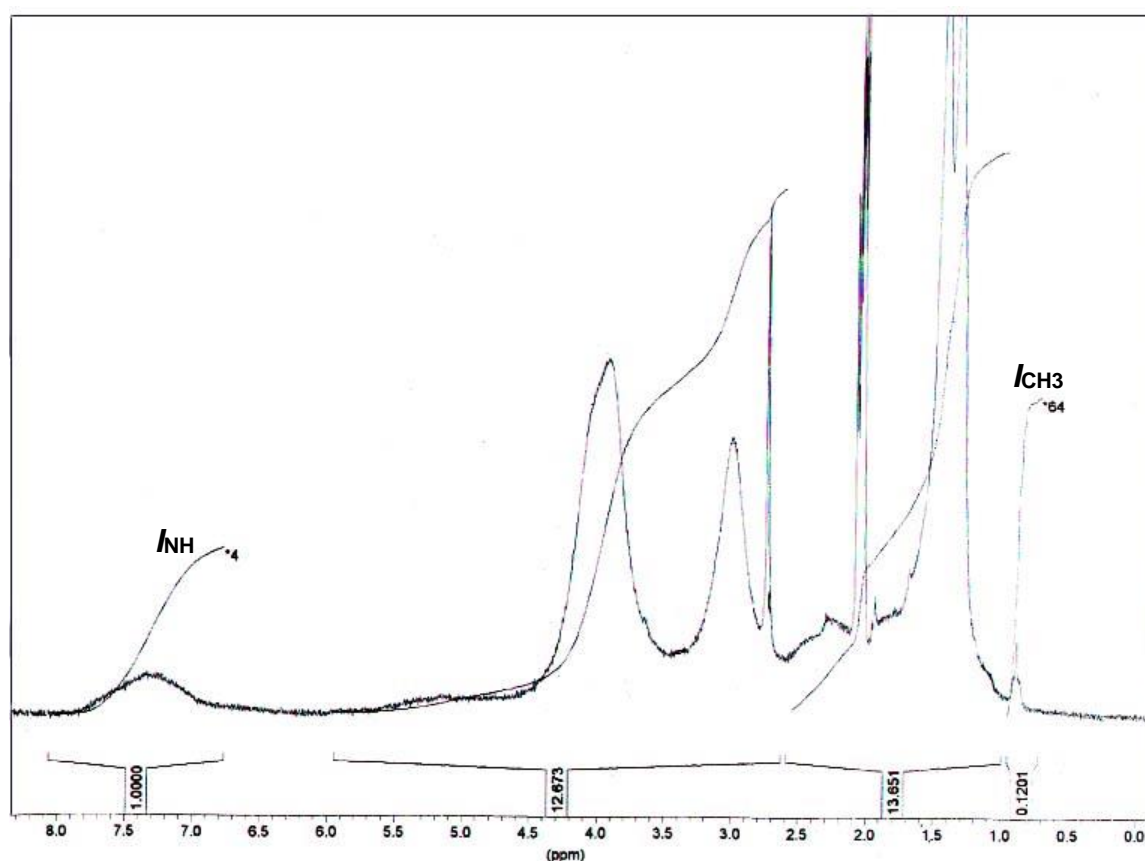
**Figure 3.16** : modification hydrophobe d'un homopolymère du monomère **3**. La fraction molaire  $y_0$  est exprimée par rapport aux unités monomères. Le détail du calcul de la masse d'undécylisocyanate correspondante devant être introduite dans le milieu réactionnel est donné en partie expérimentale (cf. partie expérimentale).

Précisons que nous travaillons à la limite de solubilité de l'homopolymère et que l'acétone est le solvant dans lequel ce dernier semble le plus soluble.

Nous pouvons employer également le DMF, mais d'une part ce solvant s'hydrate très vite et sa distillation est laborieuse et d'autre part, en éliminant l'eau, souvent nous enrichissons le solvant en trace de diméthylamine issue de sa dégradation. Enfin la réaction est lente dans ce solvant<sup>275</sup>.

De façon générale la méthode a conduit à l'homopolymère modifié avec des rendements de l'ordre de 90 % après purification par précipitation dans l'éther.

Une RMN réalisée dans le DMSO deutéré ou l'acétone deutérée (cf. figure 3.17) nous a permis de vérifier si le taux de greffage ( $y$ ) était proche de la valeur attendue ( $y_0$ ). Nous avons déterminé cette valeur en comparant l'intégration ( $I_{NH}$ ) du massif des protons amides à 7,5 ppm avec l'intégration ( $I_{CH3}$ ) du triplet des méthyles des chaînes latérales à 0,88 ppm (le détail du calcul est donné en partie expérimentale).



**Figure 3.17** : spectre RMN  $^1\text{H}$  du polymère **115'3/C<sub>11</sub>** effectué dans l'acétone  $\text{d}_6$ . Précisons que le proton porté par l'azote de la fonction uréthane n'apparaît pas toujours sur le spectre RMN  $^1\text{H}$ . Nous pouvons observer parfois le massif représentatif de ce proton à 6,5 ppm et, dans ce cas, le pic du proton amide est déplacé à 8 ppm.

Dans certains cas, nous avons trouvé des valeurs pour  $y$  nettement supérieures aux valeurs attendues (cf. valeurs en gras du tableau 3.6). Nous ne sommes pas parvenus à donner une explication à ces incohérences. Nous pouvons supposer toutefois qu'une partie des protons amide (ou uréthane) n'est pas visible en RMN ou déplacée vers des champs encore plus faibles. Nous n'avons donc pas été en mesure de définir la structure de ces copolymères par simple analyse RMN  $^1\text{H}$ . Il était donc certainement nécessaire de procéder à des analyses complémentaires (microanalyse) pour connaître le taux réel de chaînes greffées.

Cependant, de nombreux résultats ont toutefois révélé que les taux de greffage étaient proches des proportions initiales d'alkylisocyanate utilisées, nous avons considéré ce cas comme tout à fait général.

En effet, si l'ensemble des différentes expériences de modification chimiques sont toutes réalisées dans les mêmes conditions expérimentales, (seul le taux d'alkylisocyanate initial varie) il est alors permis de penser que le rendement de la réaction est toujours le même quelles que soient les proportions initiales en isocyanates utilisées.

Donc, bien que nous n'étions pas sûr du nombre de chaînes alkyles latérales présentes sur un copolymère issu de la modification chimique d'un homopolymère nous pouvions penser, avec une erreur relative constante, que celui-ci était proche de la valeur attendue.

Ce détail a trouvé toute son importance lorsque nous avons procédé aux études physico-chimiques des propriétés en solution de ces polymères associatifs en fonction de leur taux d'hydrophobie (*vide infra*).

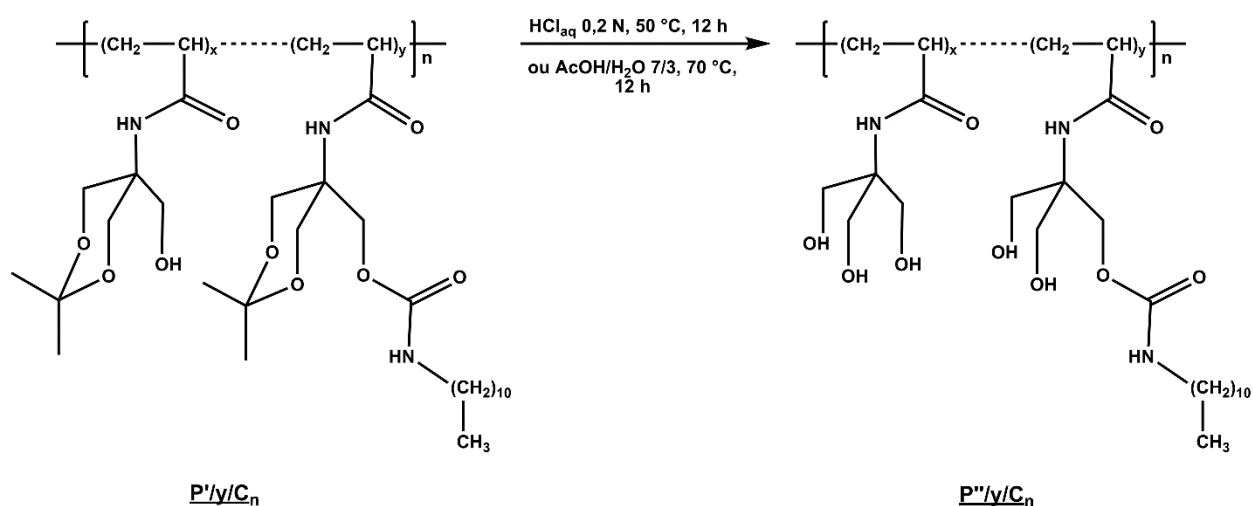
Les rendements de la réaction, les nomenclatures des copolymères obtenus, le taux de greffage  $y_0$  défini initialement et le taux de greffage  $y$  calculé par analyse RMN sont répertoriés dans le tableau 3.6.

Polymères	$y_0$	$y$	Rendements
<b>115'/1/C<sub>11</sub></b>	1 %	1,5 %	89 %
<b>115'/2/C<sub>11</sub></b>	2 %	2,3 %	90 %
<b>115'/3/C<sub>11</sub></b>	3 %	4 %	87 %
<b>115'/5/C<sub>11</sub></b>	5 %	5,9 %	85 %
<b>114'/3/C<sub>11</sub></b>	3 %	<b>8,6 %</b>	90 %
<b>114'/8/C<sub>11</sub></b>	8 %	9,6 %	89 %
<b>114'/9/C<sub>11</sub></b>	9 %	<b>14,6 %</b>	86 %
<b>114'/10/C<sub>11</sub></b>	10 %	11,4 %	85 %
<b>114'/11/C<sub>11</sub></b>	11 %	<b>14,1 %</b>	90 %
<b>114'/12/C<sub>11</sub></b>	12 %	12,2 %	88 %
<b>114'/3/C<sub>17</sub></b>	3 %	3,2 %	82 %

**Tableau 3.6** : récapitulatif des résultats obtenus après modification hydrophobe des homopolymères **114'** et **115'**. La nomenclature utilisée permet de connaître l'homopolymère sur lequel a été effectué la modification hydrophobe, le taux de modification fixé initialement et la longueur de la chaîne hydrophobe. **115'/1/C<sub>11</sub>** est le nom donné au copolymère issu de la modification à 1 % du polymère **115'** par greffage d'une chaîne à 11 atomes de carbone (C<sub>11</sub>). Les valeurs incohérentes de  $y$  sont données en gras.

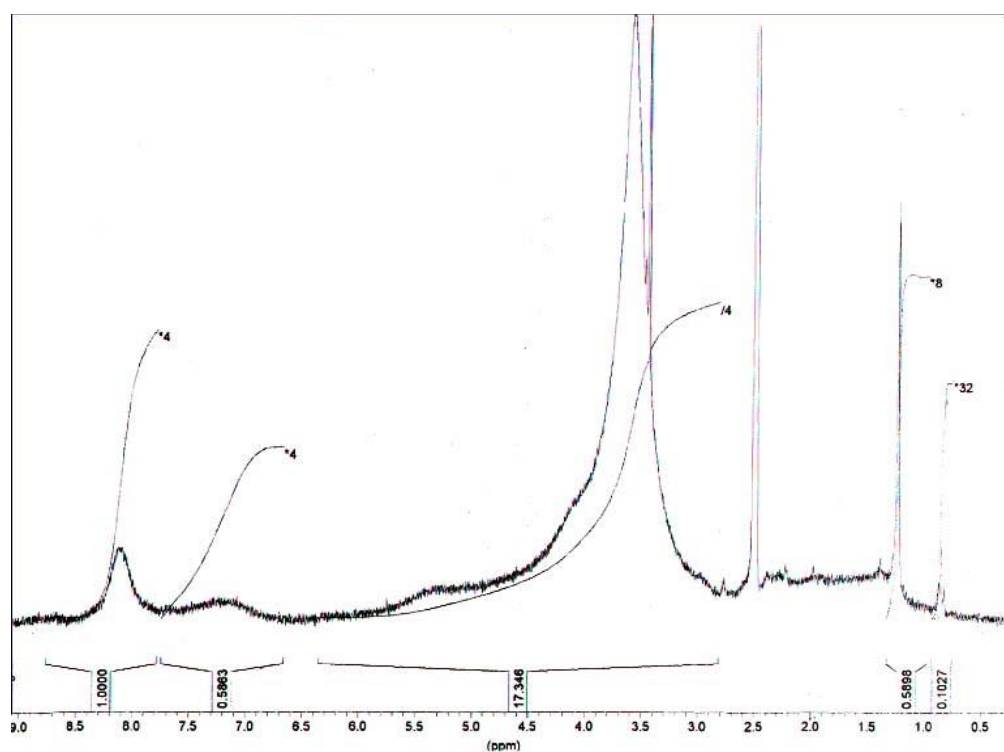
### 2.3) Déprotection des polymères modifiés et obtention des poly(Tris) amphiphiles

Les polymères sont déprotégés par hydrolyse acide dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 0,2 N portée à 50 °C ou dans un mélange acide acétique/eau (7/3) porté à 70°C durant 12 h à 48 h. Le solvant est évaporé et le polymère final est ensuite repris dans de l'eau distillée et la solution est filtrée puis lyophilisée. La déprotection d'un polymère **P'/y/C<sub>n</sub>** conduit au polymère **P''/y/C<sub>n</sub>** (cf. figure 3.18).



**Figure 3.18** : déprotection des copolymères par hydrolyse acide.

La pesée des différents lyophilisats a montré que les masses en polymères obtenues étaient supérieures à celles attendues, alors que les analyses des différents produits en RMN  $^1\text{H}$  dans le DMSO deutéré semblaient pourtant confirmer la disparition totale des motifs isopropylidène.



**Figure 3.19** : spectre RMN  $^1\text{H}$  du copolymère 115''/3/C11 dans le DMSO  $\text{d}_6$ .

La déprotection des fonctions alcools par hydrolyse acide étant donc totale et la valeur du taux de chaînes greffées  $y''$  (cf. tableau 3.7) déterminée après analyse RMN  $^1\text{H}$  (cf. figure 3.19) restant proche de celle calculée avant hydrolyse des groupements céta, nous avons émis l'hypothèse que



les poly(Tris) modifiés pouvaient complexer des molécules d'eau et subsistaient sous forme d'hydrate après lyophilisation.

Polymère	y'	y''
<u>115''/1/C<sub>11</sub></u>	1,5 %	1,2 %
<u>115''/2/C<sub>11</sub></u>	2,3 %	2,1 %
<u>115''/3/C<sub>11</sub></u>	4 %	3,4 %
<u>115''/5/C<sub>11</sub></u>	5,9 %	4,9 %

**Tableau 3.7** : Taux de greffage y'' pour les copolymères (notés 115''/y/C<sub>11</sub>) issus de la déprotection totale des différents copolymères cétales (notés 115''/y/C<sub>11</sub>) obtenus par modification de l'homopolymère 115'.

### 3) Conclusion

L'utilisation du monomère **4** nous a permis de disposer d'une macrostructure organosoluble et non associative, pour laquelle il a été aisé (par diffusion de la lumière ou par GPC) de déterminer une masse molaire.

Bien que nos premières tentatives de mise au point de la réaction de polymérisation aient abouti à des échecs, nous sommes tout de même parvenus à définir les conditions expérimentales satisfaisantes permettant de contrôler la masse du polymère en modulant la quantité initiale d'amorceur radicalaire.

Nous avons montré qu'il était nécessaire dans ces conditions d'utiliser une quantité importante d'AIBN, car malgré toutes les précautions prises, un inhibiteur des réactions radicalaires semblait subsister dans le milieu réactionnel.

Nous avons retrouvé certains des résultats exposés dans le premier chapitre car nous avons pu constater que les masses molaires des polymères obtenus et donc les réactivités des monomères étaient plus importantes dans un solvant organique apolaire tel que le toluène plutôt que dans un solvant organique polaire tel que l'acétonitrile.

Après désacetylation de l'homopolymère du THAM isopropylidène acétylé, la réaction de modification hydrophobe de l'homopolymère du THAM isopropylidène obtenu a été réalisée dans des conditions douces ne provoquant aucune rupture de chaîne de la macromolécule.

Les rendements convenables obtenus indiquaient que la réactivité des fonctions alcool du polymère était comparable à la réactivité de la fonction alcool du monomère **3**.

La méthode de synthèse mise en œuvre a permis d'aboutir assez rapidement et facilement aux structures amphiphiles attendue avec des rendements presque quantitatifs.

L'analyse structurale par RMN  $^1\text{H}$  des composés obtenus n'a, dans certains cas, pas permis de confirmer que le taux de modification correspondait bien à celui attendu ; ceci laissant penser qu'il serait préférable à l'avenir de compléter les analyses de spectroscopie RMN par une seconde méthode mieux adaptée.

### III) ÉTUDES DES PROPRIÉTÉS RHÉOLOGIQUES DES POLYMÈRES AMPHIPHILES DÉRIVÉS DU TRIS

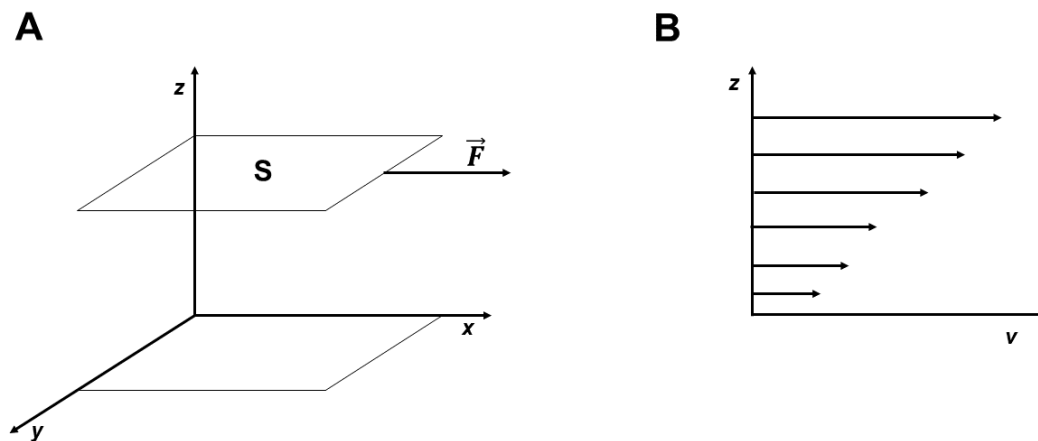
*Ce travail a été effectué à l'institut Charles Sadron, en collaboration avec l'équipe de M<sup>me</sup> Candau.*

#### A) Quelques notions de base en rhéologie

##### 1) Généralités-définitions

La rhéologie se définit comme l'étude des propriétés d'écoulement et de déformation des fluides.

Le modèle choisi est un fluide dont l'écoulement est laminaire, c'est-à-dire que ce fluide est composé de plusieurs couches planes superposées s'écoulant suivant la même direction (cf. figure 3.19) et glissant les unes sur les autres. Seules les couches de fluide directement en contact avec les surfaces solides ne glissent pas. Leur vitesse par rapport aux parois est toujours nulle. La viscosité est alors définie comme une résistance à l'écoulement. Elle est représentative des forces de frottement entre particules constituantes du fluide.



**Figure 3.19** : écoulement laminaire d'un fluide (A) et gradient de vitesse de cisaillement (B).

La viscosité augmente lorsque la mobilité des particules est diminuée. Elle augmente donc, lorsque la taille (pour un fluide pur) ou le volume hydrodynamique (pour un mélange soluté-solvant) des particules augmente. Ce volume correspond au volume occupé par une particule solvatée. Il dépend de la masse du soluté mais aussi de son affinité pour le solvant.

D'autres facteurs tels que l'existence de fortes associations (liaisons hydrogène, interactions hydrophobes...) entre les particules ou une concentration en soluté plus importante peuvent aussi contribuer à une augmentation de la viscosité du milieu.

La viscosité évolue en fonction de la température. Pour un fluide pur, elle baisse lorsque la température augmente mais dans le cas d'une solution elle peut, soit diminuer, soit augmenter suivant la structure du soluté.

Nous pouvons distinguer différentes viscosités.

La viscosité apparente  $\eta$  exprimée en Pa.s (Poiseuille) ou en mPa.s (centiPoise), représente la viscosité de la solution.

La viscosité relative  $\eta_{rel}$  est définie comme suit :

$$\eta_{rel} = \eta / \eta_0 \quad (2)$$

où  $\eta_0$  est la viscosité du solvant.

La viscosité spécifique  $\eta_{spé}$  est définie par la relation suivante :

$$\eta_{spé} = (\eta - \eta_0) / \eta_0 = \eta_{rel} - 1 \quad (3)$$

La viscosité réduite  $\eta_{red}$  exprimée en mL.g<sup>-1</sup> et est donnée par :

$$\eta_{red} = \eta_{spé} / c \quad (4)$$

La viscosité inhérente  $\eta_{inh}$  est liée à  $\eta_{rel}$  par :

$$\eta_{inh} = \ln(\eta_{rel}) / c \quad (5)$$

La viscosité intrinsèque ou indice limite de viscosité  $[\eta]$  correspond à la limite de la viscosité réduite quand la concentration en soluté tend vers zéro. Elle est exprimée en mL.g<sup>-1</sup> et donnée par la relation :

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{red})_c \quad (6)$$

## 2) Mesure des viscosités

### 2.1) Viscosité apparente

La viscosité est mesurée en appliquant une force tangentielle à l'échantillon. Le rapport de cette force à l'aire de la surface de contact donne la valeur de la contrainte de cisaillement  $\tau$  (cf. figure 3.19).

$$\tau = F/S \quad (7)$$

La résistance au cisaillement est représentative de la viscosité de l'échantillon qui est alors connue. Le mouvement étant progressivement amorti le long des différentes couches constituant le fluide, la vitesse de déformation  $\dot{\gamma}$  n'est pas la même en tout point du système étudié et il apparaît un gradient de vitesse ou une vitesse de cisaillement (cf. figure 3.19) :

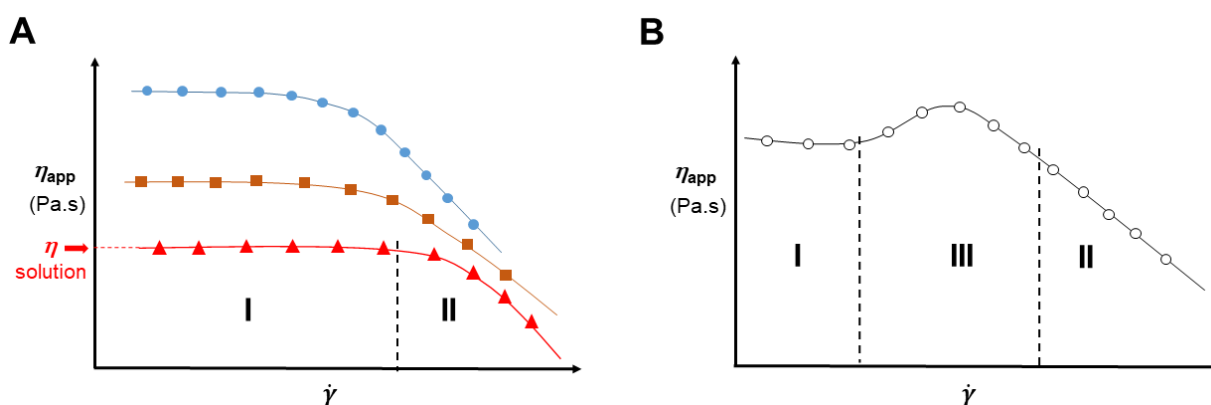
$$\dot{\gamma} = dv/dz \quad (8)$$

Les valeurs de la viscosité sont données par la relation :

$$\eta = \tau / \dot{\gamma} \quad (9)$$

Lorsque la viscosité est indépendante de la vitesse ou de la contrainte de cisaillement le liquide est dit **newtonien**, dans le cas contraire il est dit **non newtonien**. On parle alors de viscosité apparente définie pour un  $\dot{\gamma}$  donné. Le comportement newtonien peut être observé avec des solutés dont la masse molaire ne dépasse pas 2 millions et dont les concentrations sont très faibles.

En pratique, la courbe représentant l'évolution de la viscosité apparente en fonction du gradient de vitesse permet d'obtenir la valeur de la viscosité par extrapolation à gradient nul (cf. figure 3.20). Les mesures sont effectuées à gradient imposé ou à contrainte imposée suivant le cas.



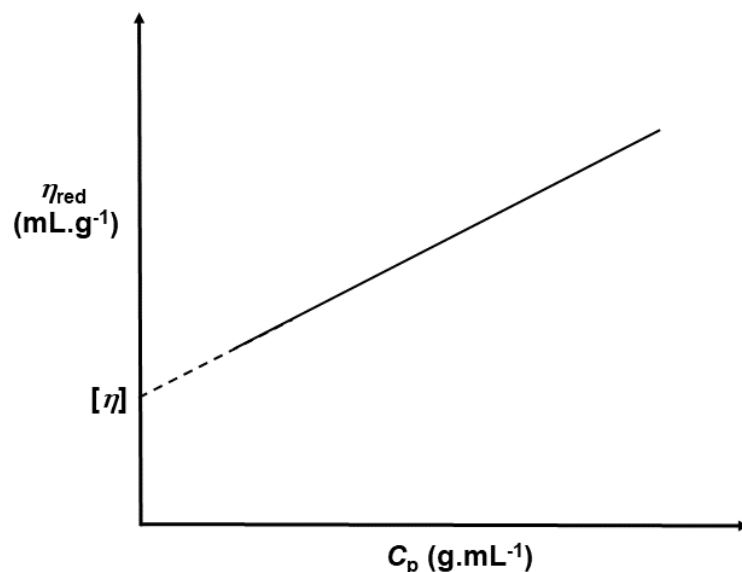
**Figure 3.20** : **A**/Evolution de  $\eta$  en fonction de  $\dot{\gamma}$  pour deux polyacrylamides PAM<sub>1</sub> (aux concentrations  $C_{p1}$  (●) et  $C_{p2}$  (■) avec  $C_{p2} < C_{p1}$ ) et PAM<sub>2</sub> (à la concentration  $C_{p2}$  (▲)) de masses moléculaires respectives  $M_1$  et  $M_2$  différentes et telles que  $M_2 < M_1$ . La zone **I** délimite la zone de comportement newtonien et la zone **II** celle du comportement rhéofluidifiant (rupture des enchevêtrements de chaînes). **B**/Comportement caractéristique de la plupart des polymères associatifs. Les zones **I** et **II** sont définies telles que précédemment et la zone **III** délimite la zone de rhéoépaississement de la solution.

Dans le cas de systèmes associatifs, le comportement rhéofluidifiant de la solution peut être précédé d'un comportement rhéoépaississant se traduisant par l'apparition d'un épaulement entre la zone de comportement newtonien et la zone de comportement rhéofluidifiant de la courbe  $\eta_{app} = f(\dot{\gamma})$  (cf. Figures 3.20).

Ce phénomène est la conséquence de l'existence d'interactions hydrophobes dans la solution aqueuse. Il s'établit en fait un équilibre entre interactions intra- et intermoléculaires. Un cisaillement suffisamment important de la solution va provoquer la rupture des associations intramoléculaires et les séquences hydrophobes ainsi libérées vont former des associations intermoléculaires supplémentaires. Il en résultera une augmentation de la viscosité.

## 2.2) Viscosités réduites et intrinsèques

La viscosité réduite  $\eta_{red}$  est mesurée dans des domaines de concentration en soluté où la viscosité apparente est faible. Dans le cas où le soluté est un polymère, les mesures s'effectuent avec des solutions diluées (concentration inférieure à 1,5-2 % en poids), le régime dilué étant un domaine pour lequel l'évolution de la viscosité apparente en fonction de la concentration en soluté est linéaire. Le tracé de la courbe de la viscosité réduite en fonction de la concentration en polymère permet de déterminer la viscosité intrinsèque  $[\eta]$  par extrapolation à concentration nulle en soluté (cf. figure 3.21).



**Figure 3.21** : évolution de la viscosité réduite en fonction de la concentration en polymère.

La viscosité réduite ( $\eta_{red}$ ) est reliée à la concentration en polymère ( $C_p$ ) par l'équation suivante :

$$\eta_{red} = [\eta] + k_H.[\eta]^2.C_P \quad (10)$$

$k_H$  est appelé coefficient de Huggins et il est déterminé après calcul de la pente  $p$  de la courbe  $\eta_{red} = f(C_p)$ .

$$p = k_H.[\eta]^2 \quad (11)$$

$$k_H = p / [\eta]^2 \quad (12)$$

La viscosité intrinsèque ( $[\eta]$ ) est une indication qualitative du volume hydrodynamique du polymère alors que le coefficient de Huggins ( $k_H$ ) donne des informations sur les interactions solvant-solute. Une faible valeur de ce coefficient indique que les interactions sont attractives et le solute se trouve alors dans un bon solvant ( $k_H = 0,3-0,4$ ).

Des valeurs comprises entre 0,6 et 0,8 sont caractéristiques d'un mauvais solvant et lorsque la valeur du coefficient devient supérieure à environ 0,8 il y a agrégation du soluté.

## ***B) Etudes rhéologiques***

Les mesures de viscosité ont été effectuées sur l'ensemble des polymères 115''/1/C11 à 114''/12/C11. Il faut rappeler ici que seules les masses molaires distinguent les polymères de type 114 ( $\bar{M}_n = 160000$ ) et 115 ( $\bar{M}_n = 190000$ ).

### **1) Mesures des viscosités apparentes**

#### **1.1) Evolution de la viscosité en fonction du gradient de vitesse de cisaillement**

Les solutions aqueuses de ces polymères forment dans la plupart des cas des microgels en suspension. Nous avons émis l'hypothèse que la texture particulière de la solution provoquait le glissement du corps de mesure (cône) à la surface de l'échantillon. Les valeurs de viscosité apparente trouvées étaient donc certainement erronées.

Nous avons attribué ce phénomène aux fortes liaisons hydrogène existant entre les différents motifs Tris dans l'eau. Les liaisons hydrogène auraient conduit à la formation d'un réseau ou

hydrogel dont les nombreuses interactions associatives entre ses constituants pouvaient être si fortes que l'énergie de solvatation ne suffisait pas à assurer une parfaite homogénéité du milieu.

Rappelons que certains polyols tels que les PVA sont connus pour former parfois dans l'eau des solutions relativement visqueuses. Cette viscosité est reliée aux fortes liaisons hydrogène existant entre les différentes fonctions hydroxyle des macromolécules.

Ce même type d'interactions peut aussi s'établir entre des molécules de PVA et d'autres polymères tels que les acrylamides ou les poly(acide acrylique)<sup>340,341</sup>.

Briscoe *et al.*<sup>342</sup> ont étudié l'influence de différents paramètres (température, pression, force ionique du solvant...) sur la viscosité des solutions aqueuses de PVA. Ils ont montré notamment que celle-ci dépendait de l'équilibre existant entre les liaisons hydrogène établies entre les macromolécules et celles établies entre les macromolécules et le solvant (eau).

Il était donc très probable que les viscosités importantes des solutions de poly(Tris) eussent été la conséquence de la formation d'un réseau macromoléculaire où les connections entre les chaînes macromoléculaires étaient assurées par de fortes liaisons hydrogène.

Il faut également préciser que ceci s'est produit uniquement après lyophilisation des polymères, la déshydratation totale de l'échantillon provoquant certainement la formation de connections quasi-irréversibles (ou très lentement réversibles) au sein du réseau.

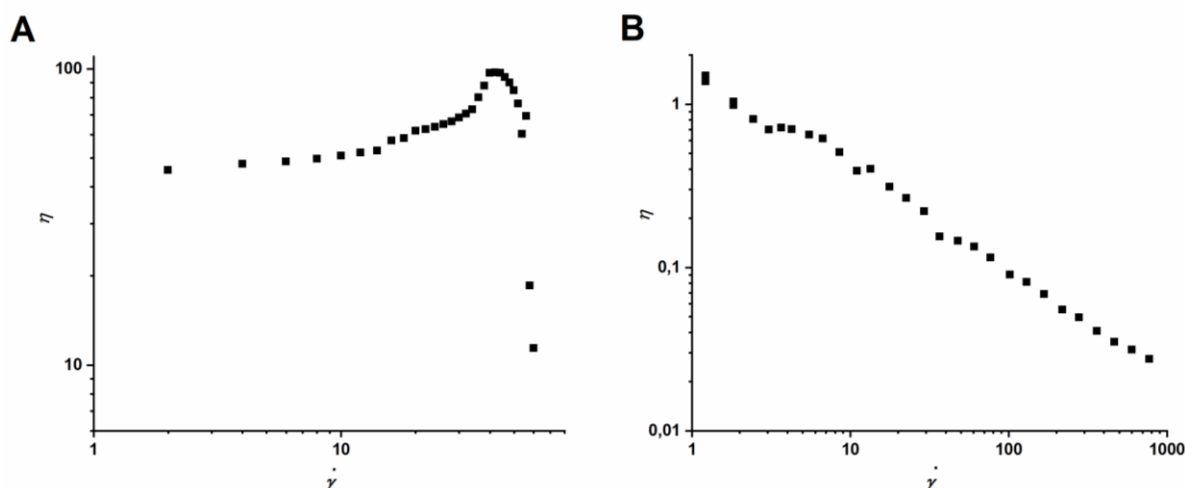
Nous avons confirmé ce résultat en polymérisant du THAM dans l'eau puis en précipitant le polymère **117** obtenu. Une fois redissous dans l'eau, ce polymère a donné une solution homogène.

Ceci n'a cependant pas été le cas lorsque nous avons préparé une solution aqueuse des polymères **114'** ou **115'** (issus respectivement de la déprotection des homopolymères **114'** et **115'**). Ces dernières présentaient une certaine hétérogénéité.

Cette pseudo hétérogénéité a aussi été observée avec les solutions aqueuses des polymères modifiés hydrophobiquement. Ce phénomène est intervenu dans ce cas, à partir d'une certaine concentration en polymère. Exception faite pour le polymère **114''/10/C11**, celle-ci a souvent été supérieure à la concentration en homopoly(Tris) pour laquelle la formation d'un microgel était observée. Les associations hydrophobes devaient certainement inhiber en partie la formation de liaisons hydrogène.



Le polymère **114''** (dépourvu de chaînes hydrophobes) à la concentration de 4 % et le polymère **114''/10/C<sub>11</sub>** à la concentration de 1,5 % ont formé des solutions en apparence très visqueuses bien que les mesures effectuées rendaient compte de viscosités peu élevées pour ces mêmes solutions (cf. figure 3.22).

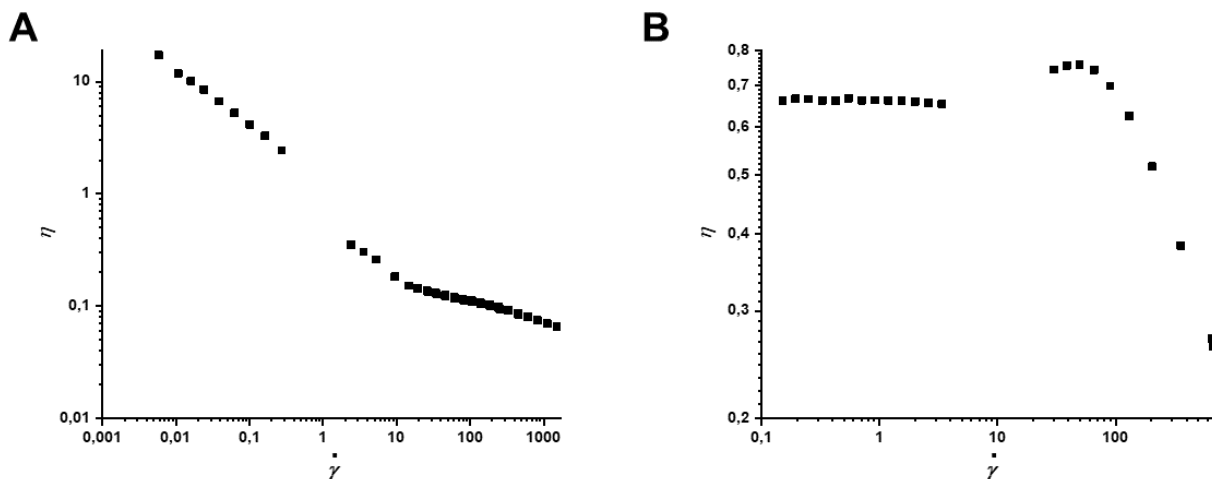


**Figure 3.22** : Mesure de la viscosité apparente des polyTris amphiphiles en fonction du gradient de vitesse. **A**/Homopolymère **114''** à la concentration  $C_p = 4$  %. **B**/Polymère **114''/10/C<sub>11</sub>** à la concentration  $C_p = 1,5$  %.

Nous notons l'existence d'une zone de rhéoépaississement pour le polymère **114''** ce qui semble confirmer que l'homopoly(Tris) forme effectivement un réseau associatif par l'intermédiaire de fortes liaisons hydrogène. L'application d'un cisaillement tendrait comme dans le cas des polymères amphiphiles associatifs à favoriser l'établissement d'interactions (liaisons hydrogène) supplémentaires et à renforcer ainsi les associations.

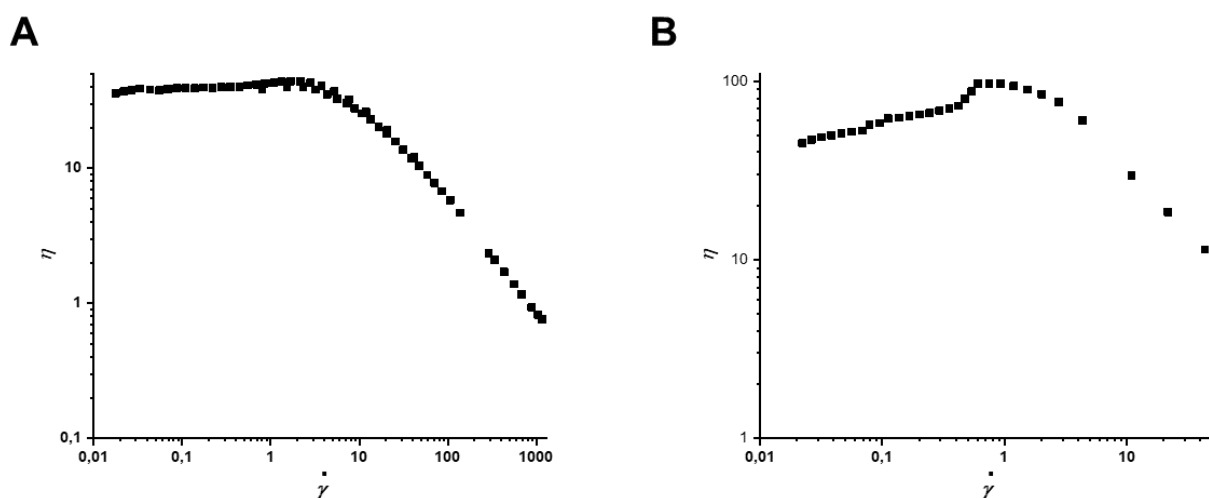
Les concentrations en polymère nécessaires à la formation d'un gel se sont révélées importantes en dépassant 6 % pour chaque polymère, exception faite pour le polymère **114''/10/C<sub>11</sub>** qui a permis de disposer d'une solution très visqueuse pour une concentration inférieure à 2 %.

Comme nous l'avons précisé, les solutions de polymères pouvaient avoir une apparence très visqueuse mais les viscosités mesurées restaient faibles. La texture particulière des différentes solutions a certainement provoqué des erreurs dans les mesures effectuées par l'appareil. Ceci pourrait expliquer le comportement particulièrement rhéofluidifiant de la plupart de nos polymères (cf. figure 3.22B et 3.23A). Lorsque le gradient de vitesse augmente le fluide glisse sur les parois du corps de mesure et les valeurs de viscosité mesurées sont alors fausses, ce glissement étant traduit comme une baisse brutale de la viscosité par le rhéomètre.



**Figure 3.23** : mesure de la viscosité apparente en fonction du gradient de vitesse pour une solution de polymère 114''/3/C11 à 8 % (A) et une solution à 6 % de polymère 115''/5/C11 (B).

Les polymères 114''/8/C11 et 114''/12/C11 (cf. figure 3.24) ont présenté un comportement différent, les solutions gélifiées de ces polymères étant d'apparence parfaitement homogène et les propriétés rhéofluidifiantes étant moins effectives que dans les autres cas.



**Figure 3.24** : mesure de la viscosité apparente en fonction du gradient de vitesse pour une solution à 6 % de polymère 114''/8/C11 (A) et une solution à 6 % de polymère 114''/12/C11 (B).

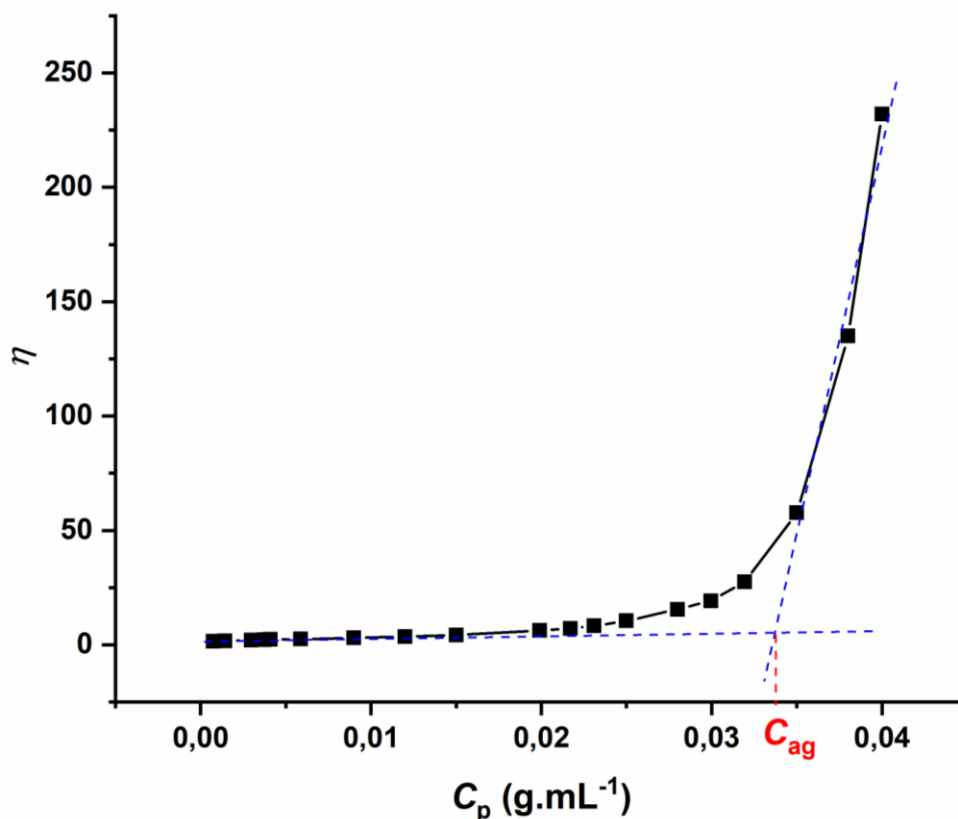
Ces résultats ont donc montré que le polymère 114''/12/C11 (cf. figure 3.24B) était celui présentant les propriétés les plus intéressantes, car c'est un des seuls polymères dont le comportement était suffisamment proche de celui d'un polymère amphiphile associatif.

En effet, les mesures de viscosité apparente des solutions aqueuses de ce polymère ont permis de distinguer les trois zones caractéristiques des propriétés rhéologiques attendues, à savoir, un plateau newtonien auquel succède un épaulement correspondant à une zone de rhéoépaississement suivie elle-même d'une zone de rhéofluidissement.

Nous avons donc choisi d'approfondir l'étude des propriétés rhéologiques du polymère 114''/12/C<sub>11</sub> en procédant à la mesure de la viscosité de ses solutions en fonction de sa concentration dans l'échantillon.

### 1.2) Evolution de la viscosité apparente en fonction de la concentration en polymère

Les mesures effectuées (cf. figure 3.25) sur des solutions de polymère 114''/12/C<sub>11</sub> permettent de définir sa concentration d'agrégation  $C_{ag}$ , concentration à partir de laquelle les associations hydrophobes interviennent.



**Figure 3.25** : Evolution de la viscosité apparente en fonction de la concentration en polymère 114''/12/C<sub>11</sub>.

Cette concentration a été évaluée à  $C_{ag} = 0,0337 \text{ g.mL}^{-1}$  soit  $33,7 \text{ g.L}^{-1}$ . Cette concentration est relativement importante si nous la comparons aux valeurs obtenus avec des copolymères de l'acrylamide et du *N,N*-dihéxylacrylamide. Ces copolymères de taille et masse plus élevées ( $\bar{M}_w = 2,2\text{-}2,7 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ ) dont la teneur en monomère hydrophobe ne dépasse pas 1,1 % en mole (le pourcentage molaire de chaîne hydrophobe est inférieur ou égal à 2,2 %) présentent en effet des concentrations d'agrégation évoluant entre 17 et 27  $\text{g.L}^{-1}$ <sup>97,98</sup>.

La très forte augmentation de viscosité observée pour une concentration supérieure à  $0,03 \text{ g.mL}^{-1}$  a semblé indiquer un effet associatif. Cependant nous n'avons pu l'affirmer en toute rigueur sans effectuer de comparaison avec le comportement de l'homopolymère dépourvu de chaînes hydrophobes. Ceci n'a pu être hélas réalisé pour des raisons de mauvaise solubilité de l'homopoly(Tris).

Nous avons alors procédé à des mesures de viscosité réduite de façon à déterminer la viscosité intrinsèque du polymère mais aussi afin d'obtenir une valeur du coefficient de Huggins.

## 2) Mesure de la viscosité réduite

Les mesures de viscosité réduite ont été effectuées sur les solutions du polymère 114''/12/C11 et d'un homopoly(Tris) obtenu par polymérisation du THAM dans l'eau.

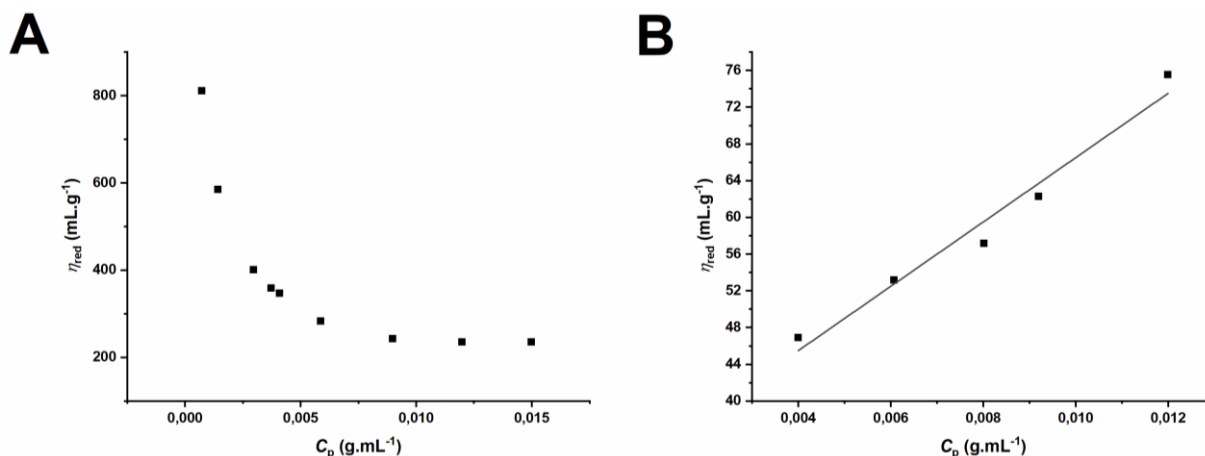
### 2.1) Mesure de la viscosité réduite du polymère 114''/12/C11

Contre toute attente, la courbe obtenue a démontré que notre polymère amphiphile neutre dérivant du Tris se comportait comme un polyélectrolyte (cf. figure 3.26). En effet la viscosité réduite du polymère augmentait lorsque la concentration de ce dernier baissait (cf. figure 3.26A), ce cas étant typiquement observé avec des polyélectrolytes<sup>50,51,83,86,343</sup>.

Rappelons que l'un des facteurs influençant la viscosité est le volume hydrodynamique du polymère.

En milieu dilué, les répulsions électrostatiques intramoléculaires sont importantes et la chaîne macromoléculaire a tendance à s'étendre. Le volume hydrodynamique augmente au fur et à mesure que la concentration en polymère diminue. La viscosité réduite augmente donc lorsque la concentration en polymère diminue.

Quand la concentration augmente, la diminution des interactions électrostatiques intramoléculaires résultant d'un auto-écranage des charges provoque des contractions des pelotes macromoléculaires. Le volume hydrodynamique du polymère diminue et cette diminution entraîne une baisse de la viscosité réduite.



**Figure 3.26** : évolution de la viscosité réduite en fonction de la concentration en polymère 114''/12/C11. A/mesures effectuées dans l'eau pure. La viscosité réduite diminue très rapidement en fonction de la concentration en polymère. B/mesures effectuées dans une solution de NaCl à 0,1 M. La viscosité réduite augmente quasi-linéairement et progressivement sur le premier intervalle de mesure suivant la relation  $\eta_{red} = 3502,8.C_p + 31,461$  ( $r^2 = 0,9701$ ).

L'évolution de la viscosité du polymère 114''/12/C11 tendait donc à montrer que ce dernier comportait des charges réparties le long de la chaîne macromoléculaire.

Une mesure effectuée dans l'eau salée (cf. figure 3.26B) a confirmé ce résultat en montrant que lorsque la force ionique du solvant augmentait, l'écrantage des charges inhibait les interactions électrostatiques intra- et intermoléculaires et la viscosité réduite évoluait dans le même sens que la concentration.

La faible viscosité intrinsèque mesurée rendait compte d'associations hydrophobes intramoléculaires dans l'eau salée.

Deux explications étaient dès lors envisageables pour expliquer ce phénomène :

- Nous pouvions tout d'abord supposer que l'hydrolyse acide des fonctions cétal conduisait à l'hydrolyse d'une partie des liaisons amide. Un dosage potentiométrique a révélé en fait que ces charges étaient présentes sur tous les polymères en des proportions variant de 25 à 30 % en mole par rapport aux unités monomères. Il nous a semblé difficile de concevoir qu'une aussi grosse partie des liaisons amide ait pu subir une hydrolyse en milieu acide dilué et à une température comprise entre 25 et 50 °C. De plus, à un taux de 25 à 30 %, les analyses spectroscopiques auraient très certainement permis de déceler ce phénomène en observant une diminution significative du nombre de motif Tris sur les spectres des polymères.

- La deuxième hypothèse impliquait le piégeage ou la complexation d'acide chlorhydrique par le polymère. Cette dernière hypothèse n'est pas à exclure car il a déjà été montré qu'un télomère

du THAM pouvait chélater l'acide borique<sup>125</sup> en formant un complexe tridenté avec l'ion borate. De même les PVA<sup>344</sup> peuvent aussi se complexer à des métaux de transitions tel que le platine<sup>345</sup> ou encore à un halogène tel que l'iode<sup>346</sup>. Les polyols présentait donc la particularité de pouvoir complexer des corps solides en solution, mais nous ignorions si leur structure permettait de complexer des ions hydroxonium.

Dans le but de vérifier chacune de ces hypothèses, nous avons procédé à une série d'expériences.

Nous avons tout d'abord mis en évidence la présence de chlorure dans les solutions de polymère en traitant celles-ci par une faible quantité de nitrate d'argent, les sels de chlorure d'argent ont précipité dans les solutions.

Nous avons ensuite basifié (pH = 8) les solutions de polymères et nous les avons chromatographiées sur colonne séphadex G-25. Le pH des fractions recueillies contenant le polymère a été mesuré et s'est trouvé compris entre 6 et 7. Aucune trace d'ion chlorure n'a pu être décelée dans les solutions après purification.

Ces deux expériences tendaient à montrer que lorsque les solutions de polymère étaient neutralisées par addition de soude, il se formait du chlorure de sodium (éliminé par chromatographie sur colonne séphadex) et non un poly(carboxylate) de sodium, le pH de la solution de polymère après purification ayant été acide.

Nous avons alors admis dans un premier temps, l'existence d'un phénomène de complexation de l'acide chlorhydrique par les fonctions alcool des poly(Tris) sans nous préoccuper de connaître la structure du complexe (s'il existe).

Nous avons donc été amenés à neutraliser nos solutions de polymère après déprotection et avant précipitation dans un contre solvant de façon à éliminer toute probabilité de présence d'acide ou de sel contaminant les différents polymères et leur conférant ce caractère de « polyélectrolyte ». Dans ces conditions, les polymères obtenus n'ont plus eu les mêmes propriétés de solubilité que leurs précurseurs.

Nous avons tenté de savoir comment cette complexation de l'acide chlorhydrique pouvait se produire. Nous avons aussi par la même occasion voulu vérifier si l'eau était réellement un bon solvant pour un homopolymère du THAM comme pourrait le prévoir sa structure polyhydroxylée apte à former de multiples liaisons hydrogène dans l'eau.

Ceci n'est pas en fait une vérité absolue si l'on se réfère aux résultats de Saito *et al.*<sup>150</sup> (cf. chapitre I) qui ont étudié les propriétés en solution aqueuse de différents polyacrylamides hydroxylés de faible masse moléculaire ( $\bar{M}_n < 10000$ ).

Les macromolécules étudiées correspondaient à un polymère du 2-hydroxyéthyl acrylamide, un polymère du THAM et un polymère du *N,N*-di(*N*-[tris(hydroxyméthyl)méthyl]-2-acétamido) acrylamide). Les auteurs ont montré que plus le nombre de fonctions hydroxyles par unité monomère augmentait, plus la solubilité de la macromolécule dans l'eau diminuait.

Ce phénomène était attribué à une diminution de la mobilité des groupements méthylènes adjacents aux fonctions hydroxyles et à une augmentation de la proportion de liaisons hydrogène intramoléculaires. La formation d'interactions intramoléculaires défavorisait les interactions polymère-solvant. L'hydrosolubilité du polymère en était alors réduite.

Dans le but d'obtenir des informations sur le comportement d'un homopoly(Tris) en phase aqueuse nous avons effectué une première série de mesure de viscosité réduite avec un poly(Tris) obtenu après polymérisation du THAM dans l'eau.

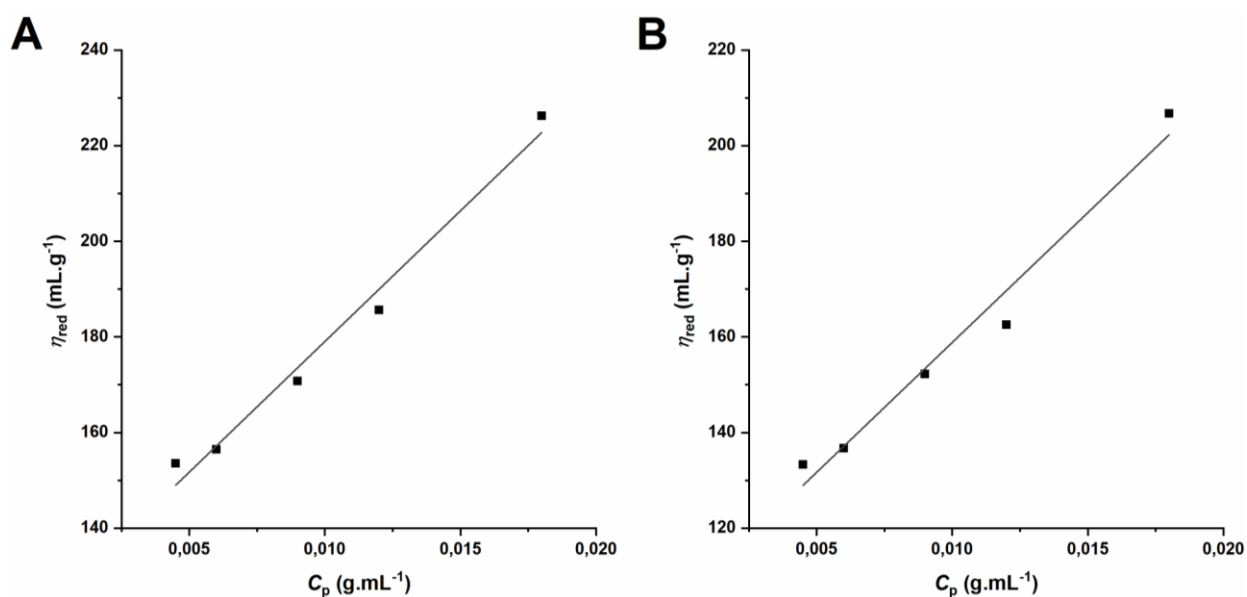
## 2.2) Mesure de la viscosité réduite de l'homopoly(Tris) 117

Le poly(Tris) **117** a formé des solutions aqueuses homogènes ne présentant pas l'aspect de microgel en suspension qui caractérisait les solutions des polyTris **114''** et **115''** obtenus après déprotection des homopolymères **114** et **115**.

Les viscosités observées sont faibles et ont pu être déterminées dans de bonnes conditions (cf. figure 3.27). Nous avons obtenu ainsi des valeurs de  $k_H$  voisines de 0,36 dans l'eau pure et 0,53 dans l'eau salée. L'homopolyTris est donc en bon solvant dans l'eau pure mais en moins bon solvant dans l'eau salée.

Ceci s'est aussi traduit par la baisse de la viscosité intrinsèque (et donc une baisse du rayon hydrodynamique) dans l'eau salée. En effet, nous passons de  $[\eta] = 122 \text{ mL.g}^{-1}$  dans l'eau pure à  $[\eta] = 103 \text{ mL.g}^{-1}$  dans l'eau salée.

*Nous avons donc pu vérifier avec ces expériences d'une part l'homogénéité des solutions aqueuse d'un polyTris (l'eau est un bon solvant pour le polymère du THAM) mais aussi qu'un poly(Tris) adopte un comportement typique d'un polymère non ionique.*



**Figure 3.27** : évolution de la viscosité réduite en fonction de la concentration en polyTris **117**. **A**/Mesures effectuées dans l'eau pure, l'évolution linéaire de la viscosité suit la relation  $\eta_{red} = 5464,3.C_p + 124,38$  ( $R^2 = 0,9828$ ). **B**/Mesures effectuées dans une solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,1 M, l'évolution linéaire de la viscosité suit la relation  $\eta_{red} = 5430,5.C_p + 104,52$  ( $R^2 = 0,9737$ ).

Nous avons ensuite réalisé une mesure de la viscosité réduite dans une solution d'acide chlorhydrique dans laquelle l'acide est présent en des proportions proches de 50 % par rapport aux unités monomères du poly(Tris) (résultats non exposés). Nous avons ainsi pu constater que le polymère se comportait toujours comme un polymère non chargé et nous avons retrouvé des valeurs de viscosité intrinsèque et de coefficient de Huggins ( $[\eta] = 129 \text{ mL.g}^{-1}$ ,  $k_H = 0,25$ ) proches de celles obtenues après analyse dans l'eau pure.

Le poly(Tris) ne semblait donc pas subir d'hydrolyse en solution acide ni même complexer l'acide en solution.

*Si le poly(Tris) a complexé l'acide, la complexation n'a pas eu lieu en solution diluée mais au cours de l'évaporation ou de la lyophilisation de cette même solution, un hydrogel s'est formé et a maintenu une partie de l'acide au sein de son réseau.*

Partant de cette hypothèse, nous avons donc exclu tout procédé d'évaporation de la phase aqueuse devant normalement intervenir au cours de la préparation de nos poly(Tris). Chacun des différents polymères a été par la suite récupéré après précipitation et lavage.



### 3) Etude des propriétés rhéologiques des poly(Tris) obtenus après précipitation des phases aqueuses

Nous avons étudié les propriétés en solution des polymères 114''/5/C<sub>11</sub><sup>\*</sup>, 114''/8/C<sub>11</sub><sup>\*</sup>, 114''/12/C<sub>11</sub><sup>\*</sup> et 114''/3/C<sub>17</sub><sup>\*</sup> obtenus après précipitation des phases aqueuses. Nous avons distingué ces polymères de leurs homologues non précipités par le symbole " \* ".

Après comparaison des résultats obtenus avec les copolymères non précipités à ceux obtenus avec les copolymères purifiés par précipitation, il est apparu que la procédure de récupération des polymères a eu une forte influence sur les propriétés des copolymères étudiés.

En effet, le nouveau polymère 114''/5/C<sub>11</sub><sup>\*</sup> a donné des solutions parfaitement limpides et de forte viscosité alors que précédemment, pour des faibles taux de modification hydrophobe, les solutions du polymère 114''/5/C<sub>11</sub> n'étaient pas vraiment homogènes et étaient peu visqueuses.

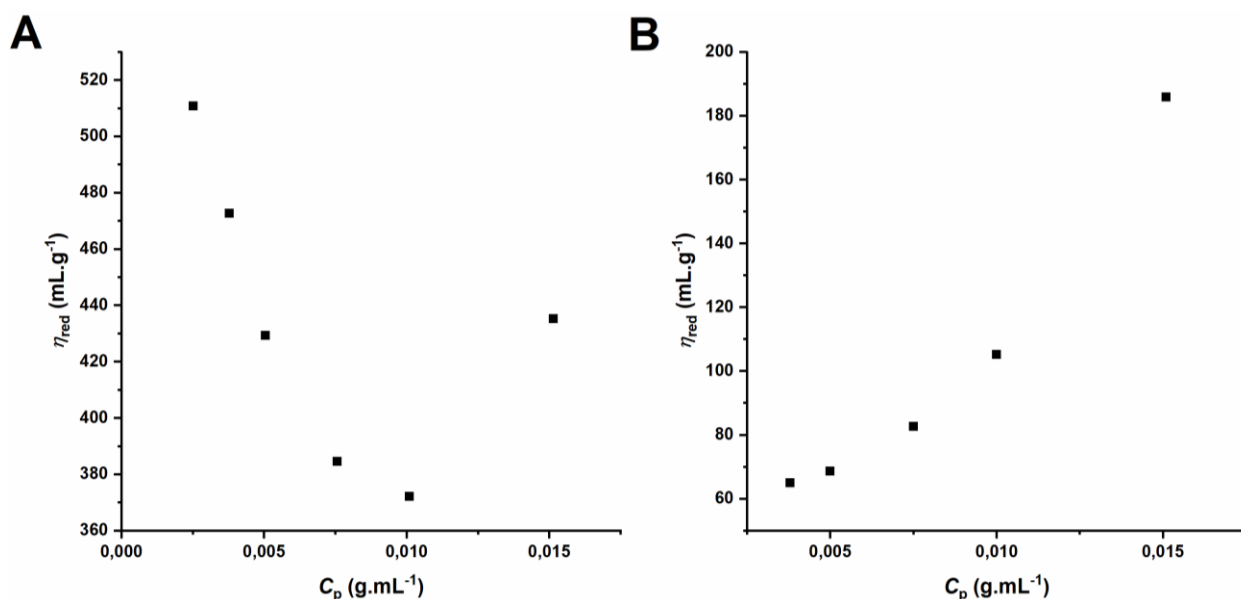
Inversément, le polymère 114''/12/C<sub>11</sub> a donné un gel parfaitement transparent alors que le polymère 114''/12/C<sub>11</sub><sup>\*</sup> a conduit à des solutions turbides. Plus précisément, une solution du polymère 114''/12/C<sub>11</sub><sup>\*</sup> à la concentration de 1,2 % en poids, a séparé de phase en quelques heures et un examen attentif a montré que les solutions plus diluées n'étaient pas non plus parfaitement homogènes (un léger insoluble floconneux était encore visible à 0,3%).

Les études rhéologiques n'ont cependant pas abouti à des résultats conformes aux prévisions, les copolymères ayant une nouvelle fois manifesté un caractère polyélectrolyte en solution, à savoir une forte remontée de la viscosité réduite aux plus faibles concentrations.

La nouvelle procédure de récupération des échantillons ne semblait donc pas éliminer cet effet surprenant qui a encore été observé pour chacun des quatre nouveaux échantillons.

En effet, les mesures de viscosité effectuées sur l'échantillon 114''/5/C<sub>11</sub><sup>\*</sup> dans l'eau pure et en solution saline (0,1M NaCl) ont confirmé que le copolymère adoptait bien un comportement de polyélectrolyte, les valeurs de viscosité (en cp) ayant été trouvées nettement plus faibles (pratiquement d'un facteur 2) en présence de sel (cf. figure 3.28).

Les résultats ont aussi montré que ce copolymère était bien un polymère associatif. En effet, la viscosité réduite n'a pas varié linéairement en fonction de la concentration comme cela aurait été observé dans le cas d'un polyélectrolyte classique placé en solution saline. Nous avons plutôt observé une remontée de la viscosité aux concentrations les plus élevées.



**Figure 3.28** : évolution de la viscosité réduite en fonction de la concentration en polymère 114''/5/C11\* en solution dans l'eau pure (A) et dans une solution de chlorure de sodium à 0,1 M (B).

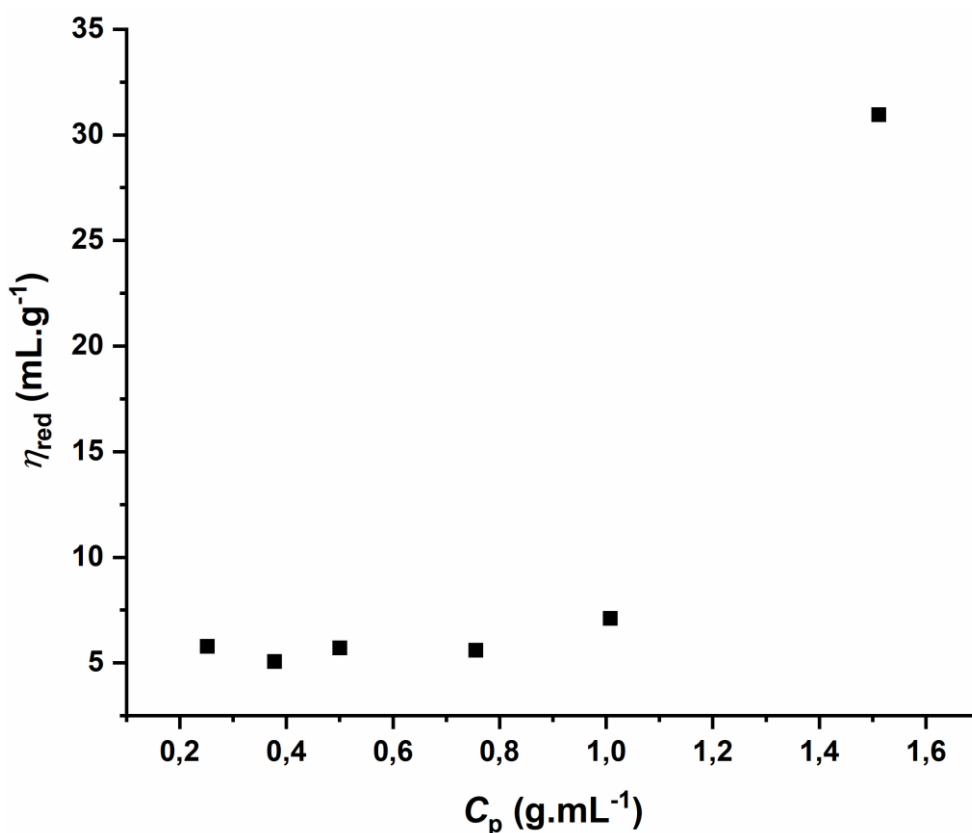
Précisément, la remontée de la courbe aux grandes concentrations ayant intervenu pour une concentration inférieure à l'inverse de la viscosité intrinsèque ( $C_p < \frac{1}{[\eta]}$ ) n'était pas due à des concentrations trop élevées, et marquait le comportement typique d'un polymère impliqué dans un phénomène d'association.

Concernant la valeur de la viscosité intrinsèque, nous ne disposons que de peu de points pour l'estimer ( $\approx 50 \text{ mL.g}^{-1}$ ) avec une bonne précision. Nous n'avons pu, en effet, exploiter les valeurs obtenues pour des domaines de dilution plus importante car les viscosités mesurées devenaient trop faibles.

Nous avons pu observer le caractère particulièrement associatif de certains autres de nos polymères, notamment celui du polymère 114''/3/C17\* pour lequel la viscosité augmentait fortement en fonction de sa concentration (cf. figure 3.29).

Nous avons noté aussi, un comportement particulier de ce polymère aux faibles concentrations. En effet, en régime dilué, la viscosité n'a pas semblé évoluer en fonction de la concentration en polymère. Ce phénomène a déjà été décrit<sup>347</sup> et a été attribué à l'existence de fortes interactions hydrophobes intramoléculaires provoquant une contraction importante de la chaîne macromoléculaire. Ainsi, en régime dilué, le volume hydrodynamique de la macromolécule ne varie plus en fonction de la concentration en polymère et le coefficient de Huggins ( $k_H$ ) est proche

de zéro. Le comportement polyélectrolyte du polymère a été ici masqué par ses propriétés associatives.



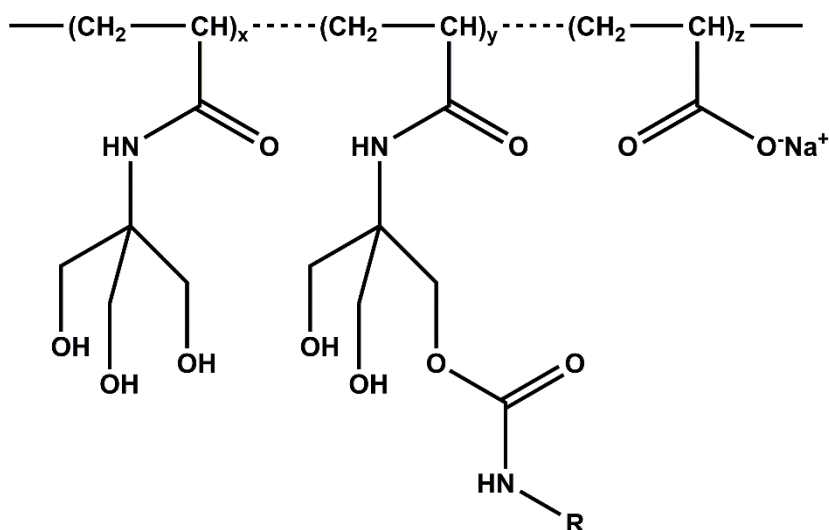
**Figure 3.29** : évolution de la viscosité réduite en fonction de la concentration en polymère 114''/3/C17\*.

Des mesures d'écoulement (viscosité apparente) sont actuellement en cours. Le pouvoir épaississant des polymères 114''/5/C11\* et 114''/3/C17\* observé, nous laissent supposer que les nouvelles macrostructures proposées présentent les propriétés associatives recherchées (notamment le polymère 114''/3/C17\*).

Nous avons ensuite, essayé d'apporter une explication recevable au comportement polyélectrolyte de nos polymères qui ne semblait donc pas dû à une complexation de l'acide en solution.

La seule explication logique que nous avons pu alors retenir, est l'hydrolyse partielle du polymère intervenant durant l'étape de déprotection des groupements cétales. Si ce phénomène d'hydrolyse était bien réel, il n'interviendrait que durant l'étape de déprotection des polymères protégés. Nous avons montré, en effet, qu'un poly(Tris) obtenu par polymérisation du THAM dans l'eau ne subissait pas d'hydrolyse en milieu acide (cf. paragraphe 2.2).

Si nous admettions qu'une partie des liaisons amide est hydrolysée en milieu acide, nous devons donc obtenir, après neutralisation du milieu réactionnel et précipitation de la macromolécule, un *terpolymère* dont la formule est donnée par la figure 3.30 (cf. figure 3.30).



**Figure 3.30** : structure générale supposée de nos copolymères amphiphiles dérivés du Tris.

Nous avons donc procédé à un dosage des ions sodium. Nous avons pu mettre en évidence la présence de 2 à 4 % en masse d'ion sodium suivant les échantillons dosés. Ce pourcentage massique converti en pourcentage molaire par unité monomère évoluait entre 15 et 30 %. Ces valeurs étaient du même ordre que celles trouvées après dosage de l'acidité des formes non neutralisées et non précipitées des polymères.

De plus, un dosage des ions chlorure s'étant révélé, dans tous les cas, négatif, a permis de vérifier l'absence de sel dans le milieu après neutralisation et précipitation du polymère. Les ions sodium dosés sont donc obligatoirement complexés aux fonctions carboxylates obtenues après neutralisation des fonctions acides issues de l'hydrolyse des liaisons amides.

Les copolymères obtenus dont nous avons étudié les propriétés rhéologiques étaient donc des *terpolymères* de l'acide acrylique, du THAM et du THAM doté d'une chaîne grasse (cf. figure 3.30).

#### 4) Conclusion

Nous avons montré que les procédés de lyophilisation ou d'évaporation des solutions aqueuses des poly(Tris) (modifiés ou non) engendraient la formation de fortes liaisons hydrogène intermacromoléculaires au sein de la matrice qui pouvait alors s'apparenter à un hydrogel dans

lequel les interconnexions étaient assurées par l'intermédiaire de ces liaisons hydrogène. Les macrostructures ainsi formées étaient susceptibles de s'hydrater fortement en milieux aqueux pour donner des solutions hétérogènes comparables à des microgels.

Ces phénomènes ont naturellement compromis nos mesures rhéologiques et nous avons, afin de contourner ces différentes difficultés, décidé de ne plus utiliser un quelconque procédé d'évaporation des phases aqueuses. Nous avons alors purifié nos polymères par précipitation.

De simples essais préliminaires ont montré que les nouveaux poly(Tris) ainsi obtenus possédaient des solubilités moins importantes dans l'eau que leurs homologues non précipités alors que les solutions aqueuses formées étaient plus homogènes que celles des homologues non précipités.

Les effets épaississants apparaissaient pour des taux de modification hydrophobe plus faibles qu'autrefois et, en corollaire, l'insolubilité apparaissait plus tôt.

Ce résultat est plus conforme à ce que l'on sait pour d'autres polymères associatifs dont le taux de modification hydrophobe optimum est typiquement de quelques pourcents (< 10%). En effet, un caractère hydrophobe trop fort favorise l'insolubilité au détriment de l'associativité.

Nous avons constaté aussi qu'il se produisait une hydrolyse partielle des liaisons amide des polymères en phase aqueuse acide. Ces phénomènes ne semblaient intervenir que lorsque les polymères initialement protégés étaient soumis à l'hydrolyse des groupements protecteurs. Un homopolyTris obtenu par polymérisation du THAM ne subissait pas ces hydrolyses en milieu acide.

Nous ignorons pour le moment les causes étant à l'origine de l'instabilité des liaisons amides en milieu acide. Ces phénomènes devront faire l'objet d'études approfondies.

Dans l'immédiat, il apparaît nécessaire d'élaborer une nouvelle stratégie de synthèse prenant en compte l'instabilité relative des polyTris en milieu acide et préservant l'intégralité des polymères. Les propriétés rhéologiques des nouveaux polymères synthétisés suivant cette nouvelle voie, devraient très probablement correspondre à nos attentes.

## *IV) CONCLUSION*

Dans le but d'élaborer de nouveaux polymères amphiphiles associatifs dérivés du THAM, nous avons choisi de procéder à la modification hydrophobe d'un homopolymère précurseur. La synthèse de l'homopolymère précurseur a été effectuée en deux étapes.

La première a consisté à synthétiser un homopolymère parfaitement organosoluble en polymérisant le THAM isopropylidène acétylé en phase organique. Nous avons déterminé les conditions permettant d'assurer le contrôle de la masse de l'homopolymère par simple modulation des concentrations initiales en amorceur.

La deuxième étape correspondant à une méthanolyse des fonctions acétyle a conduit à un homopolymère du THAM isopropylidène présentant une fonction hydroxyle libre par unité monomère. Nous avons par la suite procédé à la modification hydrophobe de l'homopolymère en faisant réagir, en différentes proportions, des isocyanates d'alkyle de différentes longueurs de chaînes hydrocarbonées (douze ou dix-sept atomes de carbone) sur les fonctions hydroxyle libres.

Enfin l'hydrolyse acide des fonctions cétal a permis d'obtenir les polymères amphiphiles attendus.

Les études des propriétés rhéologiques ont montré que les processus d'évaporation des solutions aqueuses de polyTris conduisaient à la formation de fortes liaisons hydrogène intermacromoléculaires. Le réseau macromoléculaire ainsi constitué conduisait à des systèmes peu homogènes en phase aqueuse. Ces différents problèmes ont contribué à rendre particulièrement inexploitable les résultats obtenus lors des études des propriétés rhéologiques de nos polymères et nous ont encouragés à apporter certaines modifications à la méthode de synthèse utilisée.

Nous avons montré qu'en neutralisant les phases aqueuses acides et en précipitant les polymères nous pouvions disposer d'une macrostructure amphiphile dont les propriétés en solution aqueuse étaient parfaitement caractérisables.

Nous avons montré aussi que les poly(Tris) obtenus subissaient une hydrolyse partielle des liaisons amides durant les traitements en solutions acides. Ces problèmes d'instabilité semblaient liés à la méthode de préparation du polymère. Nous devons donc à l'avenir utiliser une autre méthode de synthèse permettant d'éviter tout phénomène d'hydrolyse.

Des travaux en cours visant à améliorer d'une part, les propriétés épaississantes de nos poly(Tris), et d'autre part, à déterminer les raisons à l'origine des phénomènes d'hydrolyse, devraient aboutir. Les structures proposées destinées à satisfaire les critères de systèmes macromoléculaires hydrosolubles amphiphiles associatifs laisseraient entrevoir, dans le cas de résultats positifs, de nombreuses perspectives quant à l'élaboration de nouveaux systèmes moléculaires vectoriels dérivés du THAM.

# **CONCLUSION GÉNÉRALE**



L'ensemble du travail présenté dans ce mémoire a pour fil conducteur l'étude et l'utilisation d'un monomère polymérisable polyfonctionnalisé : le tris(hydroxyméthyl) acrylamidométhane ou THAM.

Dans une première partie de cette étude nous nous sommes intéressés aux constantes cinétiques de polymérisation radicalaire du THAM et de plusieurs de ses dérivés afin d'essayer d'interpréter au mieux la réactivité anormalement élevée de ce monomère.

Une première série de mesures effectuées sur des substrats comportant une ou plusieurs fonctions hydroxyle protégées a permis de montrer que la vitesse de polymérisation des monomères dépend d'une part du nombre de fonctions hydroxyle libres capables d'établir des liaisons hydrogène intermoléculaires, d'autre part de la structure des groupements protecteurs introduits.

Les associations intermoléculaires favorisent la formation d'agrégats en solution et permettent ainsi d'accroître anormalement la vitesse de polymérisation de ces monomères. L'encombrement stérique quant à lui tend à ralentir la vitesse de réaction si aucun élément constitutif des groupes protecteurs utilisés ne crée ici de nouvelles associations.

Une deuxième série de mesures effectuées avec des dérivés *N*-méthylés du THAM a révélé que contrairement à la plupart des acrylamides, le degré de substitution de la liaison amide n'avait qu'une faible influence sur la vitesse de polymérisation, celle-ci étant fonction essentiellement des liaisons hydrogène existant entre les motifs Tris. Ainsi, la liaison amide n'interviendrait pas dans la formation des associations intermoléculaires, et seules participeraient efficacement les fonctions hydroxyles.

Nous avons par la suite procédé à la synthèse d'amphipols non ioniques dérivés du THAM susceptibles d'assurer le maintien des protéines hydrophobes en solution aqueuse.

Compte tenu des résultats précédemment acquis par Tribet *et al.*<sup>7-9</sup> avec différentes classes de polymères amphiphiles, il nous a paru opportun de tester l'efficacité, dans ce contexte, des télomères amphiphiles non ioniques dérivés du THAM.

Ces amphipols neutres ont été obtenus soit après cotélomérisation de monomères protégés organosolubles, suivie d'une hydrolyse douce des groupes protecteurs, soit après modification chimique d'un homotélomère précurseur.

Les deux méthodes nous ont permis d'obtenir dans de bonnes conditions les structures attendues. Nous avons pu vérifier cependant que le contrôle de la balance hydrophile-lipophile de la macromolécule était plus aisé lorsque la technique de cotélomérisation de monomères acétylés était utilisée. Cette méthode s'est donc révélée la mieux adaptée à la préparation de macromolécules amphiphiles dérivées du Tris destinées à des applications biologiques.

Les essais biologiques effectués sur deux protéines transmembranaires, le cytochrome *b6f* et la bactériorodopsine, ont révélé que les cotélomères amphiphiles proposés formaient des associations très stables avec ces protéines. Celles-ci ont pu être maintenues en solution aqueuse sous leur forme native pendant plusieurs semaines. Nous avons pu également montrer que l'aptitude des différents cotélomères à former ce type d'association dépendait essentiellement de la HLB de la macromolécule.

L'analyse Q.E.L.S. des solutions aqueuses de différents amphipols non ioniques a mis en évidence l'existence de deux populations d'agrégats. Ce phénomène traduit un comportement somme toute normal des cotélomères en solution aqueuse, la distribution bimodale d'une population d'agrégats étant en effet fréquemment observée pour la plupart des macrostructures amphiphiles non ioniques.

Cette distribution résulte de la formation d'interactions intermoléculaires supplémentaires. Ce phénomène n'est pas observé avec des structures amphiphiles chargées, car il est largement compromis par les interactions électrostatiques répulsives.

Ces mêmes analyses ont révélé que les tailles des associations amphipols non ioniques-protéine étaient beaucoup plus importantes que celles des complexes amphipols chargés-protéine. Cet accroissement de taille pouvait être imputé aux fortes liaisons hydrogène existant entre les différents motifs Tris, celles-ci aurait favorisé soit l'agrégation de plusieurs particules amphipol-protéine associées, soit la formation d'une couche plus épaisse de polymère entourant la protéine.

Par ailleurs, il n'était pas exclu qu'une forte solvation des motifs Tris pouvait introduire un certain encombrement et donc des interactions répulsives. Il était donc possible que cette solvation ait contribué à ce que la distance séparant la couche périphérique de télomères de la protéine soit plus importante.

Enfin nous avons préparé une nouvelle classe de polymères associatifs hydrosolubles dérivés du THAM. Ces polymères ont été obtenus après modification hydrophobe de polymères

précurseurs, cette méthode permettant de disposer d'une homogénéité en masse des différents polymères obtenus.

Nous nous sommes intéressés aux propriétés rhéologiques de ces macrostructures amphiphiles et nous avons pu montrer que tout procédé d'évaporation d'une solution aqueuse d'un poly(Tris) aboutissait à la formation d'un hydrogel physique où les connections étaient assurées par de fortes liaisons hydrogène existant entre les motifs Tris.

Nous avons montré aussi que les poly(Tris) préparés subissaient une hydrolyse partielle des liaisons amide, le polymère se comportant alors comme un polyélectrolyte. Nous avons ainsi pu mettre en évidence le fait que les propriétés rhéologiques et la solubilité en phase aqueuse dépendaient du taux de greffage des chaînes hydrophobes sur le polymère ; mais aussi de la méthode de purification utilisée, le polymère étant récupéré, soit après évaporation de la phase aqueuse, soit après précipitation de ce dernier.

Les polymères obtenus par précipitation des phases aqueuses semblaient présenter des propriétés rhéologiques intéressantes. Les investigations menées dans ces domaines n'ont été que partielles, mais certains des résultats obtenus restent encourageants et nous permettent de penser que les nouvelles structures proposées révéleront dans un avenir proche les propriétés recherchées. Nous devons alors définir une méthode de synthèse des poly(Tris) amphiphiles associatifs mieux adaptée.

En définitive, nous avons pu montrer que des télomères amphiphiles dérivés du Tris de faibles masses moléculaires pouvaient stabiliser une protéine hydrophobe en milieu aqueux durant plusieurs semaines. Nous espérons améliorer les résultats en dotant le poly(Tris) de chaînes latérales non plus perhydrocarbonées, mais fluorohydrocarbonées.

La chaîne fluorée hydrophobe en question possède une extrémité éthyle hydrogénée pouvant s'adsorber à la surface des sites hydrophobes de la protéine. Les parties fluorées vont s'associer entre elles par l'intermédiaire d'interactions fluorophiles. Les agrégats ainsi constitués devraient se révéler très stables.

Nous n'avons pu étudier que partiellement les propriétés physicochimiques de poly(Tris) amphiphiles de masses moléculaires plus élevées. Les premiers résultats obtenus nous encouragent cependant à poursuivre nos études sur la préparation de structures de type micelles polymères

multicompartimentales dérivées du Tris. Nous disposerions ainsi d'un nouveau système macromoléculaire vectoriel susceptible d'être plurifonctionnalisé.

# ***PARTIE EXPÉRIMENTALE***

## *D) MÉTHODES GÉNÉRALES*

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton, du carbone<sup>13</sup> et du Fluor<sup>19</sup> ont été enregistrés sur un appareil BRUCKER AC 250. Les abréviations suivantes expriment la multiplicité des signaux : *s* (singulet), *d* (doublet), *t* (triplet), *q* (quadruplet), *dd* (doublet dédoublé), *m* (multiplet non analysable).

Les points de fusion ont été mesurés à l'aide d'un appareil Electrothermal modèle 9100 et sont donnés non corrigés.

Les mesures de pouvoir rotatoire ont été effectuées à l'aide d'un polarimètre PERKIN-ELMER (modèle MC 241) en utilisant une cuve de 1 décimètre de trajet optique.

Les ultrasons sont appliqués à l'aide d'un appareil BRANSONIC (modèle B 30) ou VIBRACELL muni d'une sonde de 7 mm ou de 13 mm.

Les chromatographies par affinité ont été effectuées sur colonne de gel de silice Merck F60. Les chromatographies par exclusion de taille ont été réalisées avec un gel séphadex LH 20 ou G25. Les chromatographies sur couche mince sont faites sur plaque de silice Merk 60 F<sub>254</sub> et révélées par la lumière ultraviolette (254 nm) ou par un spray d'une solution éthanolique d'acide sulfurique à 5 % (ou de ninhydrine à 5 %) suivi d'un chauffage à 150 °C.

Les solvants ont été redistillés avant utilisation. Les agents desséchants utilisés sont :

- le chlorure de calcium pour le cyclohexane et l'acétate d'éthyle ;
- l'hydrure de calcium pour l'acétonitrile et le dichlorométhane ;
- le sulfate de calcium pour l'acétone ;
- l'hydroxyde de sodium pour la pyridine ;
- le sodium pour le méthanol, l'éthanol, le THF (en présence de benzophénone) et le toluène (en présence de benzophénone).

Les mesures Q.E.L.S. ont été réalisées à l'aide d'un LASER d'argon ionisé (SP2020, Spectra Physics, CA, 3 W) de longueur d'onde  $\lambda = 541$  nm. La détection et la photomultiplication sont assurées par un appareil PCS5 (Malvern Instruments) monté sur un bras rotor PCS 100 (Malvern Instruments).

Les mesures réfractométriques ont été réalisées avec un réfractomètre différentiel Brice-Phoenix muni d'un laser dont la longueur d'onde est égale à 632,8 nm.

Les mesures de diffusion de la lumière (DDL) ont été effectuées avec un appareil AMTEC MM1 SM 200 muni d'un laser de longueur d'onde 632,8 nm polarisé verticalement. L'appareil est piloté par ordinateur et couvre une gamme d'angles variant entre 30 et 150°.

Les mesures rhéologiques à gradient de vitesse de cisaillement imposé ont été effectuées en utilisant un viscosimètre Contraves LS30.

Les mesures rhéologiques à contrainte de cisaillement imposée ont été effectuées en utilisant un viscosimètre Haake RS100. La géométrie utilisée est de type cône-plan et d'angle 1°.

Les analyses de masses molaires effectuées par chromatographie par exclusion stérique (SEC) ont nécessité l'utilisation de cinq colonnes (seuil d'exclusion  $M = 10^3, 10^4, 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  + 2 mixtes) Micro-styragel (Polymer Laboratories). L'appareil est muni d'un injecteur automatique Waters 717 et la détection est réalisée à l'aide d'un détecteur réfractométrique : Shimadzu RID-6A ou d'un détecteur DDL (multiangles) Wyatt Tech. (longueur d'onde : 632,8 nm, 17 angles). Le traitement des données est assuré par le logiciel Astra (Wyatt).

## II) SYNTHÈSE DES MONOMÈRES

### N-(1,3-dihydroxy-2-méthylpropan-2-yl)acrylamide (BHAM) 1

Dans un ballon tricol de 500 mL, 10 g (95 mmoles) de 2-amino-2-méthylpropane-1,3-diol sont dissous dans 140 mL de méthanol, le milieu est refroidi à 0 °C. 12,9 g (142,5 mmoles) de chlorure d'acryloyle et 145 mL de potasse méthanolique 1N sont ajoutés goutte à goutte de façon à maintenir le pH à 8. En fin d'addition le milieu réactionnel est ramené à température ambiante et laissé sous agitation durant une heure (la réaction est suivie en CCM éluant = AcOEt). Le milieu réactionnel est ensuite filtré de façon à éliminer les sels ayant précipité et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/MeOH 9,8/0,2. Après recristallisation du produit dans AcOEt/MeOH 9/1 et quelques millilitres d'éther le BHAM **1** (9,1 g, rendement 60 %) est obtenu sous forme de cristaux blancs.

F = 82,7-83,3°C

**RMN <sup>1</sup>H** (DMSO)  $\delta$ (ppm) = 7,46 (1H, s, NH); 6,33 (1H, dd, =CH); 6,01 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 5,52 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 4,83 (2H, t, CH<sub>2</sub>OH); 3,49 (4H, t, CH<sub>2</sub>OH); 1,16 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (DMSO)  $\delta$ (ppm) = 164,84 (CONH); 132,57 (CH<sub>2</sub>=); 124,69 (CH=); 63,81 (CH<sub>2</sub>OH); 58,61 (CNH); 18,72 (CH<sub>3</sub>).

### N-(1-hydroxy-2-méthylpropan-2-yl)acrylamide (MAP) 2

Dans un ballon tricol de 500 ml, 10,2 g (114 mmoles) de 2-amino-2-méthylpropan-1-ol sont dissous dans 100 mL de méthanol refroidis à 0°C. 15,5 g (171 mmoles) de chlorure d'acryloyle et 100 ml de potasse méthanolique 0,171 N sont ajoutés goutte à goutte au milieu réactionnel en maintenant la température à 0 °C. Lorsque la totalité des réactifs a été additionnée le mélange réactionnel est ramené à température ambiante et laissé sous agitation durant 1h (réaction suivie en CCM éluant = AcOEt). Les sels sont éliminés par filtration et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'acétate d'éthyle pris comme éluant. Après recristallisation dans l'éther, le MAP **2** (8,2 g, 50 %) est obtenu sous forme d'aiguilles blanches.

F = 83-84°C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = 6,4 (1H, s, NH); 6,27 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 6,12 (1H, dd, =CH); 5,64 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 5,34 (1H, t, CH<sub>2</sub>OH); 3,6 (4H, d, CH<sub>2</sub>OH); 1,34 (6H, s, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = 166,94 (CONH); 131,71 (CH<sub>2</sub>=); 127,5 (CH=); 71,24 (CH<sub>2</sub>OH); 56,9 (CNH); 25,22 (CH<sub>3</sub>).



### **5-acrylamido-5-hydroxyméthyl-2,2-diméthyl-1,3-dioxane (THAM isopropyldène) 3**

Le THAM (20 g, 114 mmoles) est mis en suspension dans un mélange de 150 mL d'acétonitrile fraîchement distillé et 16 ml de diméthoxypropane (1,1 équivalent). Après addition de 100 mg d'APTS, le mélange est agité à température ambiante pendant une heure. Le catalyseur acide est ensuite neutralisé par addition de TEA et le THAM n'ayant pas réagi est éliminé par filtration. Le solvant est évaporé sous pression réduite, puis le brut est filtré sur silice avec l'éluant AcOEt/hexane/TEA 9/1/0,01, puis recristallisé dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexane. Le THAM isopropyldène **3** (20 g, 81,6 %) est obtenu sous forme de cristaux cubiques blancs.

F = 92°C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,42 (1H, *s*, NH); 6,34 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,2 (1H, *dd*, CH=); 5,73 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,07 (1H, *t*, CH<sub>2</sub>-OH); 3,89 (4H, *m*, CH<sub>2</sub>O); 3,73 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>OH); 1,46 (6H, *2s*, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 165,58 (CONH); 129,81 (CH<sub>2</sub>=); 126,6 (CH=); 98,04 (C(Me)<sub>2</sub>); 63,42 (CH<sub>2</sub>O ou CH<sub>2</sub>OH); 63,29 (CH<sub>2</sub>O ou CH<sub>2</sub>OH); 54,3 (CNH); 26,81, 18,25 (CH<sub>3</sub>).

### **5-acrylamido-5-acétoxyméthyl-2,2-diméthyl-1,3-dioxane 4**

Dans 100 mL d'un mélange anhydride acétique/pyridine 1/1 refroidi à 0 °C sont dissous 20 g (93 mmoles) de THAM isopropyldène **3**. L'agitation est poursuivie durant 15 minutes à froid, puis le milieu réactionnel est ramené à température ambiante. Après 12 h de réaction le milieu réactionnel est versé dans 200 mL d'eau glacée sous forte agitation puis la phase aqueuse est extraite avec 200 ml de dichlorométhane. La phase organique est lavée successivement avec 3 x 100 mL d'une solution saturée en hydrogénocarbonate de sodium, 200 ml d'eau, 2 x 100 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 1N, 100 mL d'eau, puis elle est séchée sur sulfate de sodium, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le produit est recristallisé une première fois dans AcOEt/Hexane, puis dans l'éther. Le composé **4** (20 g, 80 %) est obtenu sous forme d'aiguilles blanches.

F = 95-96°C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,29 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,1 (2H, *m*, CH=, NH); 5,68 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,45 (4H, *m*, CH<sub>2</sub>O équatoriaux de l'isopropyldène, CH<sub>2</sub>OAc); 3,63 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>O axiaux de l'isopropyldène); 2,13 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>CO); 1,54, 1,43 (6H, *2s*, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 172,17 (CH<sub>3</sub>CO); 166,32 (CONH); 131,72 (CH<sub>2</sub>=); 127,50 (CH=); 98,5 (C(Me)<sub>2</sub>); 64,49; 62,66 (CH<sub>2</sub>O iso, CH<sub>2</sub>OAc); 53,90 (CNH); 24,65 (CH<sub>3</sub>CO); 23,85; 21,43 (CH<sub>3</sub>).

### **Acétate de 2-acrylamido-3-hydroxy-2-(hydroxyméthyl)propyle (THAM monoOAc) 5**

5,14 g (20 mmoles) de THAM isopropylidène acétylé **4** sont dissous dans 200 mL de dichlorométhane et 30 g de montmorillonite K10 (1,5 g/mmmole de produit à déprotéger) sont mis en suspension dans le milieu réactionnel soumis à forte agitation durant 12 heures. En fin de réaction (suivie sur CCM éluant = AcOEt), le milieu réactionnel est filtré sur Célite puis le gâteau de montmorillonite est repris et extrait avec 200 mL de méthanol. Le solvant d'extraction est filtré sur célite puis les filtrats sont joints et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/MeOH 99/1 et après recristallisation dans MeOH/AcOEt le composé **5** (3,9 g, 90 %) est obtenu sous forme de cristaux cubiques blancs.

F = 70-71 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,88 (1H, *s*, NH); 6,25 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>=, CH=); 5,69 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,92 (2H, *s*, 2CH<sub>2</sub>OH); 4,32 (2H, *s*, CH<sub>2</sub>OAc); 3,68 (4H, *2dd*, 2CH<sub>2</sub>OH); 2,05 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>CO).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 172,62 (CH<sub>3</sub>CO); 167,39 (CONH); 131,1 (CH<sub>2</sub>=); 128,69 (CH=); 63,46 (CH<sub>2</sub>OAc); 63,14 (CH<sub>2</sub>OH); 62,23 (CNH); 21,52 (CH<sub>3</sub>CO).

### **Diacétate de 2-acrylamido-2-(hydroxyméthyl)propane-1,3-diyle (THAM diOAc) 6**

#### **Synthèse effectuée à partir du composé 10**

722 mg (1,44 mmoles) de THAM tritylé diacétylé **10** sont dissous dans 35 mL de dichlorométhane et 4,32 g (3g/mmoles) de montmorillonite K10 sont ajoutés au mélange réactionnel. La réaction est suivie en CCM avec l'éluant AcOEt/Hexane 6/4. Après 12 h d'agitation le milieu réactionnel est filtré sur Célite puis la montmorillonite est extraite avec 50 mL de méthanol et filtrée de nouveau sur Célite. L'opération est effectuée une seconde fois, puis les filtrats sont évaporés sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice par gradient d'éluant avec les éluants AcOEt/Hexane 8/2 et AcOEt/Hexane 9/1. Le produit **6** obtenu (0,36 g, 96,5 %) est, soit très hygroscopique, soit fusible à température ambiante. Il est possible de le conserver seulement quelques secondes à l'état solide après trituration dans l'éther ou précipitation dans AcOEt/Hexane.

#### **Synthèse directe**

4,2 g (24 mmoles) de THAM et 5,58 g (20 mmoles) de chlorure de trityle sont dissous dans 100 mL de pyridine distillée. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante durant 16 heures, puis refroidi à 0°C et 40 mL d'anhydride acétique sont ajoutés goutte à goutte. Lorsque la totalité du réactif a été ajoutée le mélange réactionnel est ramené à température ambiante et laissé sous agitation durant 12 h puis versé dans 200 mL d'eau glacée sous forte agitation. La phase

aqueuse est extraite avec 2 x 150 mL de dichlorométhane et la phase organique est lavée successivement avec 200 mL d'une solution saturée en bicarbonate est séchée sur sulfate de sodium, puis filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Après précipitation à froid des différents produits dans AcOEt/Hexane, 9 g d'une poudre blanche sont obtenus. La totalité de la poudre est dissoute dans 300 mL de dichlorométhane auxquels sont ajoutés 48,2 g de montmorillonite K10. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation mécanique durant 12 heures, puis il est filtré sur Célite. La montmorillonite est extraite avec 2 x 200 mL de méthanol et, après filtration, les filtrats sont joints et évaporés sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice de la manière décrite précédemment. Le produit **6** (2,1 g, 40 %) est obtenu sous forme de gel.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,33 (1H, *s*, NH); 6,23 (1H, *d*, CH<sub>2</sub>=); 6,15 (1H, *dd*, CH=); 5,63 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,58 (1H, *s*, CH<sub>2</sub>OH); 4,38 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>OAc); 4,19 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>OAc); 3,76 (2H, *s*, CH<sub>2</sub>OH); 2,03 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>CO).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 171,55 (CH<sub>3</sub>C=O); 167,05 (NHCO du Tris); 131,21 (CH<sub>2</sub>=); 128,38 (CH=); 63,92 (CH<sub>2</sub>-OAc); 63,76 (CH<sub>2</sub>OH); 60,97 (CNH); 21,37 (CH<sub>3</sub>CO).

#### **Diacétate de 2-(acétoxyméthyl)-2-acrylamidopropane-1,3-diyle (THAM triOAc) 7**

100 mL d'un mélange anhydride acétique/pyridine 50/50 dans un ballon de 250 mL sont agités dix minutes à froid (eau + glace). Après ajout du THAM (10 g, 57 mmoles), le milieu réactionnel est ramené à température ambiante puis laissé sous agitation durant douze heures. Le brut est versé dans 200 mL d'eau glacée sous agitation et la phase aqueuse est extraite une fois avec 200 mL de dichlorométhane. Après traitements usuels, la phase organique est séchée sur sulfate de sodium puis filtrée et concentrée. Deux cristallisations successives dans AcOEt/εHexane permettent d'obtenir le composé **7** (13 g, 75 %) sous forme d'aiguilles blanches.

F = 96,8 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,2 (1H, *s*, NH); 6,03-6,14 (2H, 2 *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,48 (6H, *s*, CH<sub>2</sub>-OAc); 2,09 (9H, *s*, CH<sub>3</sub>CO).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 170,69 (CH<sub>3</sub>C=O); 165,62 (NHCO); 130,9 (CH<sub>2</sub>=); 127,14 (-CH=); 62,73 (CH<sub>2</sub>-O); 58,27 (C-NH); 20,76 (CH<sub>3</sub>CO).

#### **N-(1,3-dihydroxy-2-((trityloxy)méthyl)propan-2-yl)acrylamide (THAM monoOTr) 8**

1,75 g (10 mmoles) de THAM et 2,79 g (10 mmoles) de chlorure de trityle sont dissous dans 50 mL de pyridine distillée à température ambiante. Après 16 heures d'agitation le milieu réactionnel est versé dans 100 mL d'eau et la phase aqueuse est extraite avec 2 x 50 mL de dichlorométhane.

La phase organique est lavée avec 3 x 50 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 1N puis avec 100 mL d'eau. Elle est ensuite séchée sur sulfate de sodium puis filtrée et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de colonne de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 9/1 et après recristallisation dans AcOEt/Hexane, le produit **8** (1,67 g, 40 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

F = 153-154 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 7,18-7,36 (15H, *m*, H aromatiques); 6,32 (1H, *s*, NH); 6,26 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,04 (1H, *dd*, CH=); 5,63 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,03 (2H, *t*, CH<sub>2</sub>-OH); 3,64 (2H, *dd*, CH<sub>2</sub>OH); 3,44 (2H, *dd*, CH<sub>2</sub>OH); 3,31 (2H, *s*, CH<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 167,16 (CONH); 144,11 (CH<sub>2</sub>=); 143,87 (CH=); 129,14, 128,82 ; 128,58 ; 128,12 ; 127,83 (C aromatiques); 88,14 (C(Φ)<sub>3</sub>); 64,62 (CH<sub>2</sub>O ou CH<sub>2</sub>OH); 64,12 (CH<sub>2</sub>O ou CH<sub>2</sub>OH); 62,28 (CNH).

#### **N-(1-hydroxy-3-(trityloxy)-2-((trityloxy)methyl)propan-2-yl)acrylamide (THAM(OTr)<sub>2</sub>) 9**

Ce produit est isolé lors de la chromatographie précédente. Après recristallisation dans AcOEt/εHexane, il est obtenu (1,4 g, 21 %) sous forme de poudre blanche.

F = 99-100 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 7,20-7,43 (30H, *m*, H aromatiques); 6,44 (1H, *s*, NH); 6,3 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,1 (1H, *dd*, CH=); 5,72 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,1 (2H, *t*, CH<sub>2</sub>-OH); 3,72 (2H, *dd*, CH<sub>2</sub>OH); 3,59 (2H, *dd*, CH<sub>2</sub>OH); 3,39 (2H, *s*, CH<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 167,12 (CONH); 143,86 (CH<sub>2</sub>=); 131,4 (CH=); 129,36 ; 129,13; 128,98 ; 128,92 ; 128,8 ; 128,57 ; 128,1 (C aromatiques); 88,12 (C(Ph)<sub>3</sub>); 64,63 (CH<sub>2</sub>O ou CH<sub>2</sub>OH); 64,1 (CH<sub>2</sub>O ou CH<sub>2</sub>OH); 62,26 (CNH).

#### **Diacétate de 2-acrylamido-2-((trityloxy)methyl)propane-1,3-diyle (THAMOTr(OAc)<sub>2</sub>) 10**

950 mg (2,27 mmoles) de THAMOTr **8** sont dissous à froid (0 °C) dans 15 mL d'un mélange anhydre acétique/pyridine puis après 10 minutes d'agitation à 0 °C le milieu réactionnel est ramené à température ambiante. Après 16 heures d'agitation le mélange réactionnel est versé dans 80 mL d'eau glacée qui sont extrait ensuite avec 2 x 50 ml de chlorure de méthylène. La phase organique est lavée avec 2 x 50 mL d'une solution saturée en hydrogénocarbonate de sodium puis 50 mL d'eau puis 50 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 1N puis 50 mL d'eau. Après séchage sur sulfate de sodium et évaporation du solvant sous pression réduite, le produit est cristallisé dans un

mélange AcOEt/Hexane. Le composé **10** (0,772 g, 80,3 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

F = 181,8-182,6°C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 7,17-7,36 (15H, *m*, H aromatiques); 6,11 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,88 (1H, *dd*, CH=); 5,73 (1H, *s*, NH); 5,53 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,46 (4H, *m*, CH<sub>2</sub>-OAc); 3,4 (2H, *s*, CH<sub>2</sub>OTr); 1,89 (6H, *s*, CH<sub>3</sub>CO).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 171,3 (CH<sub>3</sub>C=O); 165,9 (CONH); 143,95 (CH<sub>2</sub>=); 131,86 (CH=); 129,27 ; 128,64 ; 127,97 ; 127,23 (C aromatiques); 87,77 (C(Ph)<sub>3</sub>); 63,72 (CH<sub>2</sub>OAc); 62,05 (CH<sub>2</sub>OTr); 59,63 (CNH); 21,38 (CH<sub>3</sub>CO).

### **N-(1,3-dihydroxy-2-(((tétrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)méthyl)propan-2-yl)acrylamide (THAMOTHP) 11**

Voie de synthèse n°1 :

10 g (57 mmoles) de THAM et 200 mg d'APTS sont dissous dans 50 ml de DMF fraîchement distillé. 5,2 ml (57 mmoles) de dihydropyrane sont alors ajoutés goutte à goutte au milieu réactionnel. Au bout de 20 heures, la réaction est arrêtée par addition de 200 mg d'hydrogénocarbonate de sodium. Le DMF est évaporé sous vide et l'huile résiduelle est repris dans l'eau. La phase aqueuse est extraite avec 2 x 100 mL de dichlorométhane. Après séchage de la phase organique sur sulfate de sodium et évaporation du solvant sous pression réduite, le brut est purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt pur. Après recristallisation dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt, le produit **11** (4,5 g, 40 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

Voie de synthèse n°2 :

La totalité (1,346 g, 4,5 mmoles) du THAM monoOAc monoOTHP **14** est dissoute dans 40 ml de méthanol en présence de 100 mg de méthylate de sodium. Après 2 h d'agitation le produit de départ a totalement disparu. Le milieu réactionnel est neutralisé avec de la résine IRC 50 puis après filtration et évaporation du solvant sous pression réduite, le brut est recristallisé dans un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt. Le produit **11** (1 g, 34,5 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

F = 112-113 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,76 (1H, *s*, NH); 6,31 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,13 (1H, *dd*, =CH); 5,71 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,6 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>OH); 4,54 (1H, *m*, O-CH-O); 4,15 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>OH); 3,7-3,9 (5H, *m*, CH<sub>2</sub>O du THP H équatorial, CH<sub>2</sub>OTHP, CH<sub>2</sub>OH); 3,45-3,61 (3H, *m*, CH<sub>2</sub>O du THP H axial, CH<sub>2</sub>OH); 1,8 ; 1,55 (2H, 4H, *m*, -CH<sub>2</sub>- du THP).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 167,32 (CONH); 131,47 (CH<sub>2</sub>=); 127,98 (CH=); 101,23 (C anomère : O-C-O); 69,14 (CH<sub>2</sub>O du THP); 64,65; 64,51; 63,87 (CH<sub>2</sub>OTHP, CH<sub>2</sub>OH); 61,9 (CNH); 31,34; 25,76; 21,03 (-CH<sub>2</sub>-).

**N-[1-hydroxy-3-((tétrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(((tétrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-méthyl)propan-2-yl]acrylamide **12****

**Voie de synthèse n°1 :**

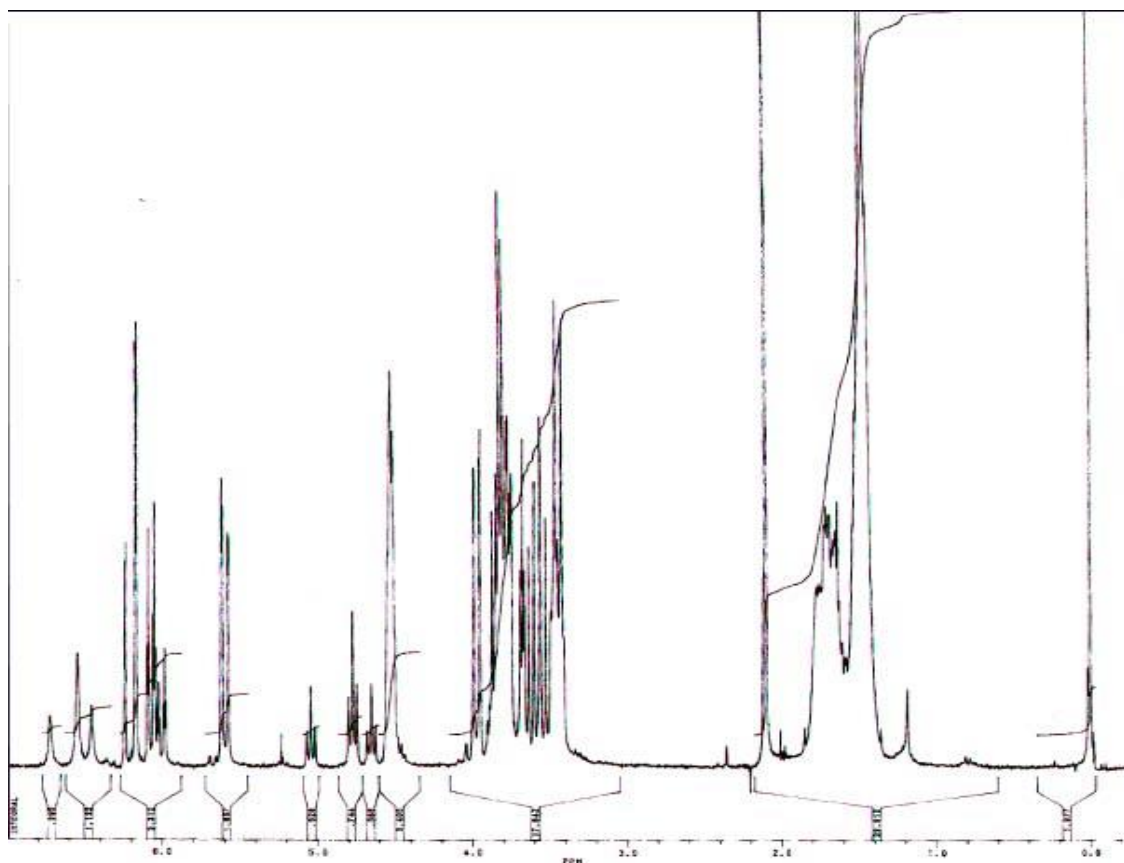
3 g (7,8 mmoles) de THAM ditétrahydropyranyle acétylé **15** sont dissous dans 30 mL de méthanol en présence de 100 mg de méthylate de sodium. La solution est agitée 4 h puis le milieu réactionnel est neutralisé en présence d'IRC 50. Le filtrat est concentré sous pression réduite, puis purifié sur colonne de gel de silice (éluant = AcOEt/Hexane 6/4). Le produit **12** (2,44 g, 90 % soit 46,8 % à partir du THAM) est obtenu sous forme d'huile.

**Voie de synthèse n°2 :**

5 g de THAM (28,57 mmoles) et 100 mg d'APTS sont dissous dans 30 mL de DMF distillé. 5,2 mL (2 eq.) de DHP dilué dans 10 mL de solvant sont ajoutés goutte à goutte au milieu réactionnel. Après 12 h d'agitation le milieu réactionnel est neutralisé avec du bicarbonate de sodium, puis concentré sous vide. Le résidu est repris dans 80 mL de dichlorométhane, puis lavé avec 100 ml d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium puis concentrée sous pression réduite. L'huile obtenue est purifiée sur colonne de gel de silice (éluant = AcOEt/Hexane 8/2). 2,1 g (21,4 %) de composé **12** sont isolés sous forme de 3 diastéréoisomères dans les proportions 0,5/0,25/0,25 (cf spectre RMN <sup>1</sup>H figure E1).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,72 ; 6,54 ; 6,45 (1H, 3s, NH); 6,19 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 6,06 (1H, 2 dd, =CH); 5,59 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 5,04 ; 4,80 ; 4,65 (1H, t, CH<sub>2</sub>OH); 4,53 (2H, m, O-CH-O); 3,42-3,99 (10H, m, 2CH<sub>2</sub>O du THP, 2CH<sub>2</sub>OTHP, CH<sub>2</sub>OH); 1,45-1,77 (12H, m, -CH<sub>2</sub>- du THP).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 166,99 (CONH); 131,94 ; 131,92 (CH<sub>2</sub>=); 127,42 ; 127,38 (CH=); 100,86 ; 100,17 ; 99,89 (C anomère : O-C-O); 61,59-68,10 (CH<sub>2</sub>O du THP, CH<sub>2</sub>OTHP, CH<sub>2</sub>OH, CNH) ; 20,06-31,57 (-CH<sub>2</sub>-).



**Figure E1** : spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **12**.

***N*-(1,3-bis((tétrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-2-(((tétrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)méthyl)propan-2-yl)acrylamide (THAM triOTHP) **13****

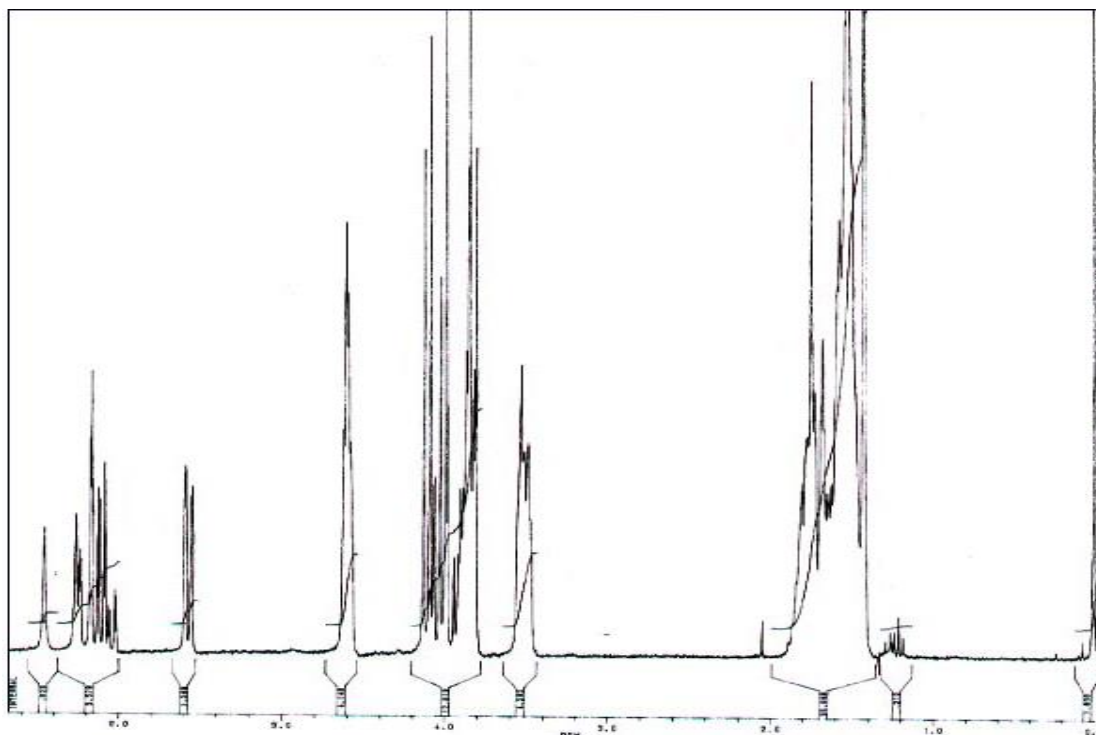
10 g (57 mmoles) de THAM sont mis en suspension dans 50 mL de dichlorométhane fraîchement distillé et 100 mg d'APTS sont ajoutés. Le milieu réactionnel est refroidi à 0 °C et 15,8 g (3,3 eq.) de dihydropyrane sont ajoutés goutte à goutte. Après 16 h d'agitation, le milieu réactionnel est transvasé dans une ampoule à décanter et lavé avec 50 mL d'une solution saturée en bicarbonate de sodium et 50 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 4/6 puis recristallisé dans le n-hexane. Le produit **13** (19,5 g, 80 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

F = 83-84°C

La RMN met en évidence la présence de deux diastéréoisomères (cf. figure E2).

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm) = 6,38 (1H, *s*, NH); 6,05 (1H, *2dd*,  $\text{CH}_2=$ ); 6,02 (1H, *2dd*, =CH); 5,57 (1H, *dd*,  $\text{CH}_2=$ ); 4,52 (3H, *m*, O- $\text{CH}_2$ -O); 3,87 (9H, *m*,  $\text{CH}_2\text{O}$  du THP H équatorial,  $\text{CH}_2\text{OTHP}$ ); 3,45 (3H, *m*,  $\text{CH}_2\text{O}$  du THP H axial); 1,3-1,9 (18, *m*,  $-\text{CH}_2-$  du THP).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm) = 165,26 (CONH); 132,19 ; 132,14 ( $\text{CH}_2=$ ); 125,37 ; 125,26 ( $\text{CH}=\text{}$ ); 99,95; 99,36 (C anomère : O-C-O); 66,87 ; 62,23 ( $\text{CH}_2\text{O}$  du THP,  $\text{CH}_2\text{OTHP}$ ); 59,41 (CNH); 30,56 ; 26,93 ; 25,43 ; 19,46 ( $-\text{CH}_2-$ ).



**Figure E2** : spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **13**.

**Acétate de 2-acrylamido-3-hydroxy-2-(((tétrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)méthyl)propyle (THAM monoOAc monoOTHP) 14**

2,37 g (10,92 mmoles) de THAM monoacétylé **5** et 100 mg d'APTS sont dissous dans 40 ml de chlorure de méthylène distillé. Le milieu réactionnel est refroidi à  $0^\circ\text{C}$  et 1 g (1,2 eq.) de DHP dissous dans 10 ml de solvant sont ajoutés goutte à goutte. En fin d'addition l'agitation est poursuivie à température ambiante pendant 3h (réaction suivie en CCM, éluant = AcOEt) puis le mélange réactionnel est transvasé dans une ampoule à décanter et lavé avec 30 mL d'une solution saturée en bicarbonate de sodium et 30 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant (AcOEt/Hexane 9/1). Le produit **14** (1,346 g, 40 %) est obtenu sous forme d'une huile incolore.

La RMN indique que l'on a un mélange de deux diastéréoisomères dans un rapport 55/45.

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm) = 6,74 (0,55 H, s, NH); 6,41 (0,45 H, s, NH); 6,23 (1H, dd,  $\text{CH}_2=$ ); 6,1 (1H, 2dd,  $=\text{CH}$ ); 5,68 (1H, dd,  $\text{CH}_2=$ ); 5,00 (0,55 H, t,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 4,76 (0,45 H, t,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 4,54 (1H, m, O- $\text{CH}$ -O); 4,15 (1H, dd,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3,7-3,9 (5H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$  du THP H équatorial,  $\text{CH}_2\text{OTHP}$ ,



CH<sub>2</sub>OH); 3,45-3,61 (3H, m, CH<sub>2</sub>O du THP H axial, CH<sub>2</sub>OH); 1,8 ; 1,55 (2H, 4H, m, -CH<sub>2</sub>- du THP).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 167,32 (CONH); 131,47 (CH<sub>2</sub>=); 127,98 (CH=); 101,23 (C anomère : O-C-O); 69,14 (CH<sub>2</sub>O du THP); 64,65 ; 64,51 ; 63,87 (CH<sub>2</sub>OTHP, CH<sub>2</sub>OH); 61,9 (CNH); 31,34 ; 25,76 ; 21,03 (-CH<sub>2</sub>-).

**Acétate de 2-acrylamido-3-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)propyl (THAM diOTHP monoOAc) 15**

2,141 g de THAM monoacétylé **5** (9.86 mmoles) et 100 mg d'APTS sont dissous dans 30 mL de dichlorométhane distillé. Le milieu réactionnel est refroidi à 0 °C et 1,8 mL (2,2 eq) de DHP dilués dans 10 ml de solvant sont additionnés goutte à goutte. La réaction est suivie en CCM (éluant = AcOEt) et après 3h d'agitation, le milieu réactionnel est transvasé dans une ampoule à décanter et lavé avec 30 mL d'une solution saturée en bicarbonate de sodium, puis 30 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, puis filtrée et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de gel de silice (éluant = AcOEt/Hex 6/4). Après recristallisation dans un mélange acétate d'éthyle/Hexane, le produit **15** (3 g, 80%) est obtenu sous forme de poudre blanche.

F = 99-100°C

La RMN met en évidence la présence de deux isomères :

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,35 (1H, s, NH); 6,25 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 6,10 (1H, dd, =CH); 5,6 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 4,47-4,65 (4H, m, CH<sub>2</sub>OAc, 2 O-CH-O); 3,78-4,05 (6H, 2 CH<sub>2</sub>O du THP H équatorial, 2 CH<sub>2</sub>OTHP); 3,52 (2H, m, CH<sub>2</sub>O du THP H axial,); 2,04 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO); 1,78-1,49 (12H, m, -CH<sub>2</sub>- du THP).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 171,52, 171,49 (CH<sub>3</sub>C=O); 165,99 (CONH); 132,37; 132,39 (CH<sub>2</sub>=); 126,48; 126,54 (CH=); 100,08; 100,43 (O-C-O); 67,84 (CH<sub>2</sub>OAc); 67,29 (CH<sub>2</sub>O du THP); 64,1 (CH<sub>2</sub>OTHP); 63,42 (CH<sub>2</sub>O du THP); 63,05 (CH<sub>2</sub>OTHP); 59,42 (CNH); 31,14; 31,21; 31,25 (-CH<sub>2</sub>- du THP); 25,95; 25,97 (CH<sub>3</sub>CO); 20,11; 20,32; 21,55 (-CH<sub>2</sub>- du THP).

**1,1,1-Tris(méthoxyméthyl)-1-acrylamidométhane (THAM triOMe) 16**

Voie de synthèse n°1:

4 g (22,8 mmoles) de THAM sont dissous dans 40 mL de DMF fraîchement distillé. Le milieu réactionnel est refroidi à 0°C et 3,3 g (3,6 équivalents) d'hydruide de sodium à 60 % sont mis en suspension dans la solution sous forte agitation. Après arrêt du dégagement gazeux (10 minutes), 5,1 mL (3,6 équivalents) d'iodure de méthyle sont ajoutés goutte à goutte. La réaction est

instantanée et les sels d'iodures précipitent dans le milieu. Lorsque la totalité du réactif a été additionnée l'agitation est poursuivie durant 10 minutes, puis le milieu est acidifié (pH = 6) avec 5 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 3N. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut est repris dans 70 mL d'eau et la phase aqueuse est extraite avec 2 x 100 mL de dichlorométhane. La phase organique est lavée avec 2 x 50 mL d'une solution saturée en thiosulfate de sodium, puis avec 50 mL d'eau saturée en chlorure de sodium (le THAM triméthoxy est soluble dans l'eau). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, puis filtrée et évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 7/3. Après recristallisation dans l'éther, le produit **16** (1,9 g, 38,3 %) est obtenue sous forme de cristaux.

#### Voie de synthèse n°2 :

Dans un ballon de 250 mL, 5 g de THAM (28,6 mmoles) et 17,55 g (94,38 mmoles) de tosylate de méthyle sont mis en solution sous forte agitation dans 100 mL de THF fraîchement distillé. 10,58 g (94,38 mmoles) de *tertio*Butylate de potassium sont dissous dans 100 mL de THF fraîchement distillé et ajoutés goutte à goutte au milieu réactionnel. Après addition de la totalité de la base, l'agitation est maintenue une heure (réaction suivie en CCM : éluant =AcOEt), puis le milieu réactionnel est filtré de façon à éliminer le sel de tosylate ayant précipité et le THAM non dissous qui n'aurait pas réagi. Le filtrat est concentré sous pression réduite et l'huile résiduelle est purifiée sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 7/3. Après recristallisation dans un mélange éther/n-hexane, le THAM triOMe **16** (3,15 g, 50 %) est obtenue sous forme de cristaux blancs.

F = 82-83 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,18 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 6,01 (1H, dd, =CH); 5,8 (1H, s, NH); 5,52 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 3,65 (6H, s, CH<sub>2</sub>O); 3,28 (9H, s, CH<sub>3</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 166 (CONH); 132,26 (CH<sub>2</sub>=); 126,73 (CH=); 71,92 (CH<sub>2</sub>O); 60,28 (CNH); 59,95 (CH<sub>3</sub>O).

#### **1,1-Bis(méthoxyméthyl)-1-hydroxyméthyl-1-acrylamidométhane 16'**

Produit secondaire de la réaction précédente se formant dans des proportions de l'ordre de 10 à 20 %. Le composé **16'** est récupéré après purification sur gel de colonne de silice (AcOEt/hexane 9/1), puis cristallisé dans l'éther.

F = 77-78°C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,29 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,26 (1H, *s*, NH); 6,13 (1H, *dd*, =CH); 5,67 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,78 (1 H, *t*, CH<sub>2</sub>OH); 3,76 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>OMe); 3,71 (2H, *s*, CH<sub>2</sub>OMe); 3,40 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>OH); 3,38 (6H, *s*, CH<sub>3</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 166,88 (CONH); 131,64 (CH<sub>2</sub>=); 127,79 (CH=); 72,2 (CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>); 65,24 (CH<sub>2</sub>OH); 61,58 (CNH); 60,09 (CH<sub>3</sub>O).

### **N-(1,3-dihydroxy-2-(méthoxyméthyl)propan-2-yl)acrylamide 16''**

Produit secondaire de la réaction précédente se formant dans des proportions de l'ordre de 10 à 20 %. Le composé **16''** est récupéré après purification sur gel de colonne de silice (AcOEt/MeOH 9/1) puis cristallisé dans un mélange méthanol/éther 9/1.

F = 112-113 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,58 (1H, *s*, NH); 6,29 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,16 (1H, *dd*, =CH); 5,72 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,33 (2H, *t*, CH<sub>2</sub>OH); 3,76 (2H, *dd*, CH<sub>2</sub>OH); 3,58 (2H, *s*, CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>); 3,52(2H, *dd*, CH<sub>2</sub>OH); 3,40 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 167,27 (CONH); 131,30 (CH<sub>2</sub>=); 128,23 (CH=); 74,14 (CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>); 64,70 (CH<sub>2</sub>OH); 61,65 (CNH); 60,19 (CH<sub>3</sub>O).

### **1,1,1-Tris(hydroxyméthyl)-1-formylamidométhane 17**

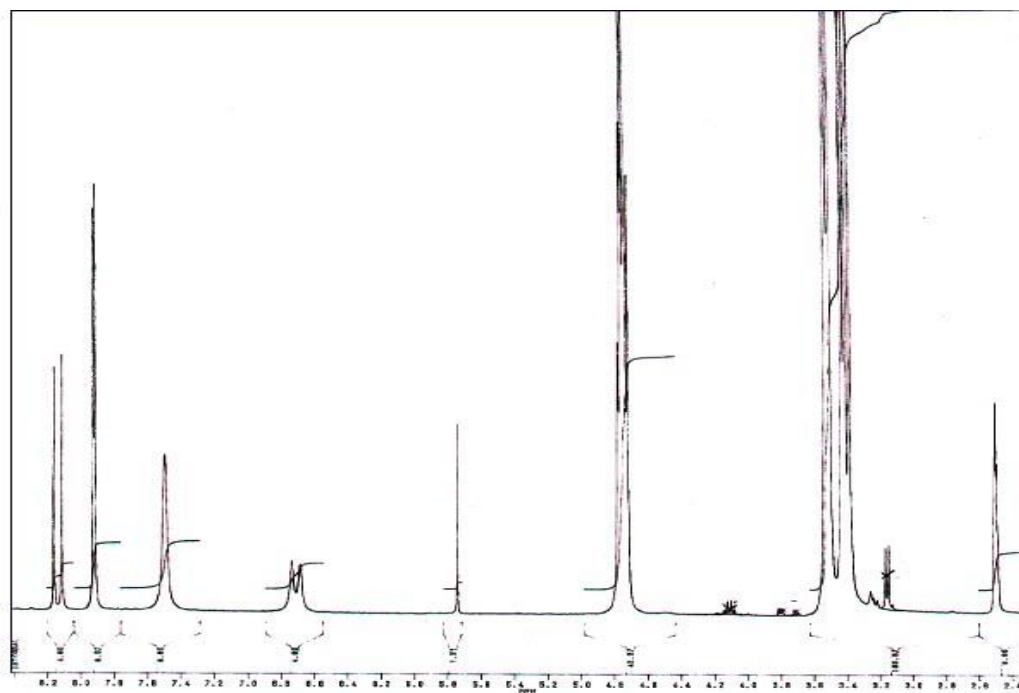
41,7 g (0,34 mole) de Tris et 111,3 mL (4 eq.) de formiate d'éthyle sont mis en réaction dans 500 mL d'éthanol anhydre à reflux durant 4 h. L'avancement de la réaction est suivi en CCM (éluant = AcOEt/MeOH 7/3). Lorsque la totalité du produit de départ a réagi, le milieu réactionnel est ramené à température ambiante, puis faiblement concentré sous pression réduite de façon à ramener le volume de solvant à 400 mL. Après filtration, la solution est refroidie et le produit cristallise dans l'éthanol. Le produit **17** (49 g, 96 %) est obtenu sous forme de cristaux blancs.

F = 115,5-116,5°C

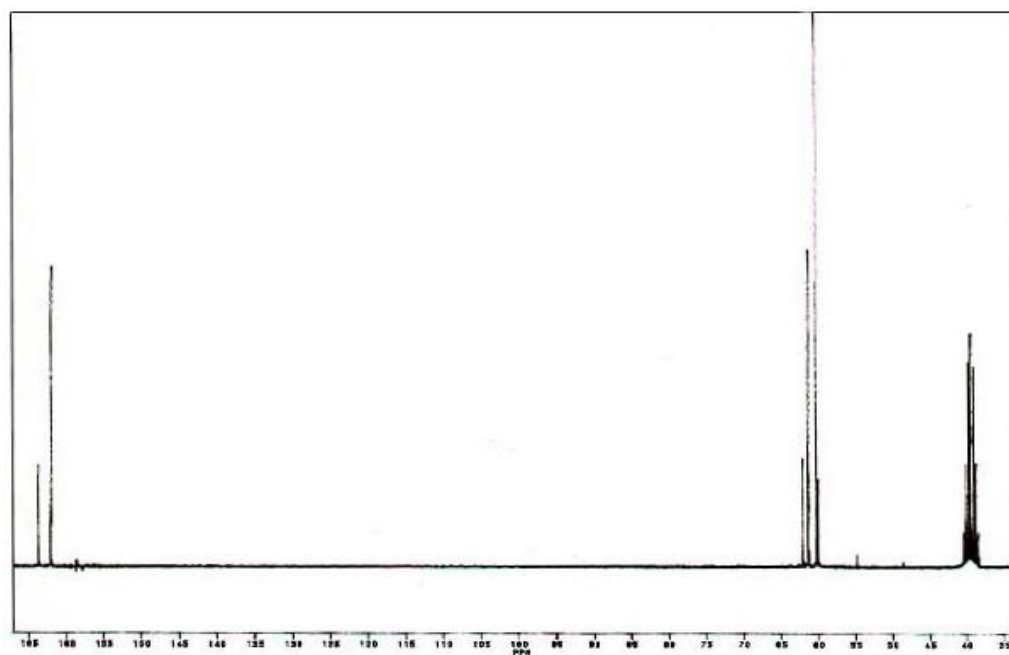
La RMN met en évidence l'isomérisie CIS-TRANS des tautomères (cf. figures E3 et E4).

**RMN <sup>1</sup>H** (DMSO) δ(ppm) = 8,14 (0,33 H, *d*, H-C=O trans), 7,92 (0,67 H, *d*, H-C=O cis); 7,5 (0,67 H, *s*, NHCO cis); 6,75 (0,33 H, *d*, NHCO trans); 4,72-4,78 (3H, 2*t*, CH<sub>2</sub>OH); 3,52 (4H, *d*, CH<sub>2</sub>OH); 3,43 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>OH).

**RMN <sup>13</sup>C** (DMSO) δ(ppm) = 163,76 (CONH trans); 162,11 (CONH cis); 59,9 ; 60,33 ; 61,43 ; 62,23 (CH<sub>2</sub>OH et C-NH).



**Figure E3** : spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **17**.



**Figure E4** : spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **17**.

### **1,1,1-Tris-(acétoxyméthyl)-1-formamidométhane 18**

5,18 g (34,7 mmoles) du composé **17** sont dissous dans un mélange pyridine/anhydre acétique 1/1. Après 12 h d'agitation, le milieu réactionnel est versé dans 150 mL d'eau glacée puis la phase aqueuse est extraite avec 150 mL de dichlorométhane. La phase organique est lavée successivement avec 2 x 125 mL d'une solution de bicarbonate de sodium à 10 %, 100 mL d'eau, 150 mL d'une solution d'acide chlorhydrique HCl 1N, puis 100 mL d'eau. La phase organique est

séchée sur sulfate de sodium puis filtrée et concentrée sous pression réduite. Après cristallisation dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexane, le produit **18** (6,8 g, 71,3 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

F = 80-81 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 2 isomères cis-trans: 8,33 (0,21 H, *d*, H-C=O trans); 8,13 (0,79 H, *d*, H-C=O cis); 6,26 (0,21 H, *s*, NHCO trans); 6,05 (0,79 H, *d*, NHCO cis); 4,45-4,24 (6H, 2*s*, CH<sub>2</sub>OAc); 2,1-2,12 (9H, 2*s*, CH<sub>3</sub>) .

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 171,12 (CH<sub>3</sub>C=O cis); 170,69 (CH<sub>3</sub>C=O trans); 163,33 (CONH cis); 161,63 (CONH trans); 64,07 (CH<sub>2</sub>OAc trans); 63,18 (CH<sub>2</sub>OAc cis); 58,67 (C-NH trans); 57,15 (C-NH cis); 21,31 (CH<sub>3</sub>CO cis); 21,23 (CH<sub>3</sub>CO trans).

### **5-formamido-5-hydroxyméthyl-2,2-diméthyl-1,3-dioxane 19**

16 g (107.4 mmoles) de Tris formamide **17** et 100 mg d'APTS sont mis en suspension dans 145 mL d'un mélange acétone/diméthoxypropane 7/3 porté à reflux durant 48 h. En fin de réaction (suivi en CCM avec AcOEt), le milieu réactionnel est ramené à température ambiante et neutralisé par ajout de quelques gouttes de TEA. Le solvant est évaporé sous pression réduite et l'huile résiduel est reprise dans 60 mL d'éther. La solution est filtrée, puis après cristallisation du filtrat dans éther/hexane le produit **19** (14,2 g, 70 %) est obtenu sous forme de cristaux blancs.

F = 85-86°C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 2 isomères cis-trans : 8,46 (0,1 H, *d*, H-C=O trans); 8,14 (0,9 H, *d*, H-C=O cis); 6,26 (1 H, *m*, NHCO cis + trans); 4,84 (0,1H, *t*, CH<sub>2</sub>OH cis); 4,23 (0,9 H, *t*, CH<sub>2</sub>OH trans); 3,81-3,93 (4H, *m*, CH<sub>2</sub>O éq. + CH<sub>2</sub>O ax.); 3,74 (1,8 H, *d*, CH<sub>2</sub>OH cis); 3,63 (0,2 H, *d*, CH<sub>2</sub>OH trans); 1,42-1,45 (6H, *m*, CH<sub>3</sub> cis + trans).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 165,2 (CONH trans); 162,86 (CONH cis); 99,39 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 65,13; 64,17; 64,1; 63,57 (CH<sub>2</sub>O isopropylidène cis + trans, CH<sub>2</sub>OH cis + trans); 55,56 (C-NH cis); 53,62 (C-NH trans); 26,74 ; 21,26 (CH<sub>3</sub> iso. cis); 25,5 ; 22,44 (CH<sub>3</sub> iso. trans).

### **5-formamido-5-(2-méthoxyprop-2-yl)oxyméthyl-2,2-diméthyl-1,3-dioxane 20**

Produit secondaire de la réaction précédente, isolé après chromatographie du brut réactionnel sur colonne de silice avec l'éluant AcOEt/hexane 9/1.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 2 isomères cis-trans : 8,52 (0,24 H, *d*, H-C=O trans); 8,12 (0,76 H, *d*, H-C=O cis); 6,1 (0,24 H, *d*, NHCO trans); 5,76 (0,76 H, *d*, NHCO cis); 4,33 (2 H, *d*, CH<sub>2</sub>O équatoriaux cis + trans); 3,73-3,92 (4 H, *m*, CH<sub>2</sub>O axiaux cis + trans, CH<sub>2</sub>OC(Me)<sub>2</sub>OMe cis + trans); 3,25 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>O cis + trans); 1,3-1,6 (6H, *m*, CH<sub>3</sub> cis + trans).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = 162,51 (CONH trans); 161,88 (CONH cis); 99,17-101 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + O-C(Me)<sub>2</sub>-OMe); 61,34-65,96 (CH<sub>2</sub>O isopropylidène cis + trans, CH<sub>2</sub>OC(Me)<sub>2</sub>-OMe cis + trans); 56,03 (CH<sub>3</sub>O cis ou trans); 53,91 (CH<sub>3</sub>O cis ou trans); 49,42 (C-NH cis ou trans); 48,97 (C-NH trans ou cis); 19,91-24,92 (CH<sub>3</sub> iso. cis + trans).

### **1,1,1-Tris((tétrahydro-2H-pyran-2-yl)oxyméthyl)-1-formylamidométhane 21**

4,4 g (29,53 mmoles) de Tris formamide **17** sont mis en suspension dans 80 mL d'acétonitrile distillé avec 11,2 mL (4 eq.) de DHP et 100 mg d'APTS. Le milieu réactionnel est porté à ébullition durant deux heures, puis, après refroidissement et neutralisation, avec quelques gouttes de TEA de la solution, le mélange réactionnel est filtré et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec un gradient d'élution : AcOEt/Hex 6/4, puis AcOEt/Hex 7/3, puis AcOEt/Hex 8/2. Le produit **21** (4,7 g, 40 %) est obtenu sous forme d'une huile. Ce produit est instable et tend à se dégrader en dérivé ditétrahydropyranyle. La RMN indique la présence de deux isomères cis-trans ainsi que de plusieurs diastéréoisomères.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = 8,35 (0,7H, *dd*, H-C=O); 8,07 (0,3H, *d*, H-C=O); 6,17 (1H, *m*, NHCO); 4,55 (3H, *m*, O-CH-O); 3,41-3,85 (12H, *m*, CH<sub>2</sub>O-THP, CH<sub>2</sub>O du THP); 1,35-1,73 (12H, *m*, -CH<sub>2</sub>- du THP).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = 164,61, 161,49 (CONH); 131,7 (CH<sub>2</sub>=); 127,24 (CH=); 100,22 ; 100,15 ; 99,82 ; 99,69 ; 99,67 (C anomères : O-CH-O); 68,52 ; 68,44 ; 68,42 ; 67,52 (CH<sub>2</sub>O du THP); 63,09 ; 62,75 ; 62,65 ; 62,62 ; 62,59 (CH<sub>2</sub>OTHP); 60,04 ; 58,72 (C-NH); 31,18 ; 31,1 ; 26 ; 25,98 ; 25,90 ; 20,28 ; 20,22 ; 20,00 ; 19,97 ; 19,7 ; 19,66 (-CH<sub>2</sub>- du THP).

### **5-hydroxyméthyl-5-méthylamino-2,2-diméthyl-1,3-dioxane 22**

15 g (79,36 mmoles) de Tris formamide isopropylidène **19** sont dissous dans 100 ml de THF. La solution est ajoutée goutte à goutte et à froid à 9 g (3 eq.) d'hydrure d'aluminium lithium LiAlH<sub>4</sub> en suspension dans 100 ml de THF. En fin d'addition, le milieu réactionnel est porté à reflux durant 12 h, puis il est refroidi et 40 ml d'une solution d'éthanol aqueux à 90 % sont ajoutés goutte à goutte. Après addition goutte à goutte de 60 mL d'eau, les sels d'aluminium sont filtrés sur Célite sous pression réduite. Ils sont repris et extraits dans 200 mL d'éthanol sous forte agitation. Après filtration et évaporation du solvant, l'huile résiduelle est reprise dans 500 mL de dichlorométhane. La phase organique est lavée avec 50 mL d'une solution saturée en chlorure de sodium, puis séchée sur sulfate de sodium. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite et l'amine est reprise dans 100 mL de cyclohexane à 50 °C. Après filtration de la solution, l'amine cristallise

dans le solvant à une température comprise entre 10 et 20 °C. Le composé **22** (11,2 g, 80 %) est obtenu sous forme d'aiguilles blanches.

F = 65-66°C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 3,75 (4H, *m*, CH<sub>2</sub>O éq. + CH<sub>2</sub>O ax.); 3,41 (2 H, *d*, CH<sub>2</sub>OH); 3,63 (0,2 H, *d*, CH<sub>2</sub>OH trans); 2,38 (5H, *m*, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>3</sub>NH, CH<sub>3</sub>N); 1,47 ; 1,46 (6H, *2s*, CH<sub>3</sub> iso.).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 99,17 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 64,67 (CH<sub>2</sub>O isopropylidène); 60,92 (CH<sub>2</sub>OH); 54,08 (C-NH); 28,5 (CH<sub>3</sub>-NH); 27,11 ; 21,45 (CH<sub>3</sub> iso.).

### **Chlorhydrate de 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)-1-N-méthylaminométhane 24**

5 g (20,24 mmoles) de produit **23** sont dissous dans 100 mL d'un mélange MeOH/HCl<sub>aq</sub> 3 N et le milieu réactionnel est porté à ébullition durant 12 h. Le solvant est ensuite évaporé sous vide et le sirop résiduel est cristallisé dans l'éthanol. Le produit **24** (2,95 g, 85 %) est obtenu sous forme de cristaux.

F = 122-123°C

**RMN <sup>1</sup>H** (DMSO) δ(ppm) = 8,41 (2H, *s*, NH<sub>2</sub>); 5,39 (3H, *t*, CH<sub>2</sub>OH); 3,54 (6H, *d*, CH<sub>2</sub>OH); 2,53 (2H, *d*, CH<sub>3</sub>N).

**RMN <sup>13</sup>C** (DMSO) δ(ppm) = 64,86 (CH<sub>2</sub>OH); 57,6 (C-NH<sub>2</sub>); 27,2 (CH<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>).

### **Trifluoroacétate de 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)-1-N-méthylamoniumméthane 26**

2,5 g (16,77 mmoles) de composé **17**, 15,4 g (3,3 eq.) de chlorure de trityle et 10,3 mL (4 eq.) de TEA sont dissous dans 40 mL d'acétonitrile anhydre. L'agitation est poursuivie durant 12 h puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut est repris dans 100 mL de dichlorométhane. La phase organique est lavée avec 2 x 100 mL d'une solution saturée en NaHCO<sub>3</sub>, puis 100 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, puis filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut est repris dans 50 mL de THF anhydre et la solution est ajoutée goutte à goutte à 1,27 g de LiAlH<sub>4</sub> (2 eq.) en suspension dans 40 mL de THF refroidi à 0°C. Le mélange réactionnel est ensuite porté à reflux durant 12 h, après quoi il est de nouveau refroidi et 20 ml d'éthanol aqueux à 90 %, puis 10 mL d'eau sont ajoutés goutte à goutte. Le mélange est ensuite filtré puis évaporé et la phase aqueuse est extraite avec 2 x 50 ml de dichlorométhane. La phase organique est séchée, puis filtrée et concentrée au 1/3 du volume initial. 9 mL (6 eq.) de triéthylsilane (HSi(Et)<sub>3</sub>) sont versés dans le milieu et sont ajoutés goutte à goutte 10 mL d'un mélange TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à froid. Après une heure d'agitation, le solvant est évaporé sous pression réduite et le brut est repris dans 60 mL d'éther. La phase organique est extraite avec 50 mL d'eau.

La phase aqueuse est évaporée sous pression réduite et le composé **26** (2,67 g, 64 %) est obtenu après trituration dans l'éther sous forme d'une poudre blanche très hygroscopique.

**RMN <sup>1</sup>H** (D<sub>2</sub>O)  $\delta$ (ppm) = 3,7 (6H, s, CH<sub>2</sub>OH); 2,66 (3H, s, CH<sub>3</sub>N<sup>+</sup>).

**RMN <sup>13</sup>C** (D<sub>2</sub>O)  $\delta$ (ppm) = 163,93 (CO<sub>2</sub><sup>-</sup>); 115,49 (CF<sub>3</sub>); 66,31 (CH<sub>2</sub>OH); 58,85 (C-NH<sub>2</sub><sup>+</sup>); 28 (CH<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub><sup>+</sup>).

### **5-Hydroxyméthyl-5-N-méthylacrylamido-2,2-diméthyl-1,3-dioxane 27**

4,7 g (26,86 mmoles) de composé **22** et 7,56 mL (2 eq.) de TEA sont dissous dans 20 mL de dichlorométhane et refroidis à 0 °C. 2,4 ml (1,1 eq) de chlorure d'acryloyle dissous dans 10 mL de dichlorométhane sont ajoutés goutte à goutte au milieu réactionnel. Après addition totale du chlorure d'acide l'agitation est maintenue à température ambiante durant une heure. 100 mL d'éther sont ensuite ajoutés sous forte agitation et le précipité est filtré. Le filtrat est ensuite concentré sous pression réduite et le brut est purifié sur colonne de gel de silice (éluant : AcOEt/εTEA). Après recristallisation dans éther/cyclohexane 8/2, le produit **27** (2,46 g, 40 %) est obtenu sous forme de cristaux.

F = 71-72 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = 6,63 (1H, *1dd*, =CH); 6,27 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,73 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,24 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>O isopropylidène équatoriaux); 4,00 (3H, *d + s*, CH<sub>2</sub>O isopropylidène axiaux, CH<sub>2</sub>OH); 3,93 (2H, *s*, CH<sub>2</sub>OH); 3,23 (3 H, *s*, CH<sub>3</sub>-N); 1,46 ; 1,44 (3H, *s*, CH<sub>3</sub> isopropylidène).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = 170,86 (CONH); 131,62 (CH<sub>2</sub>=); 128,93 (CH=); 99,98 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 65,65 (CH<sub>2</sub>O isopropylidène); 64,15 (CH<sub>2</sub>OH); 62,29 (C-NH); 35,06 (CH<sub>3</sub>-N); 26,28 ; 23,27 (CH<sub>3</sub> isopropylidène).

### **5-Acryloxyméthyl-5-N-méthylacrylamido-2,2-diméthyl-1,3-dioxane 28**

Produit secondaire de la réaction précédente. Isolé par chromatographie du brut réactionnel sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/hexane 8/2.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = 6,56 (1H, *dd*, =CH acrylamido); 6,35 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>= acryloxy); 6,20 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>= acrylamido); 6,12 (1H, *dd*, =CH acryloxy); 5,85 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>= acryloxy); 5,66 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,7 (2H, *s*, CH<sub>2</sub>OAc); 4,15 (4H, *2d*, CH<sub>2</sub>O isopropylidène); 3,16 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>N-); 1,41 ; 1,39 (2 x 3H, *s*, CH<sub>3</sub> isopropylidène).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = 169,14 (COOAc); 166,10 (CONH); 131,7 ; 130,99 (CH<sub>2</sub>= acrylamido + acryloxy); 128,55 ; 127,81 (CH= acrylamido + acryloxy); 99,64 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 64,61



(CH<sub>2</sub>OAc); 63,59 (CH<sub>2</sub>O isopropylidène); 59,97 (C-NH); 34,2 (CH<sub>3</sub>-N); 24,32 ; 23,82 (CH<sub>3</sub> isopropylidène).

**N-(1,3-bis((tétrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(((tétrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)méthyl)propan-2-yl)-N-méthylacrylamide 29**

Voie de synthèse n°1:

4,27 g (10 mmoles) de THAM triOTHP **13** et 2,745 g (1,5 eq.) de tosylate de méthyle sont dissous à température ambiante dans 150 mL de THF anhydre. 1,68 g (1,5 eq.) de *tertiobutylate* de potassium sont introduits dans le milieu réactionnel qui est laissé sous agitation durant 2h. La réaction est suivie en CCM (éluant = AcOEt/Hexane 3/7). Lorsque la totalité du produit de départ a réagi, le mélange réactionnel est filtré et le solvant est évaporé sous pression réduite. L'huile résiduelle est reprise dans 100 mL d'éther et la phase organique est lavée avec 100 mL d'une solution de soude 1N puis 100 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 3/7. Le produit **29** (3,99 g, 90,4 %) est obtenu sous forme d'une huile incolore.

Voie de synthèse n°2 :

4 g (9,32 mmoles) du composé **21** sont dissous dans 20 mL d'éther anhydre. 1,1 g d'hydrure d'aluminium lithium (MM = 38; 3 eq.) sont mis en suspension dans 50 mL d'éther anhydre. Le milieu réactionnel est refroidi à 0°C et on ajoute goutte-à-goutte la solution du composé **21**. En fin d'addition le milieu réactionnel est porté à reflux durant 2 h (suivi de la réaction en CCM, éluant = AcOEt). Le milieu réactionnel est de nouveau refroidi et 20 mL d'eau sont ajoutés goutte à goutte. Après filtration le filtrat est transvasé dans une ampoule à décanter. La phase organique est lavée avec 20 mL d'eau puis séchée sur sulfate de sodium. Le solvant est évaporé sous pression réduite et l'amine est obtenue sous forme d'huile incolore qui est immédiatement reprise dans 30 mL de méthanol. Le milieu réactionnel est refroidi à 0°C et 1,2 mL de chlorure d'acryloyle sont ajoutés goutte à goutte. Durant l'addition le pH est maintenu à 9-10 par ajout d'une solution de potasse méthanolique. Le milieu réactionnel est ensuite ramené à température ambiante et après une heure d'agitation les sels sont filtrés et le solvant est évaporé. Le brut est repris dans 50 mL de chlorure de méthylène et la phase organique est lavée avec 50 ml d'eau. Après traitement usuel, le brut réactionnel est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 3/7. Le produit **29** (3,29 g, 80 %) est obtenu sous forme d'une huile incolore.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,5 (1H, *dd*, =CH); 6,05 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,5 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,54 (3H, *m*, O-CH<sub>2</sub>-O); 4,14-4,27 (3H, *m*, CH<sub>2</sub>O du THP équatorial); 3,7-3,94 (6H, *m*, CH<sub>2</sub>OTHP); 3,44 (3H, *m*, CH<sub>2</sub>O axial du THP); 3,1 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>-N); 1,45-1,72 (18H, *m*, -CH<sub>2</sub>- du THP).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 169,53; 164 (C<sub>ON</sub>CH<sub>3</sub>); 132,53 (CH<sub>2</sub>=); 126,33 (CH=); 99,90 ; 99,80 ; 99,36 ; 99,75 ; 99,69 (C anomère : O-C-O); 62,44-67,46 (CH<sub>2</sub>O du THP, CH<sub>2</sub>OTHP, C-N-CH<sub>3</sub>); 35,21 (CH<sub>3</sub>-N); 31,24 ; 26,18 ; 26,12 ; 20,05 ; 19,95 ; 19,87 (-CH<sub>2</sub>- du THP).

### **1,1,1-Tris(benzoyloxyméthyl)-1-acrylamidométhane 30**

27,36 g (120 mmoles) d'anhydride benzoïque sont dissous dans 50 mL de pyridine à 0 °C. 3,5 g (20 mmoles) de THAM sont ajoutés au milieu réactionnel laissé sous agitation à froid pendant 10 minutes puis à température ambiante durant 12 h. Le milieu réactionnel est versé dans 100 mL d'eau glacée et la phase aqueuse est extraite avec 150 mL de dichlorométhane. La phase organique est lavée successivement avec 2 x 150 mL d'une solution saturée en bicarbonate de sodium, 100 mL d'eau, 150 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 1N, puis 100 mL d'eau. Elle est ensuite séchée sur sulfate de sodium, filtré et le solvant évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 3/7. Le produit **30** (7,84g, 80 %) est obtenu sous forme de poudre blanche (produit très hygroscopique).

F = 53-54 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 8,00 (6H, *d*, H aromatiques); 7,57 (3H, *m*, H aromatiques); 7,52 (6H, *m*, H aromatiques); 6,65 (1H, *s*, NHCO); 6,32 (1H, *2dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,15 (1H, *2dd*, =CH); 5,67 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,94 (6H, *s*, CH<sub>2</sub>OBz).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 167,08 (CONH); 166,48 (Φ<sub>C</sub>O); 134,13 (CH<sub>2</sub>=); 129,2 (CH=); 131,59, 130,42, 129,94, 127,90 (C aromatiques); 64,52 (CH<sub>2</sub>O-Bz); 60,02 (C-NH).

### **1,1,1-Tris(triphénylméthylloxyméthyl)-1-acrylamidométhane 31**

2 g (11,42 mmoles) de THAM, 10,48 g (3,3 eq.) de chlorure de trityle et 7 mL (4 eq.) de TEA sont mis en réaction dans 25 mL d'acétonitrile anhydre. Après 12 h d'agitation, le milieu réactionnel est filtré pour récupérer le précipité formé, qui est recristallisé dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH. Le produit **31** (8,23 g, 80 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

F = 204-205°C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 7,18-7,28 (45H, *m*, H aromatiques); 6,03 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,76 (1H, *dd*, CH=); 5,48 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,13 (1H, *s*, NH); 3,59 (6H, *s*, CH<sub>2</sub>OTr).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 165,45 (CONH); 144,41 (CH<sub>2</sub>=); 132,56 (CH=); 129,27 ; 128,55 ; 128,42 ; 127,57 ; 125,93 (C aromatiques); 87,15 (C(Φ)<sub>3</sub>); 62,8 (CH<sub>2</sub>OTr); 61,17 (CNH).

**N-(2,2-diméthyl-5-(((tétrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)méthyl)-1,3-dioxan-5-yl)acrylamide 32**

3 g de THAM isopropylidène (13,95 mmoles) et 100 mg d'APTS sont dissous dans 60 mL de THF anhydre. 2,8 mL (2,2 eq.) de DHP sont ajoutés au mélange. Après 12 heures d'agitation (la réaction est suivie en CCM, éluant = AcOEt/Hexane 9/1) la totalité du produit de départ a réagi et le milieu réactionnel est neutralisé avec de la TEA et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans 100 mL de dichlorométhane, puis lavé successivement avec 50 mL d'une solution saturée en NaHCO<sub>3</sub> et 50 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, puis filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut est cristallisé dans le cyclohexane/n-hexane à 10 °C ou dans l'éther à -20°C. Le produit **32** (3,71 g, 89 %) est obtenu sous forme de cristaux blancs.

F = 92-93°C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,38 (1H, s, NH); 6,05 (1H, 2dd, CH<sub>2</sub>=); 6,02 (1H, 2dd, =CH); 5,57 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 4,52 (3H, m, O-CH-O); 3,87 (9H, m, CH<sub>2</sub>O du THP H équatorial, CH<sub>2</sub>OTHP); 3,45 (3H, m, CH<sub>2</sub>O du THP H axial); 1,3-1,9 (18, m, -CH<sub>2</sub>- du THP).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 165,26 (CONH); 132,19 ; 132,14 (CH<sub>2</sub>=); 125,37 ; 125,26 (CH=); 99,95 ; 99,36 (O-C-O); 66,87 ; 62,23 (CH<sub>2</sub>O du THP, CH<sub>2</sub>OTHP); 59,41 (CNH); 30,56 ; 26,93; 25,43 ; 19,46 (-CH<sub>2</sub>-).

**N-(2,2-diméthyl-5-(((tétrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)méthyl)-1,3-dioxan-5-yl)-N-méthyl-acrylamide 33**

3 g (10,03 mmoles) de THAM isopropylidène OTHP **32** et 2,8 g (1,5 eq.) de tosylate de méthyle sont dissous dans 80 mL de THF anhydre. 1,69 g (1,5 eq.) de *tertio*-Butylate de potassium sont ajoutés à la solution laissée sous agitation durant une heure (la réaction est suivie en CCM, éluant = AcOEt/Hexane 7/3). Lorsque la totalité du produit de départ a réagi, le milieu réactionnel est filtré et le solvant est évaporé sous pression réduite. L'huile résiduelle est purifiée sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 6/4. Le produit **33** (3,13 g, 100 %) est obtenu sous forme d'une huile incolore.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,51 (1H, dd, =CH); 6,1 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 5,56 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 4,48 (1H, m, O-CH-O); 4,24-4,17 (2H, 2d, CH<sub>2</sub>O isopropylidène éq.); 3,85-4,09 (4H, 4d, CH<sub>2</sub>O isopropylidène axiaux, CH<sub>2</sub>O-THP); 3,63 (1H, m, CH<sub>2</sub>O du THP H équatorial); 3,45 (1H, m, CH<sub>2</sub>O

du THP H axial); 3,13 (3H, s, CH<sub>3</sub>-N); 1,35-1,66 (12H, m, -CH<sub>2</sub>- du THP); 1,33 ; 1,34 (3H, s, CH<sub>3</sub> isopropylidène).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 169,22 ; 164,5 (CONH); 131,7 (CH<sub>2</sub>=); 127,24 (CH=); 99,69 ; 99,58 (C anomères : O-CH-O, O-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-O); 68,16 (CH<sub>2</sub>O du THP); 64,05 ; 63,76 (CH<sub>2</sub>O isopropylidène); 62,79 (CH<sub>2</sub>OTHP); 61,00 (C-N-CH<sub>3</sub>); 34,86 (CH<sub>3</sub>-N); 31,20 ; 24,59 ; 24,13 (-CH<sub>2</sub>- du THP); 26,04 ; 20,11(CH<sub>3</sub> isopropylidène).

#### **N-(5-(((2-méthoxyéthoxy)méthoxy)méthyl)-2,2-diméthyl-1,3-dioxan-5-yl)acrylamide 34**

5 g (23,25 mmoles) de THAM isopropylidène **3** et 3,185 g (1 eq.) de chlorure de MEM sont dissous dans 25 mL de THF anhydre. 25 ml d'une solution de *tertio*-Butylate de potassium 1M dans le THF sont ajoutés goutte à goutte à la solution qui est ensuite laissée sous agitation durant 1h. Le milieu réactionnel est filtré et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 7/3. Le produit **34** (5,3 g, 75,2 %) est obtenu sous forme d'une huile incolore.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,20 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,09 (1H, *s*, NH); 6,05 (1H, *dd*, =CH); 5,55 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,65 (2H, *s*, O-CH<sub>2</sub>-O); 4,39 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>O isopropylidène équatoriaux); 3,87 (2H, *s*, CH<sub>2</sub>OMEM); 3,69 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>O isopropylidène axiaux); 3,64 (2H, *dd*, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>); 3,5 (2H, *dd*, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>); 3,32 (3H, *d*, CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>); 1,34; 1,47 (3H, *s*, CH<sub>3</sub> isopropylidène).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 166,32 (CONH); 131,81 (CH<sub>2</sub>=); 127,16 (CH=); 99,16 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 96,31 (O-CH<sub>2</sub>-O); 72,47 (-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 68,38 (CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>); 67,69 (CH<sub>2</sub>OMEM); 62,72 (CH<sub>2</sub>O isopropylidène); 59,54 (CH<sub>3</sub>O); 53,88 (C-NH); 25,44 ; 23,22 (CH<sub>3</sub> isopropylidène).

#### **N-(5-(((2-méthoxyéthoxy)méthoxy)méthyl)-2,2-diméthyl-1,3-dioxan-5-yl)-N-méthylacrylamide 35**

3,251 g (10,73 mmoles) de THAM isopropylidèneOMEM **34**, 2,95 g (1,5 eq.) de tosylate de méthyle et 1,8 g (1,5 eq.) de *tertio*-Butylate de potassium sont mis en réaction dans 80 mL de THF anhydre. Après 1 h d'agitation, le milieu réactionnel est filtré, puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 6/4. Le produit **35** (2,9 g, 85 %) est obtenu sous forme d'une huile incolore.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,58 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,18 (1H, *dd*, =CH); 5,64 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,6-4,8 (2H, *s*, O-CH<sub>2</sub>-O, cis + trans); 4,05-4,27 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>O isopropylidène équatoriaux cis + trans); 3,98-4,04 (4H, *m*, CH<sub>2</sub>OMEM, CH<sub>2</sub>O isopropylidène axiaux cis + trans); 3,62-3,66 (2H, *m*, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>); 3,56-3,52 (2H, *m*, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> cis + trans); 3,39 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub> cis + trans); 3,18 (2,37 H, *s*, CH<sub>3</sub>-N); 3,11 (0,63H, *s*, CH<sub>3</sub>-N) 1,39 ; 1,40 (3H, *s*, CH<sub>3</sub> isopropylidène).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 169,08 ; 164,89 (CONH); 131,84 ; 131,48 (CH<sub>2</sub>=); 127,47 (CH=); 99,61 ; 99,52 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 96,32 ; 96,38 (O-CH<sub>2</sub>-O); 72,50 ; 72,40 (-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 68,44 ; 68,3 (CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>); 67,49 (CH<sub>2</sub>OMEM); 63,99 ; 63,85 (CH<sub>2</sub>O isopropylidène); 60,90 (CH<sub>3</sub>O); 59,71 (C-NH); 37,73 ; 34,74 (CH<sub>3</sub>-N); 24,3 ; 28,18 (CH<sub>3</sub> isopropylidène).

### **5-Acrylamido-5-triphénylméthoxy-méthyle-2,2-diméthyl-1,3-dioxane 36**

2,15 g (10 mmoles) de THAMisopropylidène **3**, 3,07 g (1,1 eq.) de chlorure de trityle et 3 mL de TEA (2 eq.) sont dissous dans 25 mL de THF anhydre. Après 16 h d'agitation, 50 mL d'éther sont ajoutés au milieu réactionnel sous forte agitation et à froid (eau + glace). La quasi-totalité des sels de TEA précipite. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite et le brut est repris dans 60 mL de dichlorométhane. La phase organique est lavée avec 60 mL d'une solution saturée en bicarbonate de sodium et 60 mL d'eau puis séchée sur sulfate de sodium et filtrée. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le brut est cristallisé dans AcOEt/hexane. Le produit **36** (3,89 g, 85 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

F = 169,5-170,1 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 7,24-7,44 (15H, *m*, H aromatiques); 6,2 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,00 (1H, *dd*, CH=); 5,62 (1H, *s*, NH); 5,6 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,43 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>-O éq. isopropylidène); 3,83 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>-O ax. isopropylidène); 3,55 (2H, *s*, CH<sub>2</sub>OTr); 1,51 ; 1,38 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 166,14 (CONH); 144,23 (CH<sub>2</sub>=); 131,95 (CH=); 129,27 ; 128,61; 127,88 ; 127,14 (C aromatiques); 99,14 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 87,44 (C(Φ)<sub>3</sub>); 63,66 (CH<sub>2</sub>OTr); 63,05 (CH<sub>2</sub>O isopropylidène); 54,53 (CNH); 24,98 ; 23,73 (CH<sub>3</sub>).

### **N-(2,2-diméthyl-5-((trityloxy)méthyl)-1,3-dioxan-5-yl)-N-méthylacrylamide 37**

2 g (4,38 mmoles) du composé **36** et 1,2 g (1,5 eq.) de tosylate de méthyle sont dissous dans 50 mL de THF anhydre. 0,735 g de *tertio*Butylate de potassium (1,5eq.) sont ajoutés à la solution qui est laissée sous agitation pendant 1 h (la réaction est suivie en CCM, éluant = AcOEt/Hexane 4/6). Lorsque la totalité du produit de départ a réagi, le milieu réactionnel est filtré et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 4/6. Le produit **37** (1,6 g, 77,6 %) est obtenu sous forme d'une huile incolore.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 7,14-7,34 (15H, *m*, H aromatiques); 6,53 (1H, *dd*, CH=); 6,08 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,57 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,22 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>-O éq. isopropylidène); 3,88 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>-O ax. Isopropylidène); 3,54 (2H, *s*, CH<sub>2</sub>OTr); 3,2 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>-N); 1,23 ; 1,31 (3H, *s*, CH<sub>3</sub> isopropylidène).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 168,83 (CONH); 144,44 (CH<sub>2</sub>=); 131,59 (CH=); 129,3 ; 128,63 ; 128,49 ; 127,76 (C aromatiques); 99,63 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 87,36 (C(Φ)<sub>3</sub>); 64,26 (CH<sub>2</sub>OTr); 64,16 (CH<sub>2</sub>O isopropylidène); 61,76 (C-N-CH<sub>3</sub>); 35,05 (CH<sub>3</sub>-N); 24,51 ; 24,2 (CH<sub>3</sub>).

### **5-Acrylamido-5-benzyloxyméthyl-2,2-diméthyl-1,3-dioxane 38**

2,15 g (10 mmoles) de THAM isopropylidène **3** sont dissous dans 10 mL de THF anhydre. 12 mL d'une solution 1N de *tertio*-Butylate dans le THF et 12 mL d'une solution 1M de bromure de benzyle (MM = 171, d = 1,435) sont ajoutés goutte à goutte au mélange réactionnel. Après 12 heures d'agitation (suivie de la réaction sur CCM : éluant = AcOEt), les sels sont éliminés par filtration et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut est repris dans 50 mL de dichlorométhane et la phase organique est lavée avec 100 mL d'eau puis elle est séchée sur sulfate de sodium. Le solvant est évaporé sous pression réduite. L'huile résiduelle est purifiée sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 7/3. Après cristallisation dans Ether/Hexane, le produit **38** (2,24 g, 73,4 %) est obtenu sous forme de cristaux blancs.

F = 77-78 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 7,35 ; 7,34 ; 7,33 ; 7,31 ; 7,30 ; 7,29 (5H, *m*, H aromatiques); 6,24 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,10 (1H, *dd*, =CH); 5,84 (1H, *s*, NH); 5,62 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,54 (2H, *s*, Φ-CH<sub>2</sub>-O); 4,37 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>O isopropylidène équatoriaux); 3,84 (4H, 1*s* + 1*dd*, CH<sub>2</sub>O isopropylidène axiaux, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>Φ); 1,40; 1,51 (3H, *s*, CH<sub>3</sub> isopropylidène).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 166,32 (CONH); 138,5 (CH<sub>2</sub>=); 131,87 (CH=); 129,13 ; 128,50 ; 128,33 ; 127,24 (C aromatiques); 99,18 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 74,18 (Φ-CH<sub>2</sub>-O); 70,43 (CH<sub>2</sub>O isopropylidène); 63,16 (CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>Φ); 54,25 (C-NH); 24,07; 24,58 (CH<sub>3</sub> isopropylidène).

### **2,2-diméthyl-5-hydroxyméthyl-5-propanamido-1,3-dioxane 39**

500 mg (1,64 mmoles) de composé **38** sont dissous dans 10 mL d'éthanol à 0 °C dans lesquels sont mis en suspension 100 mg de palladium sur charbon. Le milieu réactionnel est placé sous pression d'hydrogène (4 atm) durant 2 h. Le solvant est ensuite filtré sur célite puis évaporé sous pression réduite. Le brut est cristallisé dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexane. Le composé **39** (320 mg, 90 %) est obtenu sous forme de cristaux blancs.

F = 74-75,5 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,29 (1H, *s*, NH); 5,00 (1H, *s*, CH<sub>2</sub>OH); 3,8 (4H, *m*, CH<sub>2</sub>O isopropylidène); 3,64 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>OH); 2,29 (2H, *q*, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CO); 1,423 ; 1,421 (6H, 2*s*, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C); 1,16 (3H, *t*, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CO).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta(\text{ppm}) = 176,03$  ( $\text{NHCO}$ );  $99,53$  ( $(\text{CH}_3)_2\text{C}$ );  $65,04$  ( $\text{CH}_2\text{-OH}$  ou  $\text{CH}_2\text{O}$  isopropylidène);  $64,95$  ( $\text{CH}_2\text{-OH}$  ou  $\text{CH}_2\text{O}$  isopropylidène);  $55,54$  ( $\text{C-NH}$ );  $30,79$  ( $\text{CH}_2\text{CO}$ );  $28,44$  ;  $19,95$  ( $(\text{CH}_3)_2\text{C}$ );  $10,45$  ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}$ ).

#### **5-benzyloxyméthyl-2,2-diméthyl-5-(N-méthyl)acrylamido-1,3-dioxane 40**

1,94 g (6,36 mmoles) du composé **38**, 1,746 g (1,5 eq.) de tosylate de méthyle et 1,068 g (1,5 eq.) de *tertio*-Butylate de potassium sont dissous dans 50 mL de THF anhydre. Après 2 h d'agitation, le milieu réactionnel est filtré et les sels sont lavés à l'éther. Le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite et le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 3/7. Le composé **40** (1,8 g, 88,4 %) est obtenu sous forme d'une huile incolore.

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta(\text{ppm}) = 7,34$  ;  $7,33$  ;  $7,31$  ;  $7,29$  ;  $7,28$  (5H, *m*, H aromatiques);  $6,60$  (1H, *dd*, =CH);  $6,18$  (1H, *dd*,  $\text{CH}_2=$ );  $5,64$  (1H, *dd*,  $\text{CH}_2=$ );  $4,49$  (2H, *s*,  $\Phi\text{CH}_2\text{O}$ );  $4,25$  (2H, *d*,  $\text{CH}_2\text{O}$  isopropylidène équatoriaux);  $3,84$  (4H, *1s* + *1dd*,  $\text{CH}_2\text{O}$  isopropylidène axiaux,  $\text{CH}_2\text{OCH}_2\Phi$ );  $3,19$  (3H, *s*,  $\text{CH}_3\text{-N}$ );  $1,41$  ;  $1,38$  (3H, *s*,  $\text{CH}_3$  isopropylidène).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta(\text{ppm}) = 169,18$  ( $\text{CH}_3\text{NCO}$ );  $139,02$  ( $\text{CH}_2=$ );  $131,58$  ( $\text{CH}=-$ );  $129,13$  ;  $127,35$  ;  $128,013$  ;  $128,2$  ;  $129,00$  (C aromatiques);  $99,60$  ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ );  $74,02$  ( $\Phi\text{CH}_2\text{-O}$ );  $70,98$  ( $\text{CH}_2\text{O}$  isopropylidène);  $63,90$  ( $\text{CH}_2\text{OCH}_2\Phi$ );  $61,31$  ( $\text{C-N-CH}_3$ );  $34,90$  ( $\text{CH}_3\text{-N}$ );  $24,28$  ;  $24,37$  ( $\text{CH}_3$  isopropylidène).

#### **Isocyanate d'hept-1-yle 41**

Dans un ballon tricol de 500 mL, 12 g (184 mmoles) d'azoture de sodium sont dissous dans 35 mL d'eau. 20 g (123 mmoles) de chlorure de capryloyle sont dissous dans 60 mL d'acétone et additionnés goutte à goutte au milieu réactionnel en maintenant la température comprise entre 7 et 10 °C. Lorsque le chlorure d'acide a été entièrement additionné, le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 1 h à la même température. Par la suite, sont versés sous forte agitation 150 mL d'hexane froid (température inférieure ou égale à 10 °C) pour extraire l'azidure d'acyle. La phase organique est alors séparée de la phase aqueuse par décantation, puis séchée sur sulfate de sodium. Après filtration, le filtrat est transvasé dans une ampoule à brome que l'on adapte à un ballon bicol de 50 mL, surmonté d'un montage de distillation. Le milieu est maintenu sous atmosphère d'azote et 20 mL de la solution contenue dans l'ampoule sont déversés dans le ballon et portés à ébullition. Le reste de la solution est alors ajouté goutte à goutte. Une fois la totalité du solvant évaporée, l'isocyanate est distillé sous pression réduite (pompe à membrane). L'isocyanate **41** (14 g, 80 %) obtenu est un liquide incolore.

$T_{\text{eb}} = 50 \text{ }^{\circ}\text{C}/0,01\text{mm Hg}$

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta(\text{ppm}) = 3,28$  (2H, *t*,  $\text{CH}_2\text{-NCO}$ ); 1,58 (2H, *m*,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 1,32 (8H, *m*,  $-\text{CH}_2-$ ); 0,89 (3H, *t*,  $\text{CH}_3$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta(\text{ppm}) = 42,9$  ( $\text{CH}_2\text{NCO}$ ); 22,81-31,00 ( $-\text{CH}_2-$ ); 14,13 ( $\text{CH}_3$ ).

### **Isocyanate d'undéc-1-yle 42**

Procédé de synthèse identique à celui exposé précédemment. La réaction est effectuée avec 30 g (137 mmoles) de chlorure de lauryloyle et 13,4 g (206 mmoles) d'azidure de sodium. Après purification par distillation sous vide (pompe à palette) l'isocyanate **42** (21,7 g, 80 %) obtenu est un liquide incolore.

$T_{\text{eb}} = 124 \text{ }^{\circ}\text{C}/0,01 \text{ mm Hg}$

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta(\text{ppm}) = 3,28$  (2H, *t*,  $\text{CH}_2\text{-NCO}$ ); 1,58 (2H, *m*,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 1,28 (16H, *m*,  $-\text{CH}_2-$ ); 0,89 (3H, *t*,  $\text{CH}_3$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta(\text{ppm}) = 43,2$  ( $\text{CH}_2\text{NCO}$ ); 22,6-32,1 ( $-\text{CH}_2-$ ); 14,0 ( $\text{CH}_3$ ).

### **Isocyanate d'heptadéc-1-yle 43**

Procédés de synthèse et de purification identiques à ceux du composé **42**. La réaction est effectuée sur 89,7 g (296 mmoles) de chlorure de stéaryle et 28,8 g (443 mmoles) d'azoture de sodium.

L'isocyanate **43** (75 g, 90 %) obtenu est un solide blanc.

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta(\text{ppm}) = 3,27$  (2H, *t*,  $\text{CH}_2\text{NCO}$ ); 1,65 (2H, *m*,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCO}$ ); 1,21 (28 H, *s*,  $-\text{CH}_2-$ ); 0,88 (3H, *t*,  $\text{CH}_3$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta(\text{ppm}) = 43,05$  ( $\text{CH}_2\text{NCO}$ ); 22,78-31,04 ( $-\text{CH}_2-$ ); 14,14 ( $\text{CH}_3$ ).

### **Isocyanate de 1H,1H,2H,2H-perfluorooct-1-yle 44**

Procédés de synthèse et de purification identiques à ceux du composé **42**. Réaction réalisée avec 3 g (7,3 mmoles) de chlorure d'acide et 0,712 g (10,95 mmoles) d'azoture de sodium. L'isocyanate **44** (2,6 g, 90 %) obtenu est un liquide incolore.

$T_{\text{eb}} = 88 \text{ }^{\circ}\text{C}/0,01 \text{ mm Hg}$

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta(\text{ppm}) = 3,68$  (2H, *t*,  $\text{CH}_2\text{NCO}$ ); 2,43 (2H, *m*,  $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{F}_{13}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta(\text{ppm}) = 109,25\text{-}119,73$  ( $\text{C}_6\text{F}_{13}$ ); 35,42 ( $\text{CH}_2\text{NCO}$ ); 32,8 ( $\text{CH}_2\text{C}_6\text{F}_{13}$ ).

**RMN  $^{19}\text{F}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta(\text{ppm}) = -81,27$  ; -115,12 ; -122,23 à -123,91 ; -126,67.



### **Isocyanate de 1H,1H,2H,2H-perfluorodéc-1-yle 45**

Procédés de synthèse et de purification identiques à ceux du composé **42**. La réaction est réalisée avec 10 g (19,6 mmoles) de chlorure d'acide et 1,911 g (29,4 mmoles) d'azoture de sodium. L'isocyanate **45** (5,8 g, 60 %) obtenu est un liquide incolore à température ambiante.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = 3,67 (2H, t, CH<sub>2</sub>NCO); 2,42 (2H, m, CH<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = 110,53-119,70 (C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>); 35,4 (CH<sub>2</sub>NCO); 32,78 (CH<sub>2</sub>C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>).

**RMN <sup>19</sup>F** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = -81,43 ; -114,93 ; -122,16 à -124,07 ; -126,66.

### **5-Acrylamido-2,2-diméthyl-5-(hept-1-yl-carbamoyloxy)méthyl-1,3-dioxane 46**

Dans un ballon bicol de 250 mL sont dissous 6,45 g (30 mmoles) de THAM isopropylidène **3** et 4,68 g (1,1 équivalent) d'heptylisocyanate dans 100 ml de toluène fraîchement distillé et placé sous atmosphère d'azote. A l'aide d'un bain de sable thermostaté, la température du milieu réactionnel est maintenue à 50°C et 100 mg de DABCO sont ajoutés. La réaction est suivie en CCM (AcOEt et AcOEt/Hexane 7/3). Après 3 heures de réaction, la totalité du produit de départ a disparu. Le milieu réactionnel est alors concentré, puis repris dans l'acétate d'éthyle. L'urée ayant précipité est éliminée par filtration et le filtrat est concentré. La solution est filtrée sur gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 7/3 et le carbamate est par la suite précipité dans le n-hexane sous forte agitation. Le produit **46** (9,28 g, 87 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

F = 82-83,5 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = 6,99 (1H, s, NH); 6,23 (1H, d, CH<sub>2</sub>=); 6,05 (1H, dd, =CH); 5,62 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 5,08 (1H, t, NHCH<sub>2</sub>); 4,68 (2H, d, CH<sub>2</sub>O équatoriaux); 4,47 (2H, d, CH<sub>2</sub>-OCONH); 3,63 (2H, d, CH<sub>2</sub>O axiaux); 3,17 (2H, q, CH<sub>2</sub>NH); 1,6 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1,5 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,41 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1,29 (10 H, s, CH<sub>2</sub>); 0,88 (3H, t, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = 166,32 (NHCO du tris); 158,19 (NHCO uréthane); 132,1 (CH<sub>2</sub>=); 127 (CH=); 99,17 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 65,46 (CH<sub>2</sub>-OCONH); 61,3 (CH<sub>2</sub>O); 54,13 (CNH); 41,93 (CH<sub>2</sub>NH); 32,33 ; 30,43 ; 29,51 ; 27,28 ; 23,18 (-CH<sub>2</sub>-); 26,96 ; 21,81 (CH<sub>3</sub> isopropylidène); 14,12 (CH<sub>3</sub>).

### **5-Acrylamido-2,2-diméthyl-5-(undéc-1-yl-carbamoyloxy)méthyl-1,3-dioxane 47**

Le procédé de synthèse est le même que celui exposé précédemment pour le composé **46**. La réaction est réalisée avec 2,49 g (11,6 mmoles) de THAM isopropylidène et 2,75 g (13,96 mmoles) d'isocyanate. Le produit est purifié sur colonne de gel de silice par flash chromatographie avec l'éluant AcOEt/Hexane 7/3, puis précipité à froid dans 20 mL du mélange AcOEt/hexane 1/1. Le produit **47** (4,72 g, 90 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

F = 84,5 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,96 (1H, *s*, NH); 6,23 (1H, *d*, CH<sub>2</sub>=); 6,08 (1H, *dd*, =CH); 5,62 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,92 (1H, *t*, NHCH<sub>2</sub>); 4,71 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>O équatoriaux); 4,47 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>-OCONH); 3,61 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>O axiaux); 3,17 (2H, *q*, CH<sub>2</sub>NH); 1,61 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>); 1,5 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,41 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>); 1,25 (18H, *s*, CH<sub>2</sub>); 0,88 (3H, *t*, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 166,34 (NHCO du Tris); 158,24 (NHCO uréthane); 132,17 (CH<sub>2</sub>=); 127 (CH=); 99,22 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 65,59 (CH<sub>2</sub>-OCONH); 61,31 (CH<sub>2</sub>O); 54,2 (CNH); 42,0 (CH<sub>2</sub>NH); 32,57 ; 30,49 ; 30,25 ; 30,19 ; 29,99 ; 27,38 ; 23,34 (-CH<sub>2</sub>-); 27,1 ; 21,78 (CH<sub>3</sub> isopropylidène); 14,77 (CH<sub>3</sub>).

#### **5-Acrylamido-2,2-diméthyl-5-(heptadéc-1-yl-carbamoyloxy)méthyl-1,3-dioxane 47**

Le procédé de synthèse est le même que celui exposé pour le composé **46**.

La réaction est lancée sur 4,47 g (20,9 mmoles) de THAM isopropylidène et 6,42 g (22,84 mmoles) d'heptadécylisocyanate. Le produit est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/hexane 1/1. L'uréthane **48** (9,27 g, 90 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

F = 91,6° C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,97 (1H, *s*, NH); 6,23 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,05 (1H, *dd*, =CH) ; 5,62 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,90 (1H, *t*, NHCH<sub>2</sub>); 4,72 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>O équatoriaux); 4,46 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>OCONH); 3,61 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>O axiaux); 3,19 (2H, *q*, CH<sub>2</sub>NH); 1,61 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>); 1,49 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,41 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>); 1,25 (30 H, *s*, CH<sub>2</sub>); 0,88 (3H, *t*, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 165,75 (NHCO du tris); 157,4 (NHCO uréthane); 131,51 (CH<sub>2</sub>=); 126,32 (CH=); 98,56 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 64,74 (CH<sub>2</sub>-OCONH); 60,86 (CH<sub>2</sub>O); 53,53 (CNH); 41,33 (CH<sub>2</sub>NH); 21,4-31,94 (-CH<sub>2</sub>- + CH<sub>3</sub> isopropylidène); 14,12 (CH<sub>3</sub>).

#### **5-acrylamido-2,2-diméthyl-5-(1H,1H,2H,2H-perfluorooct-1-yl-carbamoyloxy)méthyl-1,3-dioxane 49**

Le procédé de synthèse est le même que celui exposé pour le composé **46**. La réaction est réalisée avec 1,06 g (4,93 mmoles) de THAM isopropylidène et 2,2 g (5,83 mmoles) d'isocyanate. Après 15 minutes de réaction, il y a formation d'un gel et la totalité du produit de départ a disparu (suivie de la réaction en CCM AcOEt/hexane 1/1). Le milieu réactionnel est repris dans l'acétate d'éthyle, puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Après purification sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/hexane 1/1. L'uréthane **49** (2,654 g, 81,4 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

F = 128,4 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,62 (1H, *s*, NH); 6,25 (2H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,1 (1H, *dd*, =CH); 5,68 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,21 (1H, *t*, NHCH<sub>2</sub>); 4,58 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>O équatoriaux); 4,54 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>-OCONH); 3,67 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>O axiaux); 3,52 (2H, *q*, CH<sub>2</sub>NH); 2,68 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>); 1,57 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>); 1,42 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 165,75 (NHCO du tris); 157,22 (NHCO uréthane); 131,36 (CH<sub>2</sub>=); 126,6 (CH=); 120,06-109,93 (C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>); 98,75 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 65,15 (CH<sub>2</sub>OCONH); 61,17 (CH<sub>2</sub>O); 53,6 (CNH); 33,83 (CH<sub>2</sub>NH); 31,19 (-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>); 25,57 ; 21,91 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN <sup>19</sup>F** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = -81,26; -114,46; -122,35; -123,35; -124,12; -126,61.

### **5-acrylamido-2,2-diméthyl-5-(1H,1H,2H,2H-perfluorodéc-1-yl-carbamoyloxy)méthyl-1,3-dioxane 50**

Le procédé de synthèse est le même que celui exposé pour le composé **46**. La réaction est réalisée avec 1,5 g (6,97mmoles) de THAM isopropylidène et 4,142 g (8,6 mmoles) d'isocyanate. Après 15 minutes de réaction, il y a formation d'un gel et la totalité du produit de départ a disparu (suivie de la réaction en CCM AcOEt/Hexane 1/1). Le milieu réactionnel est repris dans l'acétate d'éthyle et le solvant est évaporé sous pression réduite. Après purification sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/hexane 1/1. L'uréthane **50** (4,67 g, 95 %) est obtenu sous forme de poudre blanche. F = 136,3 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,63 (1H, *s*, NH); 5,99-6,28 (2H, *m*, 1 CH<sub>2</sub>= + =CH); 5,63 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,18 (1H, *t*, NHCH<sub>2</sub>); 4,6 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>O équatoriaux); 4,55 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>-OCONH); 3,65 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>O axiaux); 3,55 (2H, *q*, CH<sub>2</sub>NH); 2,37 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>); 1,58 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>); 1,42 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 165,75 (NHCO du tris); 157,15 (NHCO uréthane); 131,30 (CH<sub>2</sub>=); 126,63 (CH=); 120,05-105,93 (C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>); 98,73 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 65,06 (CH<sub>2</sub>-OCONH); 61,17 (CH<sub>2</sub>O); 53,54 (CNH); 33,78 (CH<sub>2</sub>NH); 31,15 (-CH<sub>2</sub>C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>); 25,48 ; 21,91 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN <sup>19</sup>F** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = -81.28 ; -114.45 ; -122.15 à -124.03 ; -126.60.

### **1-Acrylamido-1-(hept-1-yl-carbamoyloxy)méthyl-1,1-bis(hydroxyméthyl)méthane 51**

9,278 g (26 mmoles) de produit protégé **46** sont dissous dans 400 mL de dichlorométhane et 65 g de montmorillonite K 10 (2,5g/mmmole de produit à déprotéger) sont ajoutés sous forte agitation. La réaction est suivie en CCM avec l'éluant AcOEt/hexane 7/3 et après 12 heures d'agitation, le milieu réactionnel est filtré sur célite. La montmorillonite est reprise dans 200 mL de méthanol puis filtrée de nouveau sur célite. L'opération est répétée encore une fois puis les filtrats sont joints et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut est chromatographié sur colonne de gel de

silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 9/1. Après trituration dans le n-hexane, le produit **51** (7 g, 85 %) sous forme d'une poudre blanche.

F = 84-84,4 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,65 (1H, *s*, NH); 6,31 (1H, *d*, CH<sub>2</sub>=); 6,12 (1H, *dd*, =CH); 5,70 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,18 (1H, *t*, NHCH<sub>2</sub>); 4,70 (2H, *t*, CH<sub>2</sub>OH); 4,31 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>-OCONH); 3,68 (2H, *dd*, CH<sub>2</sub>OH); 3,53 (2H, *dd*, CH<sub>2</sub>OH); 3,17 (2H, *q*, CH<sub>2</sub>NH); 1,5 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,28 (10 H, *m*, CH<sub>2</sub>); 0,88 (3H, *t*, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 167,47 (NHCO du tris); 158,3 (NHCO uréthane); 131,22 (CH<sub>2</sub>=); 128,43 (CH=); 63,13 ; 63,01 ; 62,55 (CH<sub>2</sub>-OCONH, CH<sub>2</sub>OH, CNH); 41,97 (CH<sub>2</sub>NH); 32,36 ; 30,40 ; 29,53 ; 27,30 ; 23,21 (-CH<sub>2</sub>-); 14,68 (CH<sub>3</sub>).

### **1-Acrylamido-1,1-bis(hydroxyméthyl)-1-(undéc-1-yl-carbamoyloxy)méthylméthane 52**

Le procédé de déprotection reste le même que celui décrit pour le composé **51**. La réaction est réalisée avec 5 g (12,13 mmoles) de produit **47** avec 30,33 g de montmorillonite K 10. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/hexane 7/3, puis repris dans un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane/n-hexane 1/1/0,1. Le produit **52** (4 g, 88,7 %) précipite à froid pour donner une poudre blanche.

F = 53-54 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,78 (1H, *s*, NH); 6,25 (1H, *d*, CH<sub>2</sub>=); 6,13 (1H, *dd*, =CH); 5,67 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,45 (1H, *t*, NHCH<sub>2</sub>); 4,80 (2H, *t*, CH<sub>2</sub>OH); 4,27 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>O-CONH); 3,68 (2H, *dd*, CH<sub>2</sub>OH); 3,55 (2H, *dd*, CH<sub>2</sub>OH); 3,12 (2H, *q*, CH<sub>2</sub>NH); 1,46 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,23 (18 H, *m*, CH<sub>2</sub>); 0,85 (3H, *t*, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 167,52 (NHCO du tris); 158,2 (NHCO uréthane); 131,28 (CH<sub>2</sub>=); 128,27 (CH=); 63,09-62,91 (CH<sub>2</sub>-OCONH, CH<sub>2</sub>OH, CNH); 41,94 (CH<sub>2</sub>NH); 32,50 ; 30,39 ; 30,2 ; 30,15 ; 29,93 ; 29,87 ; 27,30 ; 23,21 (-CH<sub>2</sub>-); 14,70 (CH<sub>3</sub>).

### **1-Acrylamido-1-(heptadéc-1-yl-carbamoyloxy)méthyl-1,1-bis(hydroxyméthyl)méthane 53**

Le procédé de déprotection reste le même que celui décrit pour le composé **51**. La réaction est réalisée avec 4 g (8 mmoles) de produit **48** avec 20 g de montmorillonite K 10. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 5/5, puis repris dans un mélange AcOEt/n-hexane 1/9. Le produit **53** (3,1 g, 85 %) précipite à froid pour donner une poudre blanche.

F = 60-61 °C

**RMN <sup>1</sup>H**(CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,73 (1H, *s*, NH); 6,30 (1H, *d*, CH<sub>2</sub>=); 6,15 (1H, *dd*, =CH); 5,70 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,31 (1H, *t*, NHCH<sub>2</sub>); 4,75 (2H, *s*, CH<sub>2</sub>OH); 4,38 (2H, *s*, CH<sub>2</sub>-OCONH); 3,61 (4H, *dd*, CH<sub>2</sub>OH); 3,16 (2H, *q*, CH<sub>2</sub>NH); 1,5 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,35 (30 H, *s*, CH<sub>2</sub>); 0,88 (3H, *t*, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C**(CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 165,97 (NHCO du tris); 157,58 (NHCO uréthane); 130,68 (CH<sub>2</sub>=); 127,61 (CH=); 62,44-62,28 (CH<sub>2</sub>-OCONH, CH<sub>2</sub>OH, CNH); 41,33 (CH<sub>2</sub>NH); 22,70-31,94 (-CH<sub>2</sub>-); 14,12 (CH<sub>3</sub>).

#### **1-Acrylamido-1,1-bis(hydroxyméthyl)-1-(1H,1H,2H,2H-perfluorooct-1-yl-carbamoyloxy)méthylméthane 54**

Le procédé de déprotection reste le même que celui décrit pour le composé **51**. La réaction est effectuée avec 2,6 g (4,3 mmoles) de produit **49** et 11 g de montmorillonite K 10. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt pur. Le produit **54** (2 g, 82 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

**RMN <sup>1</sup>H** (DMSO) δ(ppm) = 7,54 (1H, *s*, NH); 7,35 (1H, *t*, NHCH<sub>2</sub>); 6,36 (1H, *dd*, =CH); 6,06 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,56 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,86 (2H, *t*, CH<sub>2</sub>OH); 4,23 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>-OCONH); 3,63 (4H, *d*, CH<sub>2</sub>OH); 3,30 (2H, *q*, CH<sub>2</sub>NH); 2,43 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (DMSO) δ(ppm) = 165,43 (NHCO du tris); 161,66 (NHCO uréthane); 137,29 (CH<sub>2</sub>=); 130,04 (CH=); 124,52-113,38 (C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>); 67,82 (CH<sub>2</sub>-OCONH); 65,27 ; 64,97 (CH<sub>2</sub>OH, CNH); 38,13 (CH<sub>2</sub>NH); 35,76 (-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>).

**RMN <sup>19</sup>F** (DMSO) δ(ppm) = -79,88 ; -112,35 ; -120,97 à -123,02 ; -125,14.

#### **1-Acrylamido-1,1-bis(hydroxyméthyl)-1-(1H,1H,2H,2H-perfluorodéc-1-yl-carbamoyloxy)méthylméthane 55**

Le procédé de déprotection reste le même que celui décrit pour le composé **51**. La réaction est effectuée avec 1,5 g (2,1 mmoles) de produit **50** et 5,3 g de montmorillonite K 10 dans 170 mL d'acétate d'éthyle. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt pur. Le produit **55** (1,03 g, 72,7 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

**RMN <sup>1</sup>H** (DMSO) δ(ppm) = 7,54 (1H, *s*, NH); 7,34 (1H, *t*, NHCH<sub>2</sub>); 6,36 (1H, *dd*, =CH); 6,06 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>); 5,56 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,86 (2H, *t*, CH<sub>2</sub>OH); 4,22 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>-OCONH); 3,62 (4H, *d*, CH<sub>2</sub>OH); 3,29 (2H, *q*, CH<sub>2</sub>NH); 2,40 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (DMSO) δ(ppm) = 165,82 (NHCO du tris); 161,67 (NHCO uréthane); 137,29 (CH<sub>2</sub>=); 129,89 (CH=); 118,43-125,93 (C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>); 67,81 (CH<sub>2</sub>-OCONH); 64,49 ; 64,93 (CH<sub>2</sub>OH, CNH); 38,10 (CH<sub>2</sub>NH); 35,77 (-CH<sub>2</sub>C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>).

**RMN <sup>19</sup>F** (DMSO) δ(ppm) = -79,85 ; -112,25 ; -119,61 à -123,03 ; -125,46.

### **1-Acrylamido-1,1-bis(acétoxyméthyl)-1-(hept-1-yl-carbamoyloxy)méthylméthane 56**

3,3 g (10,44 mmoles) de produit **51** sont dissous dans 40 mL d'un mélange anhydre acétique/pyridine 1/1 refroidi préalablement à 0 °C. La température est maintenue à 0 °C pendant 15 minutes, puis le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 12 h à température ambiante. Il est ensuite versé dans 200 mL d'eau glacée et la phase aqueuse dans laquelle le produit a précipité est extraite avec 100 mL de dichlorométhane. La phase organique est lavée successivement avec 2 x 100 mL d'une solution saturée en bicarbonate de sodium, puis 100 mL d'eau, 100 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 1N et 100 mL d'eau. Elle est ensuite séchée sur sulfate de sodium, puis filtrée et concentrée sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 7/3. Après trituration dans le n-hexane le produit **56** (1,03 g, 98 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

F = 83-84 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,7 (1H, *s*, NH); 6,24 (1H, *d*, CH<sub>2</sub>=); 6,07 (1H, *dd*, =CH); 5,65 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,96 (1H, *t*, NHCH<sub>2</sub>); 4,52 (4H, *s*, CH<sub>2</sub>OAc); 4,39 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>-OCONH); 3,17 (2H, *q*, CH<sub>2</sub>NH); 2,08 (6H, *s*, CH<sub>3</sub>CO); 1,5 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,28 (10 H, *m*, CH<sub>2</sub>); 0,88 (3H, *t*, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 171,22 (CH<sub>3</sub>C=O); 166,26 (NHCO du tris); 157,34 (NHCO uréthane); 131,79 (CH<sub>2</sub>=); 127,39 (CH=); 64,6 (CH<sub>2</sub>-OCONH); 63,19 (CH<sub>2</sub>OAc); 59,39 (CNH); 41,96 (CH<sub>2</sub>NH); 32,36 ; 30,47 ; 29,55 ; 27,31 ; 23,22 (-CH<sub>2</sub>-); 21,43 (CH<sub>3</sub>CO); 14,69 (CH<sub>3</sub>).

### **1-Acrylamido-1,1-bis(acétoxyméthyl)-1-(undéc-1-yl-carbamoyloxy)méthylméthane 57**

Le procédé d'acétylation reste le même que celui décrit pour le composé **56**. La réaction est effectuée avec 3,3 g (8,87 mmoles) de produit **52** dans 20 mL Ac<sub>2</sub>O/pyridine 1/1. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/hexane 6/4 puis repris dans un minimum de dichlorométhane. Le produit **57** (3,72 g, 92 %) est trituré dans le n-hexane pour donner une poudre blanche.

F = 100-101,2 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,66 (1H, *s*, NH); 6,24 (1H, *d*, CH<sub>2</sub>=); 6,06 (1H, *dd*, =CH); 5,65 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,84 (1H, *t*, NHCH<sub>2</sub>); 4,53 (4H, *s*, CH<sub>2</sub>OAc); 4,39 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>OCONH); 3,17 (2H, *q*, CH<sub>2</sub>NH); 2,08 (6H, *s*, CH<sub>3</sub>CO); 1,5 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,26 (18 H, *m*, CH<sub>2</sub>); 0,88 (3H, *t*, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 171,26 (CH<sub>3</sub>C=O); 166,26 (NHCO du tris); 157,36 (NHCO uréthane); 131,81 (CH<sub>2</sub>=); 127,43 (CH=); 64,68 (CH<sub>2</sub>-OCONH); 63,22 (CH<sub>2</sub>OAc); 59,44 (CNH); 42 (CH<sub>2</sub>NH); 32,57 ; 30,5 ; 30,27 ; 30,19 ; 29,99 ; 29,93 ; 27,39 ; 23,36 (CH<sub>2</sub>-); 21,46 (CH<sub>3</sub>CO); 14,78 (CH<sub>3</sub>).

### **1-Acrylamido-1,1-bis(acétoxyméthyl)-1-(heptadéc-1-yl-carbamoyloxy)méthylméthane 58**

Le procédé d'acétylation reste le même que celui décrit pour le composé **56**. La réaction est réalisée avec 2,94 g (6,44 mmoles) de produit **53** dans 20 mL Ac<sub>2</sub>O/pyridine 1/1. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/hexane 1/1 puis repris dans un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/n-hexane 2/8. Le produit **58** (3 g, 86,3 %) précipite à froid pour donner une poudre blanche.

F = 101,8° C

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,71 (1H, *s*, NH); 6,32 (1H, *d*, CH<sub>2</sub>=); 6,08 (1H, *dd*, =CH); 5,64 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 4,97 (1H, *t*, NHCH<sub>2</sub>); 4,52 (4H, *s*, CH<sub>2</sub>OAc); 4,39 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>- OCONH); 3,17 (2H, *q*, CH<sub>2</sub>NH); 2,07 (6H, *s*, CH<sub>3</sub>CO); 1,5 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,25 (30 H, *m*, CH<sub>2</sub>); 0,88 (3H, *t*, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 170,58 (CH<sub>3</sub>C=O); 166,28 (NHCO du tris); 157,38 (NHCO uréthane); 131,83 (CH<sub>2</sub>=); 127,46 (CH=); 64,7 (CH<sub>2</sub>-OCONH); 63,25 (CH<sub>2</sub>OAc); 59,47 (CNH); 42,03 (CH<sub>2</sub>NH); 32,62 ; 30,53 ; 30,4 ; 30,29 ; 30,24 ; 30,07 ; 29,96 ; 27,42 ; 23,39 (-CH<sub>2</sub>-); 21,49 (CH<sub>3</sub>CO); 14,82 (CH<sub>3</sub>).

### **1-Acrylamido-1,1-bis(acétoxyméthyl)-1-(1H,1H,2H,2H-perfluorooct-1-yl-carbamoyloxy)-méthylméthane 59**

Le procédé d'acétylation reste le même que celui décrit pour le composé **56**. La réaction est réalisée avec 2 g (3,55 mmoles) de produit **54** dans 30 mL de mélange Ac<sub>2</sub>O/pyridine 1/1. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/hexane 5,5/4,5. Le produit **59** (2,44 g, 86,4 %) est obtenu sous forme de poudre blanche après précipitation dans le mélange AcOEt/hexane 8/2.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,43 (1H, *s*, NH); 6,25 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,07 (1H, *dd*, =CH); 5,65 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,19 (1H, *t*, NHCH<sub>2</sub>); 4,50 (4H, *s*, CH<sub>2</sub>OAc); 4,45 (2H, *s*, CH<sub>2</sub>OCONH); 3,54 (2H, *q*, CH<sub>2</sub>NH); 2,37 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>); 2,09 (6H, *s*, CH<sub>3</sub>CO).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 170,67 (CH<sub>3</sub>C=O); 165,66 (NHCO du Tris); 156,32 (NHCO uréthane); 131,00 (CH<sub>2</sub>=); 127,00 (CH=); 114,68-120,04 (C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>); 64,01 (CH<sub>2</sub>-OCONH); 62,65 (CH<sub>2</sub>OAc); 58,76 (CNH); 33,76 (CH<sub>2</sub>NH); 31,14 (-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>); 20,74 (CH<sub>3</sub>CO).

**RMN <sup>19</sup>F** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = -81,3 ; -114,51 ; -122,37 ; -123,37 ; -124,12 ; -126,60.

### **1-Acrylamido-1,1-bis(acétoxyméthyl)-1-(1H,1H,2H,2H-perfluorodéc-1-yl-carbamoyloxy)-méthylméthane 60**

Le procédé d'acétylation reste le même que celui décrit pour le composé **56**. La réaction est effectuée avec 2,34 g (3,52 mmoles) de produit **55** dans 30 mL de mélange Ac<sub>2</sub>O/pyridine 1/1. Le

brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/hexane 5,5/4,5. Le produit **60** (2,38 g, 90,3 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,48 (1H, s, NH); 6,24 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 6,07 (1H, dd, =CH); 5,68 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 5,30 (1H, t, NHCH<sub>2</sub>); 4,50 (4H, s, CH<sub>2</sub>OAc); 4,46 (2H, s, CH<sub>2</sub>OC(=O)NH); 3,53 (2H, q, CH<sub>2</sub>NH); 2,37 (2H, m, CH<sub>2</sub>C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>); 2,08 (6H, s, CH<sub>3</sub>CO).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 170,71 (CH<sub>3</sub>C=O); 165,75 (NHCO du tris); 156,38 (NHCO uréthane); 131,05 (CH<sub>2</sub>=); 126,99 (CH=); 107,03-120,73 (C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>); 63,96 (CH<sub>2</sub>-OC(=O)NH); 62,66 (CH<sub>2</sub>OAc); 58,76 (CNH); 33,77 (CH<sub>2</sub>NH); 31,16 (-CH<sub>2</sub>C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>); 20,74 (CH<sub>3</sub>CO).

**RMN <sup>19</sup>F** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = -81,26 ; -114,53 ; -122,18 à -124,07 ; -126,60.

### **5-Acrylamido-2,2-diméthyl-5-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-galactopyranosyloxy)méthyl-1,3-dioxane 61**

Dans un ballon bicol de 250 ml sont dissous, sous forte agitation, dans 100 mL d'acétonitrile fraîchement distillé, 5 g (23,25 mmoles) de THAM isopropylidène **3** et 8,81 g (34,9 mmoles, 1,5 eq.) de cyanure mercurique en présence de drierite (3 spatules). Le milieu réactionnel est dégazé par un courant d'azote et au bout de 10 minutes 14,27 g (34,9 mmoles, 1,5 eq.) d'acétobromogalactose sont ajoutés. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation et sous atmosphère d'azote durant 12 h (la réaction est suivie en CCM éluant = AcOEt), puis il est filtré sur célite et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut est repris dans 50 mL d'acétate d'éthyle et les sels de mercure précipitent.

Le brut est filtré de nouveau sous pression réduite et le volume du solvant est ajusté à 150 mL. La phase organique est lavée successivement avec une solution saturée en bicarbonate de sodium (2 x 50 mL), de l'eau (50 mL), une solution d'iodure de potassium à 10 % (4 x 50 mL), une solution saturée en thiosulfate de sodium (4 x 50 mL) et de l'eau (2 x 50 mL). Elle est ensuite séchée sur sulfate de sodium, puis concentrée sous pression réduite. L'huile résiduelle est purifiée sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/hexane 7/3. Le produit **61** (7,09 g, 56 %) sous forme de poudre blanche.

F = 45-46°C

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> = -1,5 (c, 1, CHCl<sub>3</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,2 (2H, dd, CH<sub>2</sub>=, CH=); 5,9 (1H, s, NH); 5,69 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 5,4 (1H, d, H<sub>4</sub>); 5,17 (1H, dd, H<sub>3</sub>); 5,04 (1H, dd, H<sub>2</sub>); 4,44 (1H, d, H<sub>1</sub>); 4,38 (1H, d, H<sub>5</sub>); 4,2 (4H, m, CH<sub>2</sub>O isopropylidène); 3,9 (4H, m, CH<sub>2</sub>OGal, H<sub>6</sub>); 2,05 (12H, 4s, CH<sub>3</sub>CO); 1,42 (6H, 2s, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 170,33 ; 170,14 ; 169,98 ; 169,56 (CH<sub>3</sub>C=O); 165,74 (CONH); 131,16 (CH<sub>2</sub>=); 126,72 (CH=); 101,61 (C<sub>1</sub>, anomère β); 98,61 (C(Me)<sub>2</sub>); 70,9 (C<sub>5</sub> ou C<sub>3</sub>); 70,65 (C<sub>5</sub> ou



C<sub>3</sub>); 69,48 (C<sub>2</sub>); 68,89 (CH<sub>2</sub>OGal); 67,06 (C<sub>4</sub>); 62,90 (C<sub>6</sub>); 61,86 (CH<sub>2</sub>O isopropylidène); 61,28 (CH<sub>2</sub>O isopropylidène); 53,25 (CNH); 23,81 ; 23,43 (CH<sub>3</sub>); 20,77 ; 20,63 ; 20,51 (CH<sub>3</sub>CO).

**N-[2,2-dihydroxyméthyl-1-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-galactopyranosyloxy)prop-3-yl]-acrylamide 62**

3 g (5,5 mmoles) de THAM isopropylidène galactosylé **61** sont dissous dans 100 mL de dichlorométhane et 8,5 g de montmorillonite K10 (1,5 g/mmele de produit à déprotéger) sont ajoutés sous forte agitation. La réaction est suivie en CCM avec l'éluant AcOEt/hexane 7/3 et au bout de 4 heures de réaction, le milieu réactionnel est filtré sur Célite. La montmorillonite est extraite avec 100 mL de méthanol et, après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite. L'huile résiduelle est purifiée par chromatographie flash sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt pur. Le produit **62** (2,6 g, 93,8 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

F = 46-47 °C

$[\alpha]_D^{20} = -6,0$  (c, 1, CHCl<sub>3</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,61 (1H, s, NH) ; 6,33 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 6,18 (1H, dd, CH=); 5,73 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 5,4 (1H, d, H<sub>4</sub>); 5,15 (1H, dd, H<sub>3</sub>); 5,05 (1H, dd, H<sub>2</sub>); 4,49 (1H, d, H<sub>1</sub>); 4,42 (1H, t, CH<sub>2</sub>-OH); 4,12 (3H, m, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>OGal); 3,94 (3H, m, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>); 3,73 et 3,52 (2H, m, CH<sub>2</sub>OH); 2,17 à 1,89 (12H, 4s, CH<sub>3</sub>CO).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 170,43 ; 170,19 ; 170,15 ; 169,95 (CH<sub>3</sub>CO); 166,73 (CONH); 130,70 (CH<sub>2</sub>=); 127,55 (CH=); 101,43 (C<sub>1</sub>, anomère β); 70,94 (C<sub>5</sub> ou C<sub>3</sub>); 70,39 (C<sub>3</sub> ou C<sub>5</sub>); 69,47 (C<sub>2</sub>); 69,06 (CH<sub>2</sub>OGal); 67,07 (C<sub>4</sub>); 63,47 (C<sub>6</sub>); 62,67 ; 61,27 (CH<sub>2</sub>OH); 61,11 (CNH); 20,80 ; 20,63; 20,59 ; 20,51 (CH<sub>3</sub>CO).

**N-[2,2-diacétoxyméthyl-1-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-galactopyranosyloxy)prop-3-yl]-acrylamide 63**

2,5 g (4,96 mmoles) de produit **62** sont dissous à froid (0 °C) dans 30 mL d'un mélange pyridine/anhydride acétique 1/1. Après 12 heures d'agitation, le milieu réactionnel est versé dans 100 ml d'eau et la phase aqueuse est extraite avec 2 x 75 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée successivement avec 3 x 50 mL d'une solution saturée en bicarbonate de sodium, 100 mL d'eau, 2 x 120 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 1N et 2 x 75 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, puis concentrée sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/hexane 7/3. Le produit **63** (2,63 g, 90 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

F = 52°C

$[\alpha]^{20}_D = -4,36$  (c, 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = 6,23 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,18 (1H, *s*, NH); 6,08 (1H, *dd*, CH=); 5,67 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,4 (1H, *d*, H<sub>4</sub>); 5,17 (1H, *dd*, H<sub>3</sub>); 5,00 (1H, *dd*, H<sub>2</sub>); 4,42-4,47 (5H, *m*, H<sub>1</sub> + CH<sub>2</sub>OAc); 4,14 (2H, *m*, H<sub>5</sub> + 1H<sub>6</sub>); 4,07 (2H, *d*, CH<sub>2</sub>OGal); 3,9 (1H, *m*, 1H<sub>6</sub>); 2,17 à 1,99 (18H, *6s*, CH<sub>3</sub>CO).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = 172 à 170 (CH<sub>3</sub>CO); 166,17 (CONH); 131,66 (CH<sub>2</sub>=); 127,63 (CH=); 102,10 (C<sub>1</sub>, anomère  $\beta$ ); 71,50 (C<sub>5</sub> ou C<sub>3</sub>); 71,3 (C<sub>3</sub> ou C<sub>5</sub>); 69,38 (C<sub>2</sub>); 68,67 (CH<sub>2</sub>OGal); 67,6 (C<sub>4</sub>); 64,00 (C<sub>6</sub>); 63,33 ; 61,8 (CH<sub>2</sub>OAc); 59,29 (CNH); 21,43 ; 21,38 ; 21,30 ; 21,20 (CH<sub>3</sub>CO).

### **1-Acrylamido-1,1,1-Tris[(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl- $\beta$ -D-galactopyranosyloxy)méthyl]méthane 64**

2 g (11,43 mmoles) de THAM sont mis en suspension dans 200 mL d'acétonitrile (fraîchement distillé) en présence de drierite et de cyanure mercurique (13 g, 4,5 eq.) sous atmosphère d'azote. Le milieu réactionnel est agité durant 15 minutes puis 21,2 g (4,5 eq.) d'acétobromogalactose sont ajoutés au mélange qui est soniqué durant 25 minutes sous atmosphère d'azote. Après filtration sur célite et évaporation du solvant, le sirop résiduel est repris dans 50 mL d'acétate d'éthyle et la solution est filtrée de nouveau pour éliminer les sels de mercure qui ont précipité. Le volume du solvant est ajusté à 250 mL et la phase organique est lavée successivement avec une solution saturée en bicarbonate de sodium (100 mL), une solution d'iodure de potassium 10 % (4 x 100 mL), une solution saturée en thiosulfate (4 x 100 mL) et 100 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium puis filtrée et concentrée sous pression réduite. Le brut est purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/hexane 7/3. Le produit **64** (9 g, 68 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

F = 92 °C

$[\alpha]^{20}_D = -3,9$  (c, 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = 6,28 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,1 (1H, *dd*, CH=); 6,05 (1H, *s*, NH); 5,65 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,40 (3H, *d*, H<sub>4</sub>); 5,17 (3H, *dd*, H<sub>3</sub>); 5,05 (3H, *dd*, H<sub>2</sub>); 4,44 (3H, *d*, H<sub>1</sub>); 4,15 (9H, *m*, CH<sub>2</sub>OGal, H<sub>5</sub>); 3,92 (6H, *2d*, H<sub>6</sub>); 2,10 (36H, *3s*, CH<sub>3</sub>CO).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) = 170,33 ; 170,17 ; 169,88 ; 169,44 (CH<sub>3</sub>CO); 165,42 (CONH); 131,39 (CH<sub>2</sub>=); 126,54 (CH=); 101,54 (C<sub>1</sub>, anomère  $\beta$ ); 71,81 (C<sub>5</sub> ou C<sub>3</sub>); 70,65 (C<sub>3</sub> ou C<sub>5</sub>); 69,06 (C<sub>2</sub>); 68,31 (CH<sub>2</sub>OGal); 67,02 (C<sub>4</sub>); 61,14 (C<sub>6</sub>); 59,21 (CNH); 20,79 ; 20,64 ; 20,62 ; 20,52 (CH<sub>3</sub>CO).

**1-Acrylamido-1-(hept-1'-yl-carbamoyloxy)méthyl-1-hydroxyméthyl-1-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-galactopyranosyloxy)méthylméthane 65**

1,5 g (2,97 mmoles) de THAM monogal **62** et 0,43 g (3,267 mmoles, 1,1 eq.) d'isocyanate **41** sont dissous dans 50 mL de toluène (fraîchement distillé) à 50 °C sous atmosphère d'azote. 100 mg de DABCO sont introduits dans le milieu réactionnel, qui est laissé sous agitation durant 12 h. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite et l'huile résiduelle est purifiée par flash chromatographie sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/hexane 6/4. Le produit **65** (1,1 g, 52 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

F = 42-43°C

$[\alpha]^{20}_D = -14,58$  (c, 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,76 (1H, s, NH); 6,27 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 6,13 (1H, dd, CH=); 5,68 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 5,40 (1H, d, H<sub>4</sub>); 5,14 (1H, dd, H<sub>3</sub>); 5,03 (2H, m, H<sub>2</sub> + CH<sub>2</sub>NH); 4,54 (1H, d, H<sub>1</sub>); 4,25 à 4,00 (5H, m, H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OCONH, CH<sub>2</sub>OH); 3,6 à 3,95 (5H, m, CH<sub>2</sub>OGal, H<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>OH); 3,15 (2H, q, CH<sub>2</sub>NH); 2,16; 2,08; 2,06; 1,99 (12H, 4s, CH<sub>3</sub>CO); 1,55 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,27 (10 H, m, -CH<sub>2</sub>-); 0,88 (3H, t, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 169-171 (CH<sub>3</sub>CO); 167,23 (CONH); 157,51 (OCONH); 131,54 (CH<sub>2</sub>=); 128,00 (CH=); 102,28 (C<sub>1</sub>, anomère β); 71,45 (C<sub>5</sub> ou C<sub>3</sub>); 71,16 (C<sub>3</sub> ou C<sub>5</sub>); 69,5(C<sub>2</sub>); 67,64 (CH<sub>2</sub>OGal); 66,8 (C<sub>4</sub>); 64,23 (C<sub>6</sub>); 61,8 (CH<sub>2</sub>OCONH); 61,66 (CNH); 41,91 (CH<sub>2</sub>NH); 32,34 ; 30,44 ; 29,53 ; 27,3 ; 23,2 (-CH<sub>2</sub>-); 21,43 ; 21,29 ; 21,17 (CH<sub>3</sub>CO); 14,67 (CH<sub>3</sub>).

**1-Acrylamido-1-hydroxyméthyl-1-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-galactopyranosyloxy)méthyl-1-(undéc-1'-yl-carbamoyloxy)méthylméthane 66**

Le procédé de synthèse reste le même que celui décrit précédemment pour le composé **65**. La réaction est effectuée avec 1 g (1,98 mmoles) de THAM monoGal **62** et 0,430 g (2,18 mmoles) d'isocyanate **42**. Après purification par flash chromatographie sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/hexane 6/4, le produit **66** (1 g, 72 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

F = 46-47°C

$[\alpha]^{20}_D = -12,78$  (c, 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,70 (1H, s, NH); 6,22 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 6,04 (1H, dd, CH=); 5,62 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 5,33 (1H, d, H<sub>4</sub>); 5,14-5,06 (2H, m, H<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OH); 4,96 (1H, dd, H<sub>2</sub>); 4,75 (2H, t, CH<sub>2</sub>NH); 4,47 (1H, d, H<sub>1</sub>); 4,25 à 4,00 (5H, m, H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OCONH, CH<sub>2</sub>OH); 3,63 à 3,87 (4H, m, CH<sub>2</sub>OGal, H<sub>6</sub>); 3,09 (2H, q, CH<sub>2</sub>NH); 2,09 ; 2,00 ; 1,98 ; 1,92 (12H, 4s, CH<sub>3</sub>CO); 1,42 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,19 (18 H, m, -CH<sub>2</sub>-); 0,80 (3H, t, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 170,74 ; 170,71 ; 170,54 ; 170,51 (CH<sub>3</sub>C=O); 167,12 (C=O); 157,42 (OCONH); 131,51 (CH<sub>2</sub>=); 127,87 (CH=); 102,2 (C<sub>1</sub>, anomère β); 71,33 (C<sub>5</sub> ou C<sub>3</sub>); 71,08 (C<sub>3</sub> ou C<sub>5</sub>); 69,41(C<sub>2</sub>); 68,64 (CH<sub>2</sub>OGal); 67,58 (C<sub>4</sub>); 64,4 (C<sub>6</sub>); 61,7 (CH<sub>2</sub>OCONH); 61,56 (CNH); 41,83 (CH<sub>2</sub>NH); 32,44 ; 30,38 ; 30,12 ; 29,84 ; 29,82 ; 27,29 ; 23,2 (-CH<sub>2</sub>-); 21,07-21,35 (CH<sub>3</sub>CO, -CH<sub>2</sub>); 14,66 (CH<sub>3</sub>).

**1-Acrylamido-1-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-galactopyranosyloxy)méthyl-1-(heptadéc-1'-yl-carbamoyloxy)méthyl-1-hydroxyméthylméthane 67**

Le procédé de synthèse reste le même que celui décrit pour le composé **65**. La réaction est effectuée avec 1,5 g (2,77 mmoles) de THAM monoGal **62** et 0,857 g (3,05 mmoles) d'isocyanate **43**. Le produit précipite dans le milieu réactionnel. Après purification par flash chromatographie sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 1/1. Le produit **67** (1,274 g, 56 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> = -12,8 (c, 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,71 (1H, s, NH); 6,27 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 6,12 (1H, dd, CH=); 5,71 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 5,40 (1H, d, H<sub>4</sub>); 4,88-5,23 (2H, m, H<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>); 4,78 (1H, t, -CH<sub>2</sub>NH); 3,69-4,53 (10H, m, CH<sub>2</sub>OGal, CH<sub>2</sub>OCONH, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>OH, H<sub>1</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>); 3,15 (2H, q, CH<sub>2</sub>NH); 2,16 ; 2,08 ; 2,06 ; 1,99 (12H, 4s, CH<sub>3</sub>CO); 1,55 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,26 (30 H, m, -CH<sub>2</sub>-); 0,88 (3H, t, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 169,99-170,86 (CH<sub>3</sub>C=O); 165,60 (C=O); 156,88 (OCONH); 130,95 (CH<sub>2</sub>=); 127,35 (CH=); 101,69 (C<sub>1</sub>, anomère β); 61,08-70,85 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>OGal, CH<sub>2</sub>OCONH, CH<sub>2</sub>OH, CNH); 41,33 (CH<sub>2</sub>NH); 22,55-31,94 (-CH<sub>2</sub>-); 21,33-21,05 (CH<sub>3</sub>CO); 14,12 (CH<sub>3</sub>).

**1-Acrylamido-1-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-galactopyranosyloxy)méthyl-1-hydroxyméthyl-1-(1H,1H,2H,2H-perfluorodéc-1-yl-carbamoyloxy)méthylméthane 68**

Le procédé de synthèse reste le même que celui décrit pour le composé **65**. La réaction est effectuée avec 1,5 g (2,77 mmoles) de THAM monoGal **62** et 1,491 g (3,05 mmoles) d'isocyanate **44**. Après purification par flash chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant = AcOEt/hexane 8/2), le produit **68** (0,65 g, 24 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

F = 59,9-60,5 °C

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> = -7,2 (c, 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,54 (1H, s, NH); 6,3 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 6,11 (1H, dd, CH=); 5,72 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 5,68 (1H, d, H<sub>4</sub>); 5,41 (1H, t, CH<sub>2</sub>NH); 5,01-5,32 (2H, m, H<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>); 3,73-4,53 (10H, m,

CH<sub>2</sub>OGal, CH<sub>2</sub>OCONH, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>OH, H<sub>1</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>); 3,54 (2H, *q*, CH<sub>2</sub>NH); 2,36 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>); 2,05-2,16 (12H, 4*s*, CH<sub>3</sub>CO).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 170,01-170,43 (CH<sub>3</sub>C=O); 166,53 (C=NH); 156,53 (OCONH); 130,81 (CH<sub>2</sub>=); 127,55 (CH=); 105-125 (C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>); 101,61 (C<sub>1</sub>, anomère β); 60,77-70,96 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>OGal, CH<sub>2</sub>OCONH, CH<sub>2</sub>OH, CNH); 33,72 (CH<sub>2</sub>NH); 31,13 (CH<sub>2</sub>C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>); 20,55-20,85 (CH<sub>3</sub>CO).

**RMN <sup>19</sup>F** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = -81,23 ; -114,48 ; -122,18 à -124,06 ; -126,60.

**1-Acrylamido-1,1-bis[(2',3',4',6'-tétra-*O*-acétyl-β-D-galactopyranosyloxy)méthyl]-1-(hept-1'-ylcarbamoyloxy)méthylméthane 69**

Dans un ballon bicol de 100 mL, 1 g (3,16 mmoles) de diol **51** et 2,4 g (9,48 mmoles) de cyanure mercurique sont dissous dans 50 mL d'acétonitrile en présence de drierite et sous atmosphère d'azote. Après 15 minutes d'agitation, 3,9 g d'acétobromogalactose (9,48 mmoles) sont ajoutés au milieu réactionnel qui est soniqué durant 25 minutes sous atmosphère d'azote. Le mélange est ensuite filtré sur Célite et, après évaporation du solvant, les sels de mercure sont précipités dans de l'acétate d'éthyle. Après filtration, le volume de solvant est ajusté à 150 mL, puis la phase organique est lavée successivement avec 50 mL d'une solution saturée en bicarbonate de sodium, 50 mL d'eau, 2 x 50 mL d'iodure de potassium 10 %, 3 x 50 mL d'une solution saturée en thiosulfate de sodium et 50 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, puis filtrée et concentrée sous pression réduite. Le brut est purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 6/4. Le produit **69** (1,39 g, 45 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

F = 62-64°C

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 9,83 (c, 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,79 (1H, *s*, NH); 6,25 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,08 (1H, *dd*, CH=); 5,69 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,38 (2H, *d*, 2H<sub>4</sub>); 5,02-5,18 (5H, *m*, 2H<sub>3</sub>, 2H<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH); 4,44 (2H, *dd*, 2H<sub>1</sub>); 3,90-4,20 (12H, *m*, 2CH<sub>2</sub>OGal, CH<sub>2</sub>OCONH, 2H<sub>5</sub>, 4H<sub>6</sub>); 3,15 (2H, *q*, CH<sub>2</sub>NH); 2,04-1,98 (24H, *s*, CH<sub>3</sub>CO); 1,55 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,28 (10 H, *m*, -CH<sub>2</sub>-); 0,88 (3H, *t*, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 170,23-170,88 (CH<sub>3</sub>C=O); 166,36 (C=NH); 157,72 (OCONH); 132,05 (CH<sub>2</sub>=); 127,20 (CH=); 102,3 (C<sub>1</sub>, anomère β); 60,19-71,51 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>OGal, CH<sub>2</sub>OCONH, CNH); 41,9 (CH<sub>2</sub>NH); 23,23-32,39 (-CH<sub>2</sub>-); 21,37-21,46 (CH<sub>3</sub>CO); 14,7 (CH<sub>3</sub>).

**1-Acrylamido-1,1-bis[(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-galactopyranosyloxy)méthyl]-1-(undéc-1'-yl-carbamoyloxy)méthylméthane 70**

Le procédé de glycosylation reste le même que celui décrit pour le composé **69**. La réaction est effectuée avec 2 g (5,37 mmoles) de diol **52**, 6,6 g (8,055 mmoles) d'acétobromogalactose et 4,1 g (8,055 mmoles) de cyanure mercurique. Après flash chromatographie sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/hex 6/4. Le produit **70** (2,33 g, 42 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

F= 57-58 °C

$[\alpha]^{20}_D = -7,52$  (c, 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,8 (1H, *s*, NH); 6,24 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,06 (1H, *dd*, CH=); 5,64 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,39 (2H, *d*, 2H<sub>4</sub>); 4,97-5,14 (5H, *m*, 2H<sub>3</sub>, 2H<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH); 4,42-4,51 (3H, *m*, 2H<sub>1</sub>, 1H CH<sub>2</sub>OCONH); 3,90-4,26 (11H, *m*, 2CH<sub>2</sub>OGal, 1H CH<sub>2</sub>OCONH, 2H<sub>5</sub>, 4H<sub>6</sub>); 3,15 (2H, *q*, CH<sub>2</sub>NH); 2,16 ; 2,08 ; 2,07 ; 2,06 ; 1,98 (24H, *s*, CH<sub>3</sub>CO); 1,49 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,26 (18 H, *m*, -CH<sub>2</sub>-); 0,88 (3H, *t*, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 170,2-171,07 (CH<sub>3</sub>C=O); 166,3 (C=O); 157,71 (OCONH); 132,04 (CH<sub>2</sub>=); 127,18 (CH=); 102,33 ; 102,3 (C<sub>1</sub>, anomère β); 60,19-71,7 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>OGal, CH<sub>2</sub>OCONH, CNH); 41,90 (CH<sub>2</sub>NH); 23,33-32,55 (-CH<sub>2</sub>-); 21,37-21,46 (CH<sub>3</sub>CO); 14,77 (CH<sub>3</sub>).

**1-Acrylamido-1,1-bis[(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-galactopyranosyloxy)méthyl]-1-(hepta-déc-1'-yl-carbamoyloxy)méthylméthane 71**

Le procédé de glycosylation reste le même que celui décrit pour le composé **69**. La réaction est réalisée avec 0,5 g (1,09 mmole) de diol **53** avec 1,34 g (3,27 mmoles) d'acétobromogalactose et 0,83 g (3,27 mmoles) de cyanure mercurique. Après flash chromatographie sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/hexane 6/4, le produit **71** (0,501 g, 41 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

F= 49-51 °C

$[\alpha]^{20}_D =$  (c, 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,79 (1H, *s*, NH); 6,22 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 6,06 (1H, *dd*, CH=); 5,64 (1H, *dd*, CH<sub>2</sub>=); 5,42 (2H, *d*, 2H<sub>4</sub>); 4,98-5,19 (5H, *m*, 2H<sub>3</sub>, 2H<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH); 3,88-4,51 (14H, *m*, 2CH<sub>2</sub>OGal, CH<sub>2</sub>OCONH, 2H<sub>1</sub>, 2H<sub>5</sub>, 4H<sub>6</sub>); 3,18 (2H, *q*, CH<sub>2</sub>NH); 1,98 ; 2,06 ; 2,16 (24H, *s*, CH<sub>3</sub>CO); 1,55 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,25 (30 H, *m*, -CH<sub>2</sub>-); 0,88 (3H, *t*, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 169,87-170,88 (CH<sub>3</sub>C=O); 165,69 (C=O); 157,05 (OCONH); 131,44 (CH<sub>2</sub>=); 126,48 (CH=); 101,67 (C<sub>1</sub>, anomère β); 59,55-70,86 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>OGal, CH<sub>2</sub>OCONH, CNH); 41,27 (CH<sub>2</sub>NH); 23,30-31,93 (-CH<sub>2</sub>-); 20,55-21,30 (CH<sub>3</sub>CO); 14,11 (CH<sub>3</sub>).

**1-Acrylamido-1,1-bis[(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-galactopyranosyloxy)méthyl]-1-(1H, 1H,2H,2H-perfluorodéc-1-yl-carbamoyloxy)méthylméthane 72**

Le procédé de glycosylation reste le même que celui décrit pour le composé **69**. La réaction est réalisée avec 0,671 g (0,95 mmole) de diol **54**, 1,34 g (2,83 mmoles) d'acétobromogalactose et 0,7 g (2,83 mmoles) de cyanure mercurique. Après flash chromatographie sur colonne de gel de silice avec l'éluant AcOEt/Hexane 6/4, le produit **72** (0,601 g, 41 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

F = 69-70,5 °C

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -5,7 (c, 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 6,54 (1H, s, NH); 6,23 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 6,04 (1H, dd, CH=); 5,62 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=); 5,45 (1H, t, H, CH<sub>2</sub>NH); 5,37 (2H, d, H<sub>4</sub>); 4,96-5,15 (4H, m, H<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>); 3,88-4,50 (14H, m, 2CH<sub>2</sub>OGal, CH<sub>2</sub>OCONH, 2H<sub>1</sub>, 2H<sub>5</sub>, 4H<sub>6</sub>); 3,52 (2H, q, CH<sub>2</sub>NH); 2,35 (2H, m, CH<sub>2</sub>C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>); 1,97 ; 2,03 ; 2,15 (24H, s, CH<sub>3</sub>CO).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 170,01-171,12 (CH<sub>3</sub>C=O); 165,67 (C=O); 156,81 (OCONH); 131,33 (CH<sub>2</sub>=); 126,68 (CH=); 120,05 ; 114,70 (C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>); 101,65 (C<sub>1</sub>, anomère β); 59,33-70,97 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>OGal, CH<sub>2</sub>OCONH, CH<sub>2</sub>OH, CNH); 33,38 (CH<sub>2</sub>NH); 30,88 (CH<sub>2</sub>C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>); 20,63 (CH<sub>3</sub>CO).

**RMN <sup>19</sup>F** (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = -81,24; -114,49; -122,14 à -124,05; -126,59.

### III) EXPÉRIENCE DE CINÉTIQUE DE POLYMÉRISATION

#### 1. Principe de l'expérience

##### 1.1) Mode opératoire

Dans un ballon tricol de 100 mL, 5 millimoles de monomère (et 0,5 mmoles de thiol suivant le cas) sont dissous dans 48 mL de solvant (méthanol anhydre ou THF anhydre ou eau). Le milieu réactionnel est dégazé durant dix minutes sous atmosphère d'azote puis porté à 65 ou 67 °C selon le cas. Deux millilitres d'une solution dégazée de l'amorceur dans le solvant adéquat à une concentration de  $c$  M sont injectés dans le milieu. A cet instant  $t_0$  la concentration initiale en monomère est  $(M)_0 = 0,1$  M et la concentration initiale en amorceur est  $(I_2)_0 = 2c/50$  M soit  $(I_2)_0 = c/25$  M (variant de 4,1 à 16,4 ppm suivant l'expérience). Deux millilitres du milieu réactionnel sont immédiatement prélevés et injectés dans 5 millilitres d'une solution d'hydroquinone (dans l'éther ou le méthanol) maintenue à -30°C. A basse température la réaction peut être considérée comme bloquée et l'hydroquinone qui est un inhibiteur de radicaux libres va de plus piéger les radicaux formés. De nouveaux prélèvements sont effectués toutes les trois à cinq minutes et traités dans les mêmes conditions que la référence initiale. Dix à quinze prélèvements au total sont ainsi effectués. Le solvant de chaque échantillon est ensuite évaporé à sec sous vide puis le résidu est analysé en RMN  $^1\text{H}$ . Cette analyse nous permet d'accéder au rapport  $(M)_0/(M)$  où  $(M)_0$  est la concentration initiale en monomère et  $(M)$  sa concentration à l'instant  $t$ .

##### 2.1) Analyse RMN des échantillons

Le degré d'avancement de la réaction est déterminé en comparant l'intégration  $I_T$  des signaux des groupements oxyméthyle ( $-\text{CH}_2\text{OR}$ ) du Tris (observés entre  $\delta = 3,6$  et  $4,8$  ppm suivant la nature de R) à  $I_{ac}$ , celles des trois protons acryliques dont les signaux caractéristiques apparaissent à  $\delta = 5,6$  à  $6,7$  ppm (cf. figure E5).

L'aire des signaux en RMN  $^1\text{H}$  est proportionnelle à la concentration en protons, nous aurons donc à l'instant initial  $t_0$  pour une concentration initiale  $(M)_0$  en monomère :

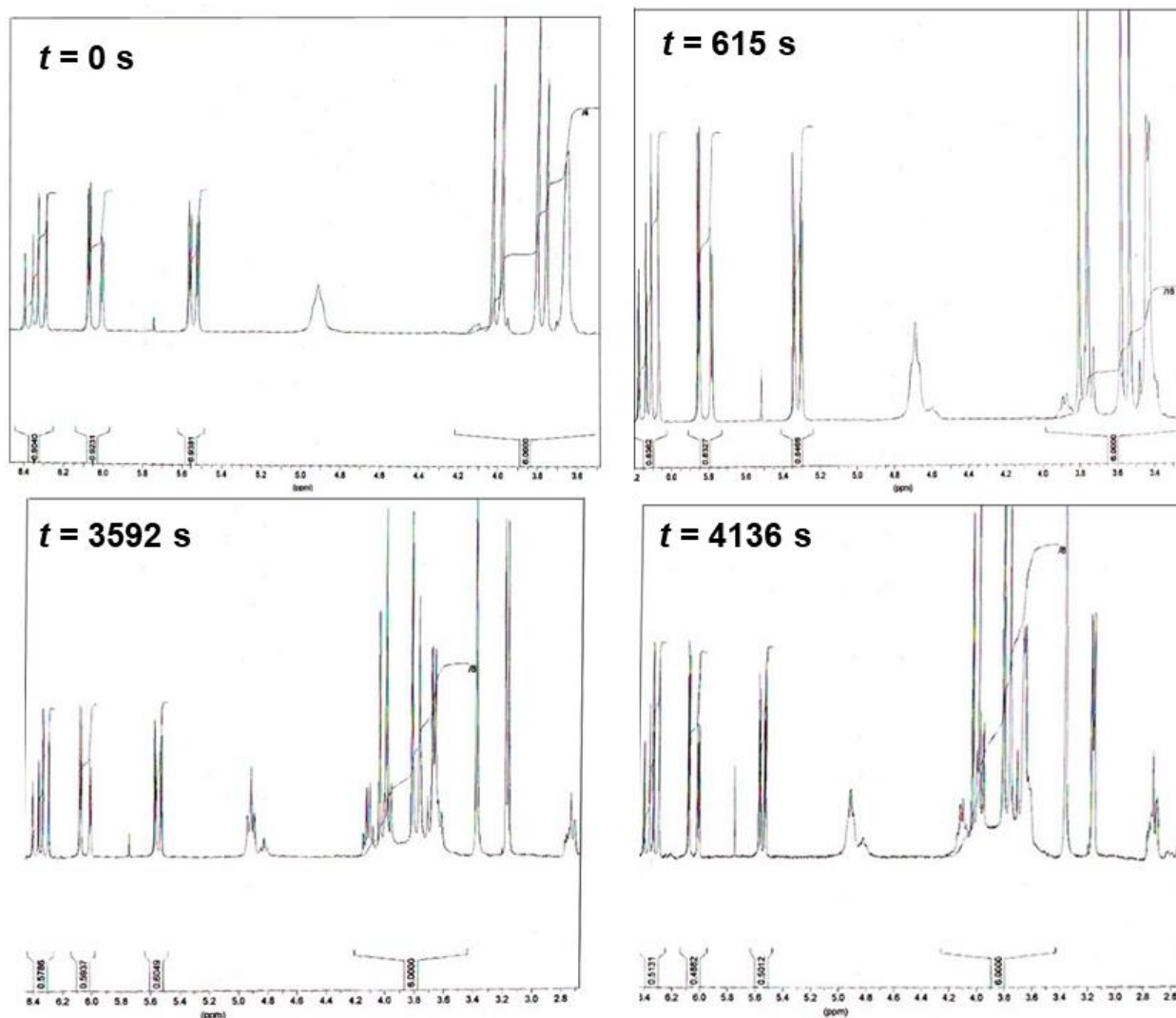
$$I_{ac} \propto 3(M)_0$$

$$I_T \propto 6(M)_0$$

$$I_T/I_{ac} = 2$$

A l'instant  $t$ , la concentration en protons méthyléniques  $\text{CH}_2\text{O}$  est restée constante, seule la concentration en protons acryliques est affectée par la polymérisation (cf. figure E.5).





**Figure E.5** : évolution au cours du temps de réaction, des signaux et intégrations des spectres RMN  $^1\text{H}$  observée lors du suivi de la cinétique de d'homopolymérisation du THAM isopropylidène **3**.

Si ( $M$ ) est la concentration en monomère à l'instant  $t$ , nous avons :

$$I_{ac} \propto 3(M) \quad \text{et} \quad I_T \propto 6(M)_0 = \text{cte} \quad (4)$$

$$I_T/I_{ac} = 2(M)_0/(M) \quad (5)$$

$$\boxed{(M)_0/(M) = I_T/2I_{ac}} \quad (6)$$

Nous pouvons aussi utiliser le logiciel WIN-NMR qui permet d'imposer une valeur à l'intégration. En fixant  $I_{ac} = 6$  toutes les intégrations sont corrigées par le facteur de proportionnalité  $1/k(M)_0$  et le rapport  $(M)_0/(M)$  devient alors :

$$\boxed{(M)_0/(M) = 3/I_{ac}} \quad (7)$$

Il suffit donc de lire la valeur inverse de l'intégration  $I_{ac}$  pour accéder à la valeur du rapport  $(M)_0/(M)$ . Cette méthode est très pratique car nous pouvons prendre comme pic de référence

n'importe quel signal dont l'intégration reste invariable au cours du temps tout en gardant la même relation.

La valeur du rapport  $(M)_0/(M)$  est ensuite intégrée à la relation de Tobolovski permettant d'établir la relation entre le degré de conversion et le temps de réaction.

Le domaine de conversion utilisé est compris entre 0 et 80 % ( $[M]_0/[M] \geq 1,25$ ). Au delà de cette limite, la linéarité de la relation n'est plus vérifiée.

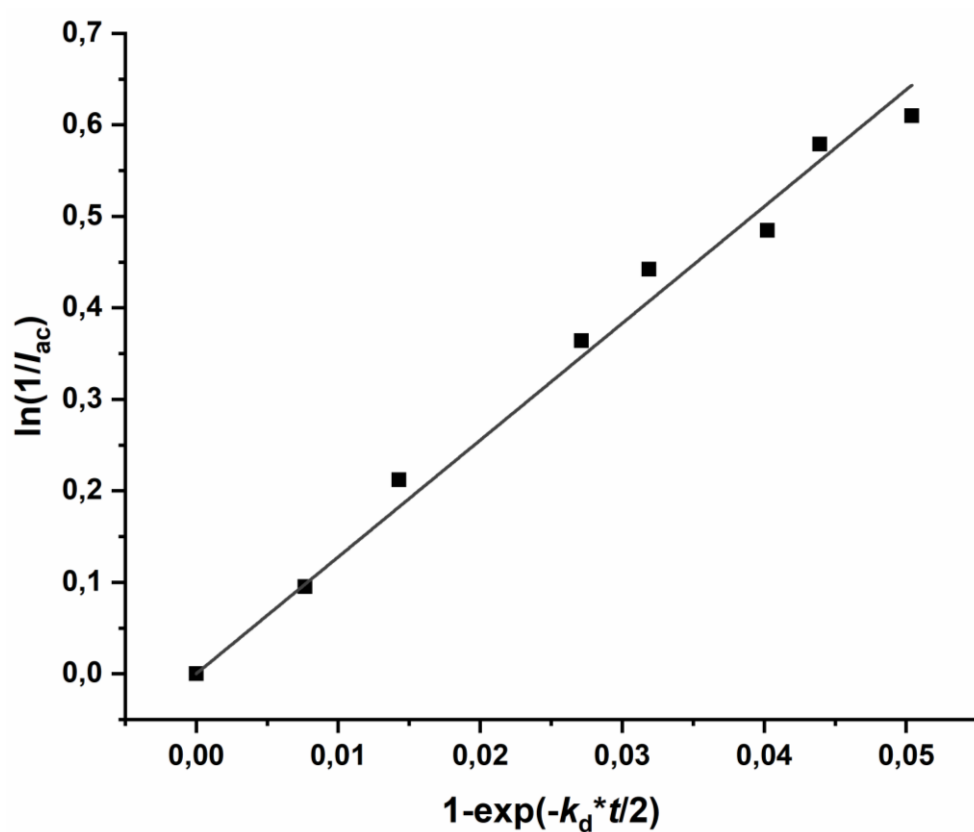
## 2. Exemples : cinétique de télomérisation du monomère **3**

1,075 g (5 mmoles) de THAM isopropylidène **3** sont pesés dans un ballon tricol. 46 mL de méthanol anhydre et dégazé sont injectés par l'intermédiaire d'une aiguille à septum dans le ballon maintenu fermé et surmonté d'un réfrigérant équipé d'une garde à chlorure de calcium. Le milieu réactionnel est dégazé durant dix minutes, puis il est porté à ébullition. Une fois à ébullition, 2 mL (0,5 mmole) d'une solution méthanolique à 0,25 M de tétrahydro-1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorodécane-thiol, puis 2 mL d'une solution méthanolique d'AIBN à  $1,25 \times 10^{-2}$  M sont injectés dans le milieu réactionnel. La concentration initiale en AIBN est alors de  $5 \times 10^{-4}$  M et le premier prélèvement de 2 mL est alors effectué. Ces 2 mL sont aussitôt injectés dans une solution étherée d'hydroquinone à 0,2 % refroidie à  $-30^\circ\text{C}$ . Neuf autres prélèvements ont été ainsi effectués à intervalles de temps réguliers de 5 minutes. Les échantillons sont évaporés et séchés sous vide. Ils sont analysés en RMN  $^1\text{H}$  dans le DMSO deutéré. L'avancement de la réaction est suivi en comparant l'intégration du pic des protons acryliques à celle du pic des protons oxyméthyléniques  $\text{CH}_2\text{O}$  du TRIS. Les ont été reportées dans le tableau E1 ci-dessous.

Temps (s)	$I_{ac}$ moyenne	$I_{ac}$ corrigée	$1-\exp(-k_d*t/2)$	$\ln(1/I_{ac})$ valeurs obtenues
0	0,92173333	1	0	0
615	0,83783333	0,90897584	0,00765803	0,09543676
1150	0,7455	0,80880226	0,01427217	0,21220082
2200	0,64033333	0,69470563	0,02712532	0,36426708
2593	0,5924	0,64270216	0,03189284	0,44207387
3285	0,5676	0,61579633	0,04023086	0,48483901
3592	0,5167	0,56057428	0,04390691	0,57879352
4136	0,50083333	0,54336034	0,05038629	0,60998258

**Tableau E1** : valeurs obtenues pour  $I_{ac}$  au cours du temps lors du suivi de la cinétique de télomérisation du THAM isopropylidène **3** dans le méthanol avec une concentration initiale en amorceur  $[\text{AIBN}]_0 = 5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ .

A partir des valeurs ci-dessus nous obtenons la régression linéaire représentée dans la figure E6 et dont la pente donne la valeur à partir de laquelle est déduite celle du rapport  $fk_p^2/k_t$  (cf. tableau E2).



**Figure E6** : régression linéaire obtenue lors du suivi de la cinétique de télomérisation du THAM isopropylidène **3** dans le méthanol avec une concentration initiale en amorceur  $[AIBN]_0 = 5.10^{-4}M$ .

Pente	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$[AIBN]_0$ mol.L $^{-1}$	$fk_p^2/k_t$ (L.mol $^{-1}.s^{-1}$ )
12,845	$2,5.10^{-5}$	$0,5.10^{-3}$	2,062

**Tableau E2** : valeurs obtenues pour  $fk_p^2/k_t$  lors du suivi de la cinétique de télomérisation du THAM isopropylidène **3** dans le méthanol avec une concentration initiale en amorceur  $[AIBN]_0 = 5.10^{-4}M$ .

## ***IV) SYNTHÈSE DES AMPHIPOLS NEUTRES***

### **1) Synthèse des amphipols neutres par cotélorisation de monomères protégés**

#### **1.1) Cotélorisation**

##### **Cotélorère 73**

Dans un ballon bicol de 100 mL sont dissous 456 mg (1 mmole) de composé **57** et 0,902 g (3 mmoles) de monomère **7** dans 48 mL d'acétonitrile. Le milieu réactionnel est dégazé avec un courant d'azote durant 10 minutes puis porté à reflux. 1 mL (0,25 mmole) d'une solution de dodécane-thiol à 0,25 M dans l'acétonitrile et 1 mL (0,05 mmole) d'une solution d'AIBN à 0,05 M dans l'acétonitrile (préalablement distillé et dégazé), sont alors injectés dans le milieu. Le courant d'azote est stoppé et le milieu réactionnel est laissé sous agitation à reflux durant 36 h. La réaction est suivie en CCM (éluant = AcOEt). Le mélange est ensuite ramené à température ambiante et le solvant évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié sur gel de Séphadex LH 20 avec l'éluant MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1/1. Le cotélorère **73** (1,137 g, 80,58 %) est obtenu sous forme d'une poudre jaune pâle.

Le procédé de synthèse des cotélorères **74** à **100** est le même que celui qui a été précédemment décrit pour le cotélorère **73**.

##### **Cotélorère 89**

La réaction est effectuée avec 0,412 g (1 mmole) de monomère **47**, 1,075 g (5 mmoles) de monomère **3**, 0,12 mmole de dodécane-thiol et 0,024 mmole d'AIBN dans 50 mL de THF dégazé par courant d'azote et porté à reflux durant trois heures. La réaction est suivie en CCM (éluant = AcOEt). Après purification sur gel de séphadex LH 20 avec l'éluant MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1/1, le cotélorère **89** (1,2 g, 80 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

#### **1.2) Déprotection**

##### **1.2.1) Déprotection des cotélorères protégés par acétylation**

##### **Cotélorère 73'**

Le cotélorère **73** est dissous dans 40 mL de méthanol en présence de 100 mg de méthoxyde de sodium. Après 12 h d'agitation, le milieu réactionnel est neutralisé par addition de 2 g de résine

IRC 50 de façon à obtenir pH = 6-7. La résine est éliminée par filtration et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le filtrat est repris dans 5 mL de méthanol et l'huile obtenue est versée dans 60 mL d'éther. Le précipité est filtré, séché et le cotélomère **73'** (0,708 g, 73,6 %) est obtenu sous forme de poudre jaunâtre.

La déprotection des cotélomères **74** à **88** et **92**, **93** et **95** à **100** a été effectuée en suivant le même procédé que celui décrit pour le cotélomère **73'**. Elle a permis d'obtenir les télomères **74'** à **88'** et **92'**, **93'** et **95'** à **100'**. Les cotélomères galactosylés n'ont pas été précipités dans l'éther, car ils sont trop hygroscopiques et tous les cotélomères suffisamment hydrosolubles ont été lyophilisés après précipitation.

#### 1.2.2) Déprotection des cotélomères protégés par cétylisation

##### **Cotélomère 89'**

Le cotélomère **89** est dissous dans 40 mL d'un mélange MeOH/HCl<sub>aq</sub> 1N 4/1. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation durant 12 heures puis le solvant est évaporé par petite fraction (produit moussant) sous pression réduite. L'huile résiduelle est reprise dans 50 ml de méthanol et les traces d'acide persistant dans le milieu sont neutralisées par trois spatules d'amberlist 21 (résine basique) de façon à obtenir un pH = 7. La résine est éliminée par filtration et le filtrat est concentré sous pression réduite. L'huile résiduelle est versée dans 80 mL d'éther. Le précipité est filtré et séché puis lyophilisé. Le cotélomère **89'** (0,834 g soit un rendement global de 74,4 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

Cette même méthode de déprotection a été appliquée au cotélomère **80**, **101'** et **102'** et a permis l'obtention des cotélomères **80'**, **101''** et **102''**.

#### 1.2.3) Déprotection des cotélomères protégés par cétylisation et acétylation

##### **Cotélomère 91'**

Le cotélomère **91** est dissous dans 40 ml de méthanol en présence de 100 mg de méthoxyde de sodium. Après 12 h d'agitation, le milieu réactionnel est neutralisé par addition de 2 g de résine IRC 50 de façon à obtenir pH = 6-7. La résine est éliminée par filtration et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut est repris dans 30 mL d'un mélange acide acétique/eau 7/3 et la solution est maintenue sous agitation à 50°C durant 12 heures. Le solvant est ensuite évaporé par petites fractions. Le brut est repris dans 40 mL de toluène qui sont évaporés sous pression réduite à 50 °C. La même opération est recommencé deux fois de suite, puis le produit **91'** est repris dans

10 mL de méthanol et précipité dans 100 mL d'éther. Le précipité est filtré, séché puis lyophilisé. Le cotélomère **91'** (1,188 g soit un rendement global de 66,5 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

La déprotection du cotélomère **94** a été effectuée en suivant le même protocole que celui décrit pour le cotélomère **91'** et a conduit au cotélomère **94'**.

## 2) Synthèse des cotélomères protégés par modification d'un homotélomère

### 2.1) Synthèse de l'homotélomère

#### Télomère 101

9 g (41,86 mmol) de monomères **3** et 0,29 g (1,39 mmol) de dodécane-thiol sont dissous dans 16 mL d'acétonitrile. La solution est dégazée par un courant d'azote anhydre et portée à ébullition, puis 1 mL (0,12 mmol) d'une solution d'AIBN à 20 g.L<sup>-1</sup> dans l'acétonitrile sont injectés dans le milieu réactionnel maintenu durant 12 heures à reflux. Le solvant est ensuite évaporé et le brut est repris dans 30 mL de dichlorométhane, puis précipité dans 150 mL d'éther. Après filtration, la poudre est séchée sous vide à 40 °C durant 12 heures. Le télomère **101** (7,8 g, 86,7 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

### 2.2) Modification de l'homotélomère

La masse d'isocyanate  $m_I$  devant être introduite dans le milieu réactionnel pour une modification chimique à  $y$  % par rapport aux unités monomères de  $M$  g de télomère dont le  $\overline{DP}_n$  est  $n$ , est déterminée par la relation suivante :

$$m_I = (y \cdot M \cdot m_{10}) / (m_0 + m_{s0}/n) \quad (8)$$

Où  $m_0$  est la masse molaire du monomère,  $m_{s0}$  est la masse molaire du thiol et  $m_{10}$  est la masse molaire de l'isocyanate.

#### Cotélomère 103

2 g (0,3 mmol) du composé **101** (soit 9 mmol d'unités monomères **3**) sont dissous dans 40 mL d'acétone et le milieu réactionnel est porté à reflux sous atmosphère inerte. 0,445 g (2,26 mmol) d'undécylisocyanate **42** et 100 mg de DABCO sont introduits dans le milieu réactionnel. Après 12 heures de réaction, la solution est filtrée, puis le solvant est éliminé sous pression réduite. Le brut est repris dans 10 mL de dichlorométhane, puis précipité dans 80 mL de n-hexane. Le cotélomère **103** (2,05 g, 83,1 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

## 2.3) Déprotection des cotélomères

### Cotélomère 103'

Le procédé de déprotection du cotélomère **103** est le même que celui qui a été décrit pour le cotélomère **89**. Après évaporation du solvant et élimination de l'eau, le brut est repris dans 10 mL de méthanol puis précipité dans 80 mL d'éther. Le cotélomère **103'** (1,55 g, 92 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

### 3) Analyse du $\overline{DP}_n$ et de la composition chimique des cotélomères par RMN $^1\text{H}$

Pour les télomères non galactosylés, le  $\overline{DP}_n$  et les proportions  $x$  et  $y$  en différents monomères présents dans la macromolécule, sont déterminés en comparant les signaux du méthyle de la chaîne grasse latérale à 0,88 ppm avec ceux du méthylène en  $\alpha$  de l'azote à 3,15 ppm et ceux des oxyméthyle du Tris à 4,4 ppm.

Le triplet à 0,88 ppm est représentatif des méthyles des chaînes grasses latérales mais aussi du méthyle de la chaîne du thiol. Si le  $\overline{DP}_n$  est  $n$ , la valeur de l'intégration  $I_{\text{CH}_3}$  de ces signaux vérifie la relation suivante :

$$I_{\text{CH}_3} \propto (3 + 3n.y) \quad (9)$$

Le massif à 3,15 ppm est représentatif des méthylènes de la chaîne grasse en  $\alpha$  de l'azote et l'intégration de ce signal est :

$$I_{\text{CH}_2\text{NH}} \propto 2n.y \quad (10)$$

Du rapport (9)/(10) on déduit :

$$n.y = \frac{1}{\frac{2.I_{\text{CH}_3}}{3.I_{\text{CH}_2\text{NH}}} - 1} \quad (11)$$

Nous prenons ensuite la valeur de l'intégration du massif à 4,4 ppm représentatif des  $\text{CH}_2\text{O}$  du Tris, la valeur donne :

$$I_{\text{CH}_2\text{O}} \propto n(6x + 6y) \quad (12)$$

Du rapport (12)/(10) on déduit :

$$x = \frac{3.I_{\text{CH}_2\text{NH}}}{I_{\text{CH}_2\text{O}}} \quad (13)$$

D'où :

$$y = 1 - x \quad (14)$$

$$\overline{DP}_n = n.y/y \quad (15)$$

Pour les cotélobères galactosylés nous procédons de la même façon pour déterminer la valeur de  $x$ , mais le massif en RMN attribué aux  $\text{CH}_2\text{O}$  du TRIS recouvre une partie des signaux des motifs galactopyranosyle qu'il faut intégrer dans les calculs.

Nous pouvons aussi prendre comme référence les pics des protons  $\text{H}_4$  à 5,4 ppm et des protons  $\text{H}_2 + \text{H}_3$  à 5,05 ppm des groupements galactopyranosyle. Les deux calculs conduisent à des résultats sensiblement équivalents.

Concernant les cotélobère cétilisés, le principe de calcul des proportions  $x$  et  $y$  reste le même que celui qui a été décrit pour les cotélobères acétylés.

La relation (11) reste applicable et nous en déduisons  $n.y$ , le nombre de monomère porteur de chaîne grasse.

Entre 4 et 5 ppm nous trouvons les protons des méthylènes du Tris et ceux attribués à la fonction hydroxyle. Nous avons donc :

$$I_{\text{CH}_2\text{O}} + I_{\text{OH}} \propto (6(x + y) + x) = 6 + x \quad (16)$$

En effectuant (16)/(10), nous obtenons :

$$y = \frac{7}{2 \left( \frac{I_{\text{CH}_2\text{O}} + I_{\text{OH}}}{I_{\text{CH}_2\text{NH}}} \right) + 1} \quad (17)$$

Résultat à partir duquel peuvent être facilement déduits  $x$  et le  $\overline{DP}_n$ .

Dans le cas des télomères galactosylés, il faut soit intégrer les protons de la partie glucidiques apparaissant dans cet intervalle de déplacement chimique, soit prendre comme référence les protons  $\text{H}_4$  à 5,45 ppm ou  $\text{H}_3 + \text{H}_2$  à 5,05 et 5,15 ppm.

Une méthode alternative repose sur l'utilisation de la valeur de l'intégration  $I_{\text{NH}}$  des signaux des protons amide et uréthane observés à 7,3 ppm et qui est donnée par :

$$I_{\text{NH}} \propto n(y + 1) \quad (18)$$

Nous en déduisons (18)/(10) :

$$y = \frac{1}{2 \left( \frac{I_{\text{NH}}}{I_{\text{CH}_2\text{NH}}} \right) - 1} \quad (19)$$

Ou suivant (12)/(18) :

$$y = 6 \cdot \frac{I_{\text{NH}}}{I_{\text{CH}_2\text{O}}} - 1 \quad (20)$$

Le  $\overline{DP}_n$  est déduit de (9)/(18) :

$$\overline{DP}_n = \frac{1}{\frac{1}{3(y + 1)} \cdot \frac{I_{\text{CH}_3}}{I_{\text{NH}}} - y} \quad (21)$$



## V) *ÉTUDES DES PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES DES AMPHIPOLS NEUTRES*

### 1) Existence et solubilité des complexes

Un faible volume d'une solution mère de télomères ( $10 \text{ g.L}^{-1}$  à  $50 \text{ g.L}^{-1}$ ) est additionné à une solution micellaire de protéine (ex: BR  $1 \text{ g.L}^{-1}$  dans OTG 10 à 33 mM, tampon pH = 7 pour la BR ou 8 pour le  $b_6f$ ). Après 15 min d'incubation à  $4^\circ\text{C}$ , les solutions sont diluées dans du tampon pH. Le facteur de dilution varie de 4 à 10 de façon à obtenir une concentration en détergent final inférieure au tiers de la CMC. Les solutions sont ensuite centrifugées pendant 20 min à  $4^\circ\text{C}$  à *c.a.* 200000g, dans un rotor A-110 (Airfuge, Beckman). La concentration résiduelle de la protéine dans le surnageant est déterminée par spectrophotométrie UV-visible.

### 2) Test de la dispersité des complexes formés et stabilité au retrait de polymère

Un faible volume d'une solution de télomère ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ) est additionné à une solution micellaire de protéine (ex: BR  $1 \text{ g.L}^{-1}$  dans OTG 10 à 33 mM, tampon pH = 7 pour la BR; 8 pour le  $b_6f$ ). Après 15 min d'incubation à  $4^\circ\text{C}$ , les solutions sont diluées (facteur 4 à 10, détergent final à moins de CMC/3) dans du tampon. Le mélange est déposé au dessus d'un gradient 5-20 % de saccharose, contenant un tampon phosphate pH = 7 (typiquement 20 mM). Les gradients sont centrifugés (rotor TLS 55, 54 000 tr/min) à  $4^\circ\text{C}$  durant 6h30 à 6h40 (ou équivalent en terme de produit force×temps) pour la BR et 5 h pour le cytochrome  $b_6f$ . Les gradients sont fractionnés en aliquotes de 120  $\mu\text{L}$ . La concentration de la protéine dans les fractions est déterminée par spectrophotométrie.

### 3) Mesures de l'activité enzymatique de la protéine complexée

A une solution de 0,25 mM lauryl maltoside, 20 mM tricine NaOH (pH 8) est additionné 12  $\mu\text{L}$  d'une solution plastocyanine, 1-2  $\mu\text{L}$  d'une solution de complexe  $b_6f$ /télomère et 5  $\mu\text{L}$  d'une solution à 1,26 mM de decylplastoquinol. L'activité enzymatique est alors déterminée par la mesure des variations d'absorbance à 554 nm qui reflète la quantité de plastocyanine réduite.

**VI) ANALYSES Q.E.L.S. DES SOLUTIONS AQUEUSES DES AMPHIPOLS NEUTRES ET DES AMPHIPOLS CHARGÉS ET DES COMPLEXES FORMÉS AVEC LES PROTÉINES**

La solution mère est préparée dans de l'eau pure et laissée sous agitation durant 24 h. Cette solution est diluée d'un facteur 2 dans du tampon, puis elle est filtrée et analysée par diffusion de la lumière. Le temps entre la filtration et l'analyse est de 15 min.

**1) Exemple : évolution du rayon hydrodynamique et de la masse des agrégats formés par l'amphipol A8:35 en solution aqueuse en fonction du pH et du solvant**

pH	$R_h$ (nm)	$M_{app}$ (g.mol <sup>-1</sup> )
6,8	5,2	98 000
7,5	5,5	111 700
8,0	4,7	92 600
9,2	4,0	97 200

**Tableau E3** : évolution du rayon hydrodynamique ( $R_h$ ) de la masse apparente ( $M_{app}$ ) des particules formées par l'A8-35 en solution aqueuse, en fonction du pH.

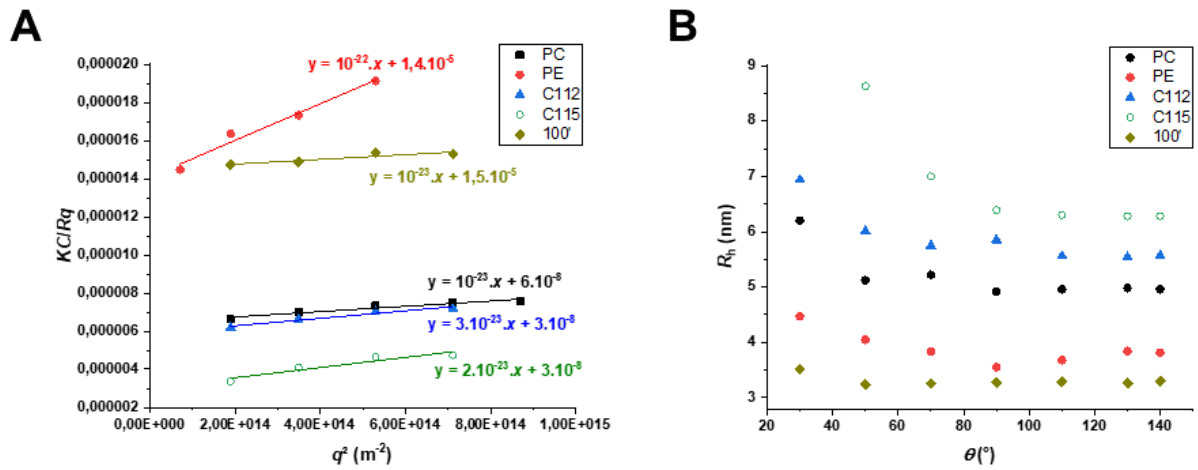
Solvant	$R_h$ (nm)	$M_{app}$ (g.mol <sup>-1</sup> )
H <sub>2</sub> O	5,23	88701
Urée	29	1392757
MeOH	6,19	190476
Triton	9,74	469483

**Tableau E4** : évolution du rayon hydrodynamique ( $R_h$ ) de la masse apparente ( $M_{app}$ ) des particules formées par l'A8-35 en solution aqueuse, en fonction du solvant.

**2) Courbes obtenues lors des analyses des solutions d'amphipols neutres**

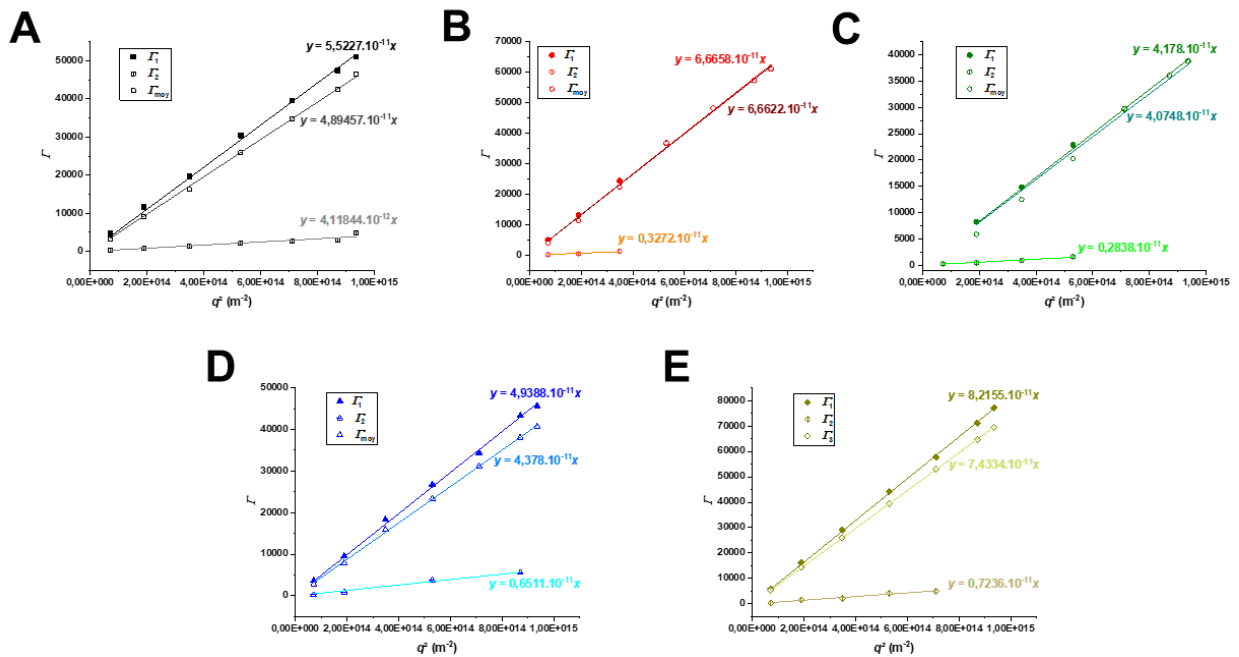
Dans chaque cas, les mesures ont été effectuées sur des solutions de cotéromère dissous à 0,5 % dans un tampon phosphate à pH = 6,8.

Ci-après sont présentées les différentes courbes obtenues pour chacun des amphipols étudiés. La courbe  $KC/Rq$  vs.  $q^2$  (cf. figure E7A) permet de déterminer une valeur de la masse moléculaire apparente ( $M_{app}$ ), la courbe  $R_h$  vs.  $\theta$  (cf. figure E7B) permet de déterminer une valeur du rayon hydrodynamique par extrapolation à angle  $\theta$  nul.



**Figure E7** : représentation des courbes  $KC/Rq$  vs.  $q^2$  (A) et  $R_h$  vs.  $q$  (B) obtenues pour les amphipols PC, PE, C112, C115 et 100'.

L'appareil donne les courbes  $\Gamma_1 = f(q^2)$  et  $\Gamma_2 = f(q^2)$  pour chaque population d'objet ainsi que la courbe moyenne (cf. figure E8).



**Figure E8** : courbes et régressions linéaires obtenues pour  $\Gamma = f(q^2)$  avec les amphipols PC (A), PE (B), C115 (C), C112 (D) et 100' (E).

L'exploitation mathématique de ces courbes permet d'accéder au coefficient de diffusion  $D$ . La relation de Stoke-Einstein permet ensuite de déterminer la valeur du rayon hydrodynamique  $R_h$  des particules (cf. tableau E5).

Amphipols	Mode de relaxation	Pourcentage (%)	$R_h$ (m)	$D$ (m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	* $R_h$ (nm)	* $R_g$ (nm)	* $M_{app}$ (g.mol <sup>-1</sup> )
PC (84')	1	100	$5,01.10^{-9}$	$4,89.10^{-11}$	5	25,5	154800
	2	80	$4,44.10^{-9}$	$5,52.10^{-11}$			
		20	$5,95.10^{-8}$	$4,12.10^{-12}$			
PE (91')	1	100	$3,7.10^{-9}$	$6,62.10^{-11}$	3,9	45,2	71000
	2	90	$3,68.10^{-9}$	$6,67.10^{-11}$			
		10	$7,59.10^{-8}$	$3,23.10^{-12}$			
C115 (76')	1	100	$6,02.10^{-9}$	$4,07.10^{-11}$	6,3	51,5	331100
	2	90	$5,87.10^{-9}$	$4,18.10^{-11}$			
		10	$8,66.10^{-8}$	$2,83.10^{-12}$			
C112 (74')	1	100	$5,6.10^{-9}$	$4,38.10^{-11}$	5,9	10	17000
	2	85	$4,96.10^{-9}$	$4,94.10^{-11}$			
		15	$6,2.10^{-8}$	$3,95.10^{-12}$			
100'	1	100	$3,3.10^{-9}$	$7,43.10^{-11}$	3,3	5,04	69000
	2	88	$2,99.10^{-9}$	$8,21.10^{-11}$			
		12	$3,39.10^{-8}$	$7,24.10^{-12}$			

**Tableau E5** : rayons hydrodynamiques ( $R_h$ ) et coefficients de diffusion ( $D$ ) des particules formées dans l'eau, déterminés pour chaque amphipol en fonction du nombre de mode de relaxation. \*Valeurs retenues pour le rayon hydrodynamique, le rayon de gyration et la masse apparente.

## VII) SYNTHÈSE DES POLYMÈRES AMPHIPHILES DÉRIVÉS DU TRIS

### 1) Synthèse des homopolymères

#### Polymère 114

49 g (190,7 mmoles) de THAM isopropylidène acétylé **4** sont dissous dans 180,7 mL de toluène fraîchement distillé. Le milieu réactionnel est dégazé par un courant d'azote et, au bout de dix minutes, le mélange est porté à 65 °C. Dans une fiole jaugée de 100 mL sont pesés 2,08 g (12,682 mmoles) d'AIBN (recristallisé deux fois) qui sont aussitôt dissous dans 100 mL de toluène anhydre préalablement dégazé sous azote. 10 mL de la solution sont alors injectés dans le milieu réactionnel. A cet instant, la concentration initiale en monomère est 1 M et la concentration en amorceur est de  $6,67 \times 10^{-3}$  M. Le courant d'azote est stoppé et le milieu réactionnel est laissé sous agitation vigoureuse durant 48 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le brut est repris dans 50 mL de dichlorométhane. La solution est versée lentement dans 1 L d'éther. Le précipité est filtré, séché et le polymère **124** (44 g, 90 %) est ainsi obtenu sous forme d'une poudre blanche.

Le même procédé de synthèse a été appliqué à l'élaboration des polymères **106** à **128**.

#### HomopolyTris 117

10 g (57 mmoles) de THAM sont dissous dans 667 mL d'eau distillée. Le milieu réactionnel est maintenu sous atmosphère inerte durant une heure à la température de 50 °C. 400 mg (0,735 mmole) de persulfate de potassium sont ensuite ajoutés et le milieu réactionnel est laissé sous agitation durant 24 heures. La solution aqueuse est ramenée à température ambiante, puis elle est versée dans 2 L d'éthanol sous forte agitation. Après filtration le polyTris (9 g, 90 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

### 2) Déprotection des acétyles des polymères

#### Désacétylation du polymère 114

40 g de polymère **114** et 200 mg de méthanolate de sodium sont dissous dans 300 mL de méthanol. Après 12 heures de réaction, le milieu réactionnel est neutralisé par ajout de 5 spatules de résine acide IRC 50. Après filtration, le volume du filtrat est ramené à 100 mL par évaporation du solvant sous pression réduite et la solution obtenue est versée lentement dans 500 mL d'éther. Le précipité

est filtré et séché sous vide durant 48 heures. Le polymère **114'** (31 g, 93 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

Le même procédé de déprotection a été appliqué à tous les polymères acétylés.

### 3) Modification hydrophobique des homopolymères du monomère 3

#### 3.1) Calcul de la masse d'isocyanate

Le calcul de la masse  $m_I$  d'isocyanate devant être introduite dans le milieu réactionnel pour la modification à  $y$  % par rapport aux unités monomères d'une masse  $M$  de polymère, est effectué de la façon décrite ci-après.

Soit  $M_0$  la masse molaire du polymère,  $m_0$  la masse molaire du monomère et  $n$  le  $\overline{DP}_n$  du polymère. Le nombre de moles de monomère présentes dans le milieu est :

$$N = n.M/M_0 = n.M/n.m_0 \quad (22)$$

$$N = M/m_0 \quad (23)$$

Soit  $m_{I0}$  la masse molaire de l'isocyanate, la masse d'isocyanate nécessaire pour un greffage à  $y$  % est :

$$m_I = y.N.m_{I0}/100 \quad (24)$$

$$m_I = y.M.m_{I0}/100.m_0 \quad (25)$$

#### 3.2) Modification hydrophobe

##### Synthèse du polymère 114'/12/C<sub>11</sub>

Dans un ballon bicol de 250 mL, 3 g du polymère **114'** sont dissous dans 100 mL d'acétone fraîchement distillée. Le milieu réactionnel est maintenu sous atmosphère d'azote et porté à ébullition. Au bout de 10 minutes, 1 mL d'une solution d'undécylisocyanate **43** à 331 g/L dans l'acétone (anhydre et préalablement dégazée) et 100 mg de DABCO sont introduits dans le milieu réactionnel. Après 12 h heures de réaction, le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite de façon à ramener le volume du solvant à 40 mL, puis la solution est versée sous forte agitation dans 200 mL d'éther. Le polymère **114'/12/C<sub>11</sub>** (2,99 g, 90 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

La même méthode de modification chimique a été utilisée pour la synthèse des différents polymères modifiés **114'/y/C<sub>n</sub>** et **115'/y/C<sub>n</sub>**.

### 3.3) Analyse de la composition chimique des copolymères par RMN <sup>1</sup>H

Nous avons déterminé les valeurs des proportions en monomère hydrophobes et hydrophiles ( $y'$  et  $x'$  respectivement) par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H. La comparaison de l'intégration ( $I_{NH}$ ) du massif des protons amides à 7,5 ppm avec l'intégration ( $I_{CH3}$ ) du triplet des méthyles des chaînes latérales à 0,88 ppm permet d'accéder à  $y'$  suivant la relation :

$$y' = \frac{I_{CH3}}{3 \cdot I_{NH}} \quad (26)$$

Et  $x'$  est donné par :

$$x' = 1 - y' \quad (27)$$

Précisons que le proton porté par l'azote de la fonction uréthane n'apparaît pas toujours sur le spectre RMN <sup>1</sup>H. Nous pouvons observer parfois le massif représentatif de ce proton à 6,5 ppm et, dans ce cas, le pic du proton amide est déplacé à 8 ppm. Si nous tenons compte de la présence du proton uréthane en intégrant l'ensemble des pics situés entre 6 et 8 ppm,  $y'$  est alors donné par la relation suivante :

$$y' = \frac{1}{3 - \frac{I_{CH3}}{I_{NH}}} \quad (28)$$

## 4) **Déprotection des fonctions cétales des polymères obtenus après modification hydrophobe**

### **Synthèse du polymère 114'/12/C11**

2,8 g du polymère **114'/12/C11** sont mis en suspension dans 100 mL d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 0,2 N portée à 50 °C. Après 48 heures de réaction la solution est neutralisée par addition de 810 mg de soude, puis laissée sous agitation durant deux heures. Le milieu réactionnel est alors versé dans 500 ml d'éthanol. Le précipité est récupéré puis lavé abondamment avec du méthanol. Le précipité est ensuite séché à 45 °C durant 24 heures sous vide. Le polymère **114'/12/C11** (2,12 g, 85 %) est ainsi obtenu sous forme d'une poudre blanche.

Le même procédé de déprotection par hydrolyse acide a été appliqué à tous les polymères de type **114'/y/Cn** et **115'/y/Cn**.

## **VIII) ANALYSE DES MASSES MOLAIRES DES HOMOPOLYMÈRES PROTÉGÉS**

### **1) Analyse par diffusion de la lumière**

La masse molaire est donnée par la relation suivante :

$$\frac{1}{\bar{M}_w} = K \cdot I_B \cdot \left[ \frac{dn}{dc} \right]^2 \cdot \left[ \frac{C_p}{I - I_0} \right]_{\substack{C_p \rightarrow 0 \\ \theta \rightarrow 0}} \quad (29)$$

avec  $\bar{M}_w$  = masse molaire moyenne en poids

$K$  = constante de l'appareil faisant intervenir la longueur d'onde de la lumière et le rapport de Rayleigh du solvant utilisé comme référence

$I_B$  = intensité diffusée par le solvant étalon

$\frac{dn}{dc}$  = incrément d'indice de réfraction propre au couple polymère-solvant considéré (exprimé en  $\text{cm}^3/\text{g}$ )

$C_p$  = concentration en polymère (exprimée en  $\text{g}/\text{cm}^3$ )

$I$  = intensité de la lumière diffusée par la solution

$I_0$  = intensité de la lumière diffusée par le solvant

$\theta$  = angle de diffusion

Les mesures de l'incrément de réfraction ( $dn/dc$ ) ont été effectuées à 25°C. La gamme de concentration est comprise entre  $4 \cdot 10^{-3}$  et  $2 \cdot 10^{-2} \text{ g.mL}^{-1}$ .

D'un point de vue pratique, la détermination de la masse molaire consiste à mesurer l'intensité diffusée à différents angles par des solutions à différentes concentrations en polymère. Les solutions sont obtenues par dilution ( $2C/3$ ,  $C/2$ ,  $C/3$ ,  $C/4$ ) d'une solution mère de concentration  $C$  ( $\approx 9 \cdot 10^{-3} \text{ g.mL}^{-1}$ ). Les solutions sont dépoussiérées par centrifugation pendant deux heures à 20000  $\text{tr.min}^{-1}$  ( $\sim 38000 \text{ g}$ ). Les mesures sont effectuées à température ambiante. La masse molaire est obtenue par extrapolation à concentration nulle en utilisant le logiciel Excel. Les variations sont linéaires en fonction de la concentration. Dans le cas des masses molaires  $\leq 200\,000$ , on effectue seulement une extrapolation à concentration nulle en utilisant les valeurs d'intensité diffusée à  $90^\circ$ . La validité des mesures à un seul angle est vérifiée en contrôlant l'absence de dissymétrie ( $I_{45^\circ}/I_{135^\circ} \leq 1.10$ ).



## 2) Analyse par chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Cette méthode repose sur le fractionnement des différentes macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique et permet ainsi de déterminer la dispersité d'un échantillon. L'élution des polymères en solution diluée est effectuée au travers de colonnes composées d'un gel polymère réticulé poreux. Selon la taille des macromolécules de l'échantillon étudié, leur trajet au sein du gel (et par conséquent leur temps de rétention) sera plus ou moins long. Les molécules dont les dimensions sont les plus réduites auront accès à un maximum de pores alors que les molécules dont le volume hydrodynamique est supérieur à la taille des pores ne pénétreront pas à l'intérieur du gel et seront éluées les premières. Ces dernières permettent de définir le volume mort (ou volume d'exclusion totale)  $V_0$  de la colonne. Cette technique permet d'obtenir facilement, par l'intermédiaire de l'allure du chromatogramme, la distribution en masse de l'échantillon.

L'exclusion stérique d'une macromolécule est fonction de son volume hydrodynamique qui est proportionnel au produit  $[\eta].M$  donné par la relation de Flory-Fox :

$$[\eta] = \Phi \cdot \frac{\langle L^2 \rangle^{3/2}}{M} \quad (30)$$

où  $[\eta]$  est la viscosité intrinsèque,  $M$  la masse molaire,  $\langle L^2 \rangle$ , la distance quadratique moyenne entre les extrémités de la chaîne et  $\Phi$  le paramètre de Flory-Fox.

Le volume d'élution  $V_e$  caractéristique de chaque fraction est défini par :

$$V_e = V_0 + K_d \cdot V_p \quad (31)$$

$V_p$  est le volume poreux (volume du solvant contenu dans le gel) et  $K_d$  le coefficient de distribution décrivant le degré de pénétration du soluté dans le gel. Le produit de  $K_d$  et  $V_p$  est appelé volume accessible  $V_a$ . Dans la pratique, l'évolution du chromatogramme est suivie en fonction du volume d'élution. L'analyse de l'éluat se fait par mesure de l'indice de réfraction ou par diffusion de la lumière.

La distribution en masse d'un échantillon hétéromoléculaire est déterminée à partir de l'analyse d'une série d'étalons isomoléculaires de masses connues.

Dans le cadre de cette thèse, les mesures ont été effectuées à température ambiante dans le THF avec une vitesse d'élution d'1 mL/min. Les échantillons étalons utilisés sont des solutions de poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA, 13 échantillons étalons de masse  $M$  telle que  $1000 < M < 1600000$ ).

# **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) *Polymeric Delivery Systems: Properties and Applications*; El-Nokaly, M. A., Piatt, D. M., Charpentier, B. A., Eds.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 1993; Vol. 520. <https://doi.org/10.1021/bk-1993-0520>.
- (2) Duncan, R.; Kopeček, J. Soluble Synthetic Polymers as Potential Drug Carriers. In *Polymers in Medicine*; Advances in Polymer Science; Springer: Berlin, Heidelberg, 1984; pp 51–101. [https://doi.org/10.1007/3-540-12796-8\\_10](https://doi.org/10.1007/3-540-12796-8_10).
- (3) Gregoriadis, G. *Drug Carriers in Biology and Medicine*, London, New-York, Academic Press.; G. Gregoriadis, 1979.
- (4) Chang, H. W.; Bock, E. Pitfalls in the Use of Commercial Nonionic Detergents for the Solubilization of Integral Membrane Proteins: Sulfhydryl Oxidizing Contaminants and Their Elimination. *Anal. Biochem.* **1980**, *104* (1), 112–117. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90283-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90283-3).
- (5) VanAken, T.; Foxall-VanAken, S.; Castleman, S.; Ferguson-Miller, S. Alkyl Glycoside Detergents: Synthesis and Applications to the Study of Membrane Proteins. *Methods Enzymol.* **1986**, *125*, 27–35. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(86\)25005-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(86)25005-3).
- (6) Barthélémy, P.; Maurizis, J. C.; Lacombe, J. M.; Pucci, B. A New Class of Sulfoxide Surfactants Derived from Tris. Synthesis and Preliminary Assessments of Their Properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8* (12), 1559–1562. [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(98\)00263-7](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(98)00263-7).
- (7) Tribet, C.; Audebert, R.; Popot, J. L. Amphipols: Polymers That Keep Membrane Proteins Soluble in Aqueous Solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93* (26), 15047–15050. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15047>.
- (8) Tribet, C.; Audebert, R.; Popot, J.-L. Stabilization of Hydrophobic Colloidal Dispersions in Water with Amphiphilic Polymers: Application to Integral Membrane Proteins. *Langmuir* **1997**, *13* (21), 5570–5576. <https://doi.org/10.1021/la970136j>.
- (9) Tribet, C.; Mills, D.; Haider, M.; Popot, J. L. Scanning Transmission Electron Microscopy Study of the Molecular Mass of Amphipol/Cytochrome B6f Complexes. *Biochimie* **1998**, *80* (5–6), 475–482. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(00\)80014-0](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(00)80014-0).
- (10) Ringsdorf, H. *Travaux Non Publiés*.
- (11) *Surfactants*; Tadros, T. F., Ed.; Academic Press: London ; Orlando, 1984.
- (12) Berthod, A. Structures Physico-Chimiques Des Milieux Dispersés, Micelles Émulsions et Microémulsions. *J. Chim. Phys.* **1983**, *80*, 407–424. <https://doi.org/10.1051/jcp/1983800407>.
- (13) Tanford, C. The Hydrophobic Effect and the Organization of Living Matter. *Science* **1978**, *200* (4345), 1012–1018. <https://doi.org/10.1126/science.653353>.
- (14) Jolicœur, C.; Philip, P. R. Enthalpy–Entropy Compensation for Micellization and Other Hydrophobic Interactions in Aqueous Solutions. *Can. J. Chem.* **1974**, *52* (10), 1834–1839. <https://doi.org/10.1139/v74-262>.

- (15) Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 Mol. Chem. Phys.* **1976**, *72* (0), 1525–1568. <https://doi.org/10.1039/F29767201525>.
- (16) Krafft, F.; Wiglow, H. Ueber Das Verhalten Der Fettsauren Alkalien Und Der Seifen in Gegenwart von Wasser. IV. Die Seifen Als Colloïde. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1895**, *28* (3), 2573–2582. <https://doi.org/10.1002/cber.18950280350>.
- (17) Shinoda, K.; Nakagawa, T.; Tamamushi, B.-I.; Isemura, T. *Colloidal Surfactants. Some Physicochemical Properties.*; New York : Academic Press, 1963.
- (18) Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13* (1), 238–252. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(65)80093-6).
- (19) Johnston, D. S.; Sanghera, S.; Pons, M.; Chapman, D. Phospholipid Polymers--Synthesis and Spectral Characteristics. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *602* (1), 57–69. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(80\)90289-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(80)90289-8).
- (20) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **1972**, *175* (4023), 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>.
- (21) Pautsch, A.; Schulz, G. E. High-Resolution Structure of the OmpA Membrane Domain 11 Edited by D. C. Rees. *J. Mol. Biol.* **2000**, *298* (2), 273–282. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3671>.
- (22) Georgiou, G.; Valax, P.; Ostermeier, M.; Horowitz, P. M. Folding and Aggregation of TEM  $\beta$ -Lactamase: Analogies with the Formation of Inclusion Bodies in Escherichia Coli. *Protein Sci.* **1994**, *3* (11), 1953–1960. <https://doi.org/10.1002/pro.5560031107>.
- (23) Helenius, A.; Simons, K. Solubilization of Membranes by Detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *415* (1), 29–79. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(75\)90016-7](https://doi.org/10.1016/0304-4157(75)90016-7).
- (24) Tanford, C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, 2d ed.; Wiley: New York, 1980.
- (25) Stubbs, G. W.; Litman, B. J. Effect of Alterations in the Amphipathic Microenvironment on the Conformational Stability of Bovine Opsin. 1. Mechanism of Solubilization of Disk Membranes by the Nonionic Detergent, Octyl Glucoside. *Biochemistry* **1978**, *17* (2), 215–219. <https://doi.org/10.1021/bi00595a003>.
- (26) Edwards, K.; Gustafsson, J.; Almgren, M.; Karlsson, G. Solubilization of Lecithin Vesicles by a Cationic Surfactant: Intermediate Structures in the Vesicle-Micelle Transition Observed by Cryo-Transmission Electron Microscopy. *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, *161* (2), 299–309. <https://doi.org/10.1006/jcis.1993.1470>.
- (27) Le Maire, M.; Kwee, S.; Andersen, J. P.; Møller, J. V. Mode of Interaction of Polyoxyethyleneglycol Detergents with Membrane Proteins. *Eur. J. Biochem.* **1983**, *129* (3), 525–532. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07080.x>.
- (28) Huang, P.; Liu, Q.; Scarborough, G. A. Lysophosphatidylglycerol: A Novel Effective Detergent for Solubilizing and Purifying the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Anal. Biochem.* **1998**, *259* (1), 89–97. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2633>.

- (29) Rigaud, J. L.; Paternostre, M. T.; Bluzat, A. Mechanisms of Membrane Protein Insertion into Liposomes during Reconstitution Procedures Involving the Use of Detergents. 2. Incorporation of the Light-Driven Proton Pump Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **1988**, *27* (8), 2677–2688. <https://doi.org/10.1021/bi00408a007>.
- (30) Furth, A. J. Removing Unbound Detergent from Hydrophobic Proteins. *Anal. Biochem.* **1980**, *109* (2), 207–215. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90638-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90638-7).
- (31) Booth, P. J. Unravelling the Folding of Bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2000**, *1460* (1), 4–14. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00125-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00125-0).
- (32) Milder, S. J.; Thorgeirsson, T. E.; Miercke, L. J. W.; Stroud, R. M.; Kliger, D. S. Effects of Detergent Environments on the Photocycle of Purified Monomeric Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **1991**, *30* (7), 1751–1761. <https://doi.org/10.1021/bi00221a004>.
- (33) Paternostre, M.; Roux, M.; Rigaud, J. Mechanisms of Membrane Protein Insertion into Liposomes during Reconstitution Procedures Involving the Use of Detergents. 1. Solubilization of Large Unilamellar Liposomes (Prepared by Reverse-Phase Evaporation) by Triton X-100 Octyl Glucoside, and Sodium Cholate. *Biochemistry* **1988**, *27*, 2668–2677. <https://doi.org/10.1021/bi00408a006>.
- (34) Scheule, R. K.; Gaffney, B. J. Reconstitution of Membranes with Fractions of Triton X-100 Which Are Easily Removed. *Anal. Biochem.* **1981**, *117* (1), 61–66. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90691-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90691-6).
- (35) Ross, D. D.; Thompson, B. W.; Joneckis, C. C.; Akman, S. A.; Schiffer, C. A. Metabolism of Ara-C by Blast Cells from Patients with ANLL. *Blood* **1986**, *68* (1), 76–82.
- (36) Wei, D.; Fabris, D.; Fenselau, C. Covalent Sequestration of Phosphoramidate Mustard by Metallothionein—An In Vitro Study. *Drug Metab. Dispos.* **1999**, *27* (7), 786–791.
- (37) Guo, W.; Healey, J. H.; Meyers, P. A.; Ladanyi, M.; Huvos, A. G.; Bertino, J. R.; Gorlick, R. Mechanisms of Methotrexate Resistance in Osteosarcoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **1999**, *5* (3), 621–627.
- (38) Gregoriadis, G.; Senior, J.; Trouet, A. *Targeting of Drugs*; Springer US: Boston, MA, 1982.
- (39) Fiddler, M. B.; Hudson, L. D.; Desnick, R. J. Immunological Evaluation of Repeated Administration of Erythrocyte-Entrapped Protein to C3H/HeJ Mice. *Biochem. J.* **1977**, *168* (2), 141–145. <https://doi.org/10.1042/bj1680141>.
- (40) *Les Liposomes: aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*; Delattre, J., Groupe Thématique de Recherche sur les Vecteurs, Eds.; Éd. INSERM [u.a.]: Paris, 1993.
- (41) Oku, N. Anticancer Therapy Using Glucuronate Modified Long-Circulating Liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *40* (1), 63–73. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(99\)00040-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(99)00040-X).
- (42) Maruyama, K.; Ishida, O.; Takizawa, T.; Moribe, K. Possibility of Active Targeting to Tumor Tissues with Liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *40* (1), 89–102. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(99\)00042-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(99)00042-3).

- (43) Faroux-Corlay, B.; Clary, L.; Gadras, C.; Hammache, D.; Greiner, J.; Santaella, C.; Aubertin, A.-M.; Vierling, P.; Fantini, J. Synthesis of Single- and Double-Chain Fluorocarbon and Hydrocarbon Galactosyl Amphiphiles and Their Anti-HIV-1 Activity. *Carbohydr. Res.* **2000**, *327* (3), 223–260. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00055-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00055-0).
- (44) Uchegbu, I. The Biodistribution of Novel 200-Nm Palmitoyl Muramic Acid Vesicles. *Int. J. Pharm.* **1998**, *162* (1), 19–27. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00408-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00408-0).
- (45) Anton, P.; Köberle, P.; Laschewsky, A. Recent Developments in the Field of Micellar Polymers. *Makromol. Chem.* **1993**, *194* (1), 1–27. <https://doi.org/10.1002/macp.1993.021940101>.
- (46) Nagai, K.; Elias, H.-G. Polymerizable Amphiphiles, 3. Polymerization of Micellized 1-O-3-(4-Vinylphenyl)Propyl- $\beta$ -D-Glucopyranose. *Makromol. Chem.* **1987**, *188* (5), 1095–1127. <https://doi.org/10.1002/macp.1987.021880514>.
- (47) *Polymers in Aqueous Media: Performance through Association*; Glass, J. E., American Chemical Society, Eds.; Advances in chemistry series; American Chemical Society: Washington, DC, 1989.
- (48) *Hydrophilic Polymers: Performance with Environmental Acceptance*; Glass, J. E., American Chemical Society, American Chemical Society, Eds.; Advances in chemistry series; American Chemical Society: Washington, DC, 1996.
- (49) Ray, A. K. Effects of Chemical Constituents on Crystalline Properties of Ethylene Ionomers. *J. Therm. Anal.* **1996**, *46* (6), 1527–1539. <https://doi.org/10.1007/BF01980759>.
- (50) Strauss, U. P.; Jackson, E. G. Polysoaps. I. Viscosity and solubilization studies on an n-dodecyl bromide addition compound of poly-2-vinylpyridine. *J. Polym. Sci.* **1951**, *6* (5), 649–659. <https://doi.org/10.1002/pol.1951.120060515>.
- (51) Cochlin, D.; Hendlinger, P.; Laschewsky, A. Polysoaps with Fluorocarbon Hydrophobic Chains. *Colloid Polym. Sci.* **1995**, *273* (12), 1138–1143. <https://doi.org/10.1007/BF00653081>.
- (52) Damas, C.; Brembilla, A.; Lochon, P. Effect of Polymer Microdomains on the Catalysed Esterolysis of Hydrophobic Picolinic Esters. *J. Mol. Catal. Chem.* **1996**, *106* (1), 31–41. [https://doi.org/10.1016/1381-1169\(95\)00252-9](https://doi.org/10.1016/1381-1169(95)00252-9).
- (53) Alexandridis, P. Amphiphilic Copolymers and Their Applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, *1* (4), 490–501. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(96\)80118-X](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(96)80118-X).
- (54) Duhamel, J.; Yekta, A.; Hu, Y. Z.; Winnik, M. A. Evidence for Intramolecular Hydrophobic Association in Aqueous Solution for Pyrene-End-Capped Poly(Ethylene Oxide). *Macromolecules* **1992**, *25* (25), 7024–7030. <https://doi.org/10.1021/ma00051a046>.
- (55) Alami, E.; Rawiso, M.; Isel, F.; Beinert, G.; Binana-Limbele, W.; François, J. Model Hydrophobically End-Capped Poly(Ethylene Oxide) in Water. In *Hydrophilic Polymers*;

- Advances in Chemistry; American Chemical Society, 1996; Vol. 248, pp 343–362. <https://doi.org/10.1021/ba-1996-0248.ch018>.
- (56) Knowles, P. R.; Barlow, R. J.; Heatley, F.; Booth, C.; Price, C. A Study of Chain Dynamics in Water-Swollen Gels of Poly(Ethylene Oxide) Dialkyl Ethers Using NMR and Differential Scanning Calorimetry. *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, *195* (7), 2547–2558. <https://doi.org/10.1002/macp.1994.021950722>.
- (57) Amiel, C.; Sébille, B. Association between Amphiphilic Poly(Ethylene Oxide) and  $\beta$ -Cyclodextrin Polymers: Aggregation and Phase Separation. Part of This Paper Was Presented at the Conference on 'Associating Polymer', Fontevraud, France, November 1997.1. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1999**, *79* (2), 105–122. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00070-0](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00070-0).
- (58) Huldén, M. Hydrophobically Modified Urethane—Ethoxylate (HEUR) Associative Thickeners 2. Interaction with Latex. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1994**, *88* (2), 207–221. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(94\)02835-4](https://doi.org/10.1016/0927-7757(94)02835-4).
- (59) Yekta, A.; Nivaggioli, T.; Kanagalingam, S.; Xu, B.; Masoumi, Z.; Winnik, M. A. Urethane-Coupled Poly(Ethylene Glycol) Polymers Containing Hydrophobic End Groups. In *Hydrophilic Polymers*; Advances in Chemistry; American Chemical Society, 1996; Vol. 248, pp 363–376. <https://doi.org/10.1021/ba-1996-0248.ch019>.
- (60) Fonnum, G.; Bakke, J.; Hansen, F. K. Associative Thickeners. Part I: Synthesis, Rheology and Aggregation Behavior. *Colloid Polym. Sci.* **1993**, *271* (4), 380–389. <https://doi.org/10.1007/BF00657419>.
- (61) Lundberg, D. J.; Brown, R. G.; Glass, J. E.; Eley, R. R. Synthesis, Characterization, and Solution Rheology of Model Hydrophobically-Modified, Water-Soluble Ethoxylated Urethanes. *Langmuir* **1994**, *10* (9), 3027–3034. <https://doi.org/10.1021/la00021a028>.
- (62) Landoll, L. M. Modified Nonionic Cellulose Ethers. US4228277A, October 14, 1980.
- (63) Hwang, F. S.; Hogen-Esch, T. E. Fluorocarbon-Modified Water-Soluble Cellulose Derivatives. *Macromolecules* **1993**, *26* (12), 3156–3160. <https://doi.org/10.1021/ma00064a027>.
- (64) Landoll, L. M. Nonionic Polymer Surfactants. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1982**, *20* (2), 443–455. <https://doi.org/10.1002/pol.1982.170200218>.
- (65) Winnik, F. M. Association of Hydrophobic Polymers in Water: Fluorescence Studies with Labeled (Hydroxypropyl)Celluloses. *Macromolecules* **1989**, *22* (2), 734–742. <https://doi.org/10.1021/ma00192a038>.
- (66) Winnik, F. M.; Winnik, M. A.; Tazuke, S.; Ober, C. K. Synthesis and Characterization of Pyrene-Labeled Hydroxypropyl Cellulose and Its Fluorescence in Solution. *Macromolecules* **1987**, *20* (1), 38–44. <https://doi.org/10.1021/ma00167a008>.
- (67) Winnik, F. M.; Winnik, M. A.; Tazuke, Shigeo. Interaction of Hydroxypropylcellulose with Aqueous Surfactants: Fluorescence Probe Studies and a Look at Pyrene-Labeled Polymer. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91* (3), 594–597. <https://doi.org/10.1021/j100287a021>.

- (68) Akiyoshi, K.; Deguchi, S.; Moriguchi, N.; Yamaguchi, S.; Sunamoto, J. Self-Aggregates of Hydrophobized Polysaccharides in Water. Formation and Characteristics of Nanoparticles. *Macromolecules* **1993**, *26* (12), 3062–3068. <https://doi.org/10.1021/ma00064a011>.
- (69) Akiyoshi, K.; Yamaguchi, S.; Sunamoto, J. Self-Aggregates of Hydrophobic Polysaccharide Derivatives. *Chem. Lett.* **1991**, *20* (7), 1263–1266. <https://doi.org/10.1246/cl.1991.1263>.
- (70) Picton, L. Propriétés En Solution Aqueuse d'éthers Cellulosiques Associatifs. Influence Des Cosolutés et de La Température : Conséquences Rhéologiques. thesis, Rouen, 1996.
- (71) Caritey, J.-P. Relation Entre La Modification Chimique de Précurseurs Hydrophiles d'origine Naturelle et Leurs Propriétés En Solution Diluée et Semi-Diluée. thesis, Rouen, 1994.
- (72) Sinquin, A. Alginates Associatifs : Synthèse et Étude Physico-Chimique En Milieu Aqueux. thesis, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL, 1995.
- (73) Sinquin, A.; Hubert, P.; Dellacherie, E. Amphiphilic Derivatives of Alginate: Evidence for Intra- and Intermolecular Hydrophobic Associations in Aqueous Solution. *Langmuir* **1993**, *9* (12), 3334–3337. <https://doi.org/10.1021/la00036a002>.
- (74) Zhang, G.; Zhang, Z.; Xie, F.; Hu, X.; Luo, X.; Chen, X. Chlorohydrin Water Swellable Rubber Compatibilized by an Amphiphilic Graft Copolymer. I. Synthesis and Characterization of Compatibilizer PVA-g-PBA. *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *75* (8), 977–986. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(20000222\)75:8<977::AID-APP1>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(20000222)75:8<977::AID-APP1>3.0.CO;2-6).
- (75) Imai, K.; Shiomi, T.; Tezuka, Y.; Takahashi, K.; Satoh, M. Michael Addition Reaction of Vinyl Sulfoxide with Poly(Vinyl Alcohol). *J. Macromol. Sci. Part - Chem.* **1985**, *22* (10), 1359–1369. <https://doi.org/10.1080/00222338508063340>.
- (76) Yahya, G. O.; Ali, S. A.; Al-Naafa, M. A.; Hamad, E. Z. Preparation and Viscosity Behavior of Hydrophobically Modified Poly(Vinyl Alcohol) (PVA). *J. Appl. Polym. Sci.* **1995**, *57* (3), 343–352. <https://doi.org/10.1002/app.1995.070570311>.
- (77) Seki, T.; Ichimura, K.; Fukuda, R.; Tanigaki, T.; Tamaki, T. Illumination-Induced Modifications of Langmuir–Blodgett Films Consisting of a Deuterated Poly(Vinyl Alcohol) Having an Azobenzene Side Chain Transferred at Varied Packing Density. *Macromolecules* **1996**, *29* (3), 892–898. <https://doi.org/10.1021/ma951268r>.
- (78) Seki, T.; Sekizawa, H.; Fukuda, R.; Tamaki, T.; Yokoi, M.; Ichimura, K. Features of Photomechanical Response in Monolayers Composed of a Charged Amphiphilic Azobenzene Polymer. *Polym. J.* **1996**, *28* (7), 613–618. <https://doi.org/10.1295/polymj.28.613>.
- (79) Seki, T.; Sekizawa, H.; Tanaka, K.; Matsuzawa, Y.; Ichimura, K. Photoresponsive Monolayers on Water and Solid Surfaces. *Supramol. Sci.* **1998**, *5* (3), 373–377. [https://doi.org/10.1016/S0968-5677\(98\)00034-0](https://doi.org/10.1016/S0968-5677(98)00034-0).



- (80) Tezuka, Y.; Araki, A. Synthesis of Poly(Vinyl Alcohol)-Graft-Polystyrene. *Makromol. Chem.* **1993**, *194* (10), 2827–2837. <https://doi.org/10.1002/macp.1993.021941016>.
- (81) Wulff, G.; Jakoby, K. Amphiphilic Polymers from Long-Chain (Z)-2-Alkoxyvinyl Acetates. *Macromolecules* **1996**, *29* (8), 2776–2782. <https://doi.org/10.1021/ma951324o>.
- (82) Tirtaatmadja, V.; Tam, K. C.; Jenkins, R. D. Effect of a Nonionic Surfactant on the Flow Dynamics of a Model HASE Associative Polymer. *AIChE J.* **1998**, *44* (12), 2756–2765. <https://doi.org/10.1002/aic.690441216>.
- (83) Wang, K. T.; Iliopoulos, I.; Audebert, R. Viscometric Behaviour of Hydrophobically Modified Poly(Sodium Acrylate). *Polym. Bull.* **1988**, *20* (6), 577–582. <https://doi.org/10.1007/BF00263675>.
- (84) Sarrazin-Cartalas, A.; Iliopoulos, I.; Audebert, R.; Olsson, U. Association and Thermal Gelation in Mixtures of Hydrophobically Modified Polyelectrolytes and Nonionic Surfactants. *Langmuir* **1994**, *10* (5), 1421–1426. <https://doi.org/10.1021/la00017a018>.
- (85) Iliopoulos, I.; Olsson, U. Polyelectrolyte Association to Micelles and Bilayers. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98* (5), 1500–1505. <https://doi.org/10.1021/j100056a022>.
- (86) Poncet-Legrand, C.; Lafuma, F.; Audebert, R. Rheological Behaviour of Colloidal Dispersions of Hydrophobic Particles Stabilised in Water by Amphiphilic Polyelectrolytes. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1999**, *152* (3), 251–261. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00510-X](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00510-X).
- (87) Collet, J.; Tribet, C.; Gareil, P. Use of Neutral Surfactants for the Capillary Electrophoretic Separation of Hydrophobically Modified Poly(Acrylic Acids). *Electrophoresis* **1996**, *17* (7), 1202–1209. <https://doi.org/10.1002/elps.1150170706>.
- (88) Petit, F.; Audebert, R.; Iliopoulos, I. Interactions of Hydrophobically Modified Poly(Sodium Acrylate) with Globular Proteins. *Colloid Polym. Sci.* **1995**, *273* (8), 777–781. <https://doi.org/10.1007/BF00658756>.
- (89) Porcar, I.; Cottet, H.; Gareil, P.; Tribet, C. Association between Protein Particles and Long Amphiphilic Polymers: Effect of the Polymer Hydrophobicity on Binding Isotherms. *Macromolecules* **1999**, *32* (12), 3922–3929. <https://doi.org/10.1021/ma981805i>.
- (90) Tribet, C.; Porcar, I.; Bonnefont, P. A.; Audebert, R. Association between Hydrophobically Modified Polyanions and Negatively Charged Bovine Serum Albumin. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (7), 1327–1333. <https://doi.org/10.1021/jp973022p>.
- (91) Hill, A. Synthèse, Caractérisation et Propriétés de Polyacrylamides s'associant Par Interactions Hydrophobes, Louis Pasteur, Strasbourg, 1991.
- (92) Hill, A.; Candau, F.; Selb, J. Properties of Hydrophobically Associating Polyacrylamides: Influence of the Method of Synthesis. *Macromolecules* **1993**, *26* (17), 4521–4532. <https://doi.org/10.1021/ma00069a017>.
- (93) Evani, S. Water-Dispersible Hydrophobic Thickening Agent. US4432881A, February 21, 1984.

- (94) Candau, F. *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, 2nd ed.; Mark, H. F., Bikales, N. M., Overberger, C. G., Mengès, G., Eds.; Kroschwitz J. L. Wiley-Interscience, New York, 1987; Vol. 9.
- (95) *An Introduction to Polymer Colloids*; Candau, F., Ottewill, R. H., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht ; Boston, 1990.
- (96) Candau, F.; Leong, Y. S.; Fitch, R. M. Kinetic Study of the Polymerization of Acrylamide in Inverse Microemulsion. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1985**, *23* (1), 193–214. <https://doi.org/10.1002/pol.1985.170230120>.
- (97) Volpert, E. Copolymères d'acrylamide et d'alkylacrylamides : Synthèse, Propriétés Associatives En Solution et Adsorption Sur Des Silicates, Louis Pasteur, Strasbourg, 1996.
- (98) Volpert, E.; Selb, J.; Candau, F. Influence of the Hydrophobe Structure on Composition, Microstructure, and Rheology in Associating Polyacrylamides Prepared by Micellar Copolymerization. *Macromolecules* **1996**, *29* (5), 1452–1463. <https://doi.org/10.1021/ma951178m>.
- (99) Pabon, M. Synthèse En Émulsion et Microémulsion Inverse de Polymères Associatifs Hydrosolubles : Propriétés Rhéologiques En Solution, Louis Pasteur, Strasbourg, 1997.
- (100) Winnik, F. M. Phase Transition of Aqueous Poly-(N-Isopropylacrylamide) Solutions: A Study by Non-Radiative Energy Transfer. *Polymer* **1990**, *31* (11), 2125–2134. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(90\)90085-D](https://doi.org/10.1016/0032-3861(90)90085-D).
- (101) Ringsdorf, H.; Venzmer, J.; Winnik, F. M. Fluorescence Studies of Hydrophobically Modified Poly(N-Isopropylacrylamides). *Macromolecules* **1991**, *24* (7), 1678–1686. <https://doi.org/10.1021/ma00007a034>.
- (102) Yamazaki, A.; Winnik, F. M.; Cornelius, R. M.; Brash, J. L. Modification of Liposomes with N-Substituted Polyacrylamides: Identification of Proteins Adsorbed from Plasma. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1999**, *1421* (1), 103–115. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00117-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00117-0).
- (103) Polozova, A.; Winnik, F. M. Mechanism of the Interaction of Hydrophobically-Modified Poly-(N-Isopropylacrylamides) with Liposomes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1997**, *1326* (2), 213–224. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(97\)00025-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(97)00025-4).
- (104) Molyneux, P. *Water-Soluble Synthetic Polymers: Properties and Behavior*; CRC Press: Boca Raton, Fla, 1984.
- (105) Bekturov, E. A.; Bakauova, Z. C. *Synthetic Water-Soluble Polymers in Solution*; Hüthig & Wepf: Basel, 1986.
- (106) Taylor, L. D.; Cerankowski, L. D. Preparation of Films Exhibiting a Balanced Temperature Dependence to Permeation by Aqueous Solutions—a Study of Lower Consolute Behavior. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1975**, *13* (11), 2551–2570. <https://doi.org/10.1002/pol.1975.170131113>.
- (107) Miyazaki, H.; Kataoka, K. Preparation of Polyacrylamide Derivatives Showing Thermo-Reversible Coacervate Formation and Their Potential Application to Two-Phase

- Separation Processes. *Polymer* **1996**, *37* (4), 681–685. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(96\)83156-9](https://doi.org/10.1016/0032-3861(96)83156-9).
- (108) Hourdet, D.; L'Alloret, F.; Audebert, R. Reversible Thermo-thickening of Aqueous Polymer Solutions. *Polymer* **1994**, *35* (12), 2624–2630. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(94\)90390-5](https://doi.org/10.1016/0032-3861(94)90390-5).
- (109) Durand, A.; Hourdet, D. Thermoassociative Graft Copolymers Based on Poly(N-Isopropylacrylamide): Effect of Added Co-Solutes on the Rheological Behaviour. *Polymer* **2000**, *41* (2), 545–557. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00212-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00212-8).
- (110) Durand, A.; Hourdet, D. Thermoassociative Graft Copolymers Based on Poly(N-Isopropylacrylamide): Relation between the Chemical Structure and the Rheological Properties. *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, *201* (8), 858–868. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3935\(20000501\)201:8<858::AID-MACP858>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3935(20000501)201:8<858::AID-MACP858>3.0.CO;2-6).
- (111) Franzin, C. M.; Macdonald, P. M.; Polozova, A.; Winnik, F. M. Destabilization of Cationic Lipid Vesicles by an Anionic Hydrophobically Modified Poly(N-Isopropylacrylamide) Copolymer: A Solid-State <sup>31</sup>P NMR and <sup>2</sup>H NMR Study. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1998**, *1415* (1), 219–234. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(98\)00198-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(98)00198-9).
- (112) Selb, J.; Biggs, S.; Renoux, D.; Candau, F. Hydrophobic and Electrostatic Interactions in Water-Soluble Associating Copolymers; 1993; Vol. 69, pp 128–129.
- (113) Polidori, A.; Pucci, B.; Zarif, L.; Lacombe, J.-M.; Riess, J. G.; Pavia, André A. Vesicles and Other Supramolecular Systems Made from Double-Tailed Synthetic Glycolipids Derived from Galactosylated Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane. *Chem. Phys. Lipids* **1995**, *77* (2), 225–251. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(95\)02475-X](https://doi.org/10.1016/0009-3084(95)02475-X).
- (114) Polidori, A.; Pucci, B.; Zarif, L.; Riess, J. G.; Pavia, A. A. Effect of Polymerization of Synthetic Glycolipids on Their Supramolecular Assemblies. *Macromol. Rapid Commun.* **1996**, *17* (4), 229–238. <https://doi.org/10.1002/marc.1996.030170405>.
- (115) Wathier, M. Synthèse de Nouvelles Molécules Amphiphiles de Type Bolaforme et Gemini : Étude de Leur Comportement En Milieu Aqueux. thesis, Avignon, 1999.
- (116) Ouari, O.; Polidori, A.; Pucci, B.; Tordo, P.; Chalier, F. Synthesis of a Glycolipidic Amphiphilic Nitron as a New Spin Trap. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (10), 3554–3556. <https://doi.org/10.1021/jo982343+>.
- (117) Ashton, P. R.; Boyd, S. E.; Brown, C. L.; Jayaraman, N.; Nepogodiev, S. A.; Stoddart, J. F. A Convergent Synthesis of Carbohydrate-Containing Dendrimers. *Chem. – Eur. J.* **1996**, *2* (9), 1115–1128. <https://doi.org/10.1002/chem.19960020913>.
- (118) Dandliker, P. J.; Diederich, F.; Gross, M.; Knobler, C. B.; Louati, A.; Sanford, E. M. Dendritische Porphyrine: Modulation Des Redoxpotentials Elektroaktiver Chromophore Durch Periphere Multifunktionalität. *Angew. Chem.* **1994**, *106* (17), 1821–1824. <https://doi.org/10.1002/ange.19941061713>.
- (119) Boyer, B.; Lamaty, G.; Moussamou-Missima, J. M.; Pavia, A. A.; Pucci, B.; Roque, J. P. Telomeres et cotelomeres d'intéret biologique et biomedical—V. Propriétés solubilisantes

- des telomeres derives du tris(hydroxymethyl) acrylamidomethane. *Eur. Polym. J.* **1991**, *27* (12), 1359–1363. [https://doi.org/10.1016/0014-3057\(91\)90235-G](https://doi.org/10.1016/0014-3057(91)90235-G).
- (120) Pavia, A. A.; Pucci, B.; Riess, J. G.; Zarif, L. New Fluorinated Biocompatible Non-Ionic Telomeric Amphiphiles Bearing Trishydroxymethyl Groups. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1* (2), 103–106. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)80240-1](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)80240-1).
- (121) Riess, J. G.; Pavia, A. A.; Pucci, B.; Zarif, L. Telomeric Tham-Derived Perfluoroalkylated Surfactants for Fluorocarbon Emulsions. *Biomater. Artif. Cells. Immobilization Biotechnol.* **1992**, *20* (2–4), 843–844. <https://doi.org/10.3109/10731199209119727>.
- (122) Zarif, L.; Riess, J. G.; Pucci, B.; Pavia, A. A. Biocompatibility of Alkyl and Perfluoroalkyl Telomeric Surfactants Derived from Tham. *Biomater. Artif. Cells. Immobilization Biotechnol.* **1993**, *21* (5), 597–608. <https://doi.org/10.3109/10731199309117384>.
- (123) Maurizis, J. C.; Azim, M.; Rapp, M.; Pucci, B.; Pavia, A.; Madelmont, J. C.; Veyre, A. Disposition in Rat of a New Fluorinated, Biocompatible, Non-Ionic Telomeric Carrier. *Xenobiotica* **1994**, *24* (6), 535–541. <https://doi.org/10.3109/00498259409043256>.
- (124) Myrtil, E.; Zarif, L.; Greiner, J.; Riess, J. G.; Pucci, B.; Pavia, AndréA. Perfluoroalkylated Telomers Derived from Tris(Hydroxymethyl)Acrylamidomethane as Surfactants and Co-Surfactants in Fluorocarbon Emulsions. *J. Fluor. Chem.* **1995**, *71* (1), 101–105. [https://doi.org/10.1016/0022-1139\(94\)03158-V](https://doi.org/10.1016/0022-1139(94)03158-V).
- (125) Boyer, B.; Lamatya, G.; Moussamou-Missima, J. M.; Pavia, A. A.; Pucci, B.; Roque, J. P. Télomères et cotélomères d'intérêt biologique et biomédical VI Activité catalytique des télomères dérivés du Tris (hydroxyméthyl) acrylamidométhane. *Tetrahedron* **1992**, *48* (12), 2415–2426. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)88761-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)88761-5).
- (126) Pucci, B.; Pavia, A. A. Telomers of Tris(Hydroxymethyl)-Acrylamidomethane, a New Class of Non-Ionic Surfactants: Synthesis and Assessment of Their Properties. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32* (11), 1437–1440. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(91\)80351-6](https://doi.org/10.1016/0040-4039(91)80351-6).
- (127) Maurizis, J. C.; Pavia, A. A.; Pucci, B. Efficiency of Non-Ionic Telomeric Surfactants for the Solubilization of Subcellular Fractions Proteins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3* (2), 161–164. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)80868-4](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80868-4).
- (128) Coulon, J.; Bonaly, R.; Pucci, B.; Polidori, A.; Barthelemy, P.; Contino, C. Cell Targeting by Glycosidic Telomers. Specific Recognition of the Kb CWL1 Lectin by Galactosylated Telomers. *Bioconjug. Chem.* **1998**, *9* (2), 152–159. <https://doi.org/10.1021/bc970056r>.
- (129) Chehade, F.; Maurizis, J.; Pucci, B.; Pavia, A.; Ollier, M.; Veyre, A.; Escaig, F.; Jeanguillaume, C.; Dennebouy, R.; Slodzian, G.; Hindié, E. Subcellular Distribution of a New Fluorinated, Biocompatible, Non-Ionic Telomeric Carrier: A Study in Cultured B16 Melanoma and Rat Skin Fibroblasts. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* **1996**, *42*, 335–342.
- (130) Coulon, J.; Thiebault, F.; Contino, C.; Polidori, A.; Bonaly, R.; Pucci, B. Permeability of Yeast Cell Envelope to Fluorescent Galactosylated Telomers Derived from THAM. *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11* (4), 461–468. <https://doi.org/10.1021/bc990178e>.

- (131) Contino, C.; Ollier, M.; Maurizis, J. C.; Lacombe, J. M.; Pucci, B. Synthesis of Cotelomers Derived from Tris(Hydroxymethyl)Acrylamidomethane (THAM) Bearing Cytosine Arabinoside Moieties. Preliminary Investigation of Their Biological Activity. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37 (50), 9049–9052. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(96\)02122-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(96)02122-3).
- (132) Contino, C.; Maurizis, J. C.; Pucci, B. Synthesis and Preliminary Biological Assessments of a New Class of Amphiphilic Telomers Bearing 5-Fluorouracil Moieties. *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, 200 (6), 1351–1355. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3935\(19990601\)200:6<1351::AID-MACP1351>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3935(19990601)200:6<1351::AID-MACP1351>3.0.CO;2-O).
- (133) Polidori, A.; Braun, O.; Mora, N.; Pucci\*, B. Synthesis of Polymerizable Double-Chain Glycolipids Derived from Tris. Polymerization in Aqueous Media. Preliminary Investigation of Their Colloidal Behavior. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38 (14), 2475–2478. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)00413-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)00413-9).
- (134) Myrtil, E.; Zarif, L.; Greiner, J.; Riess, J. G.; Pucci, B.; Pavia, A. A. Double-Tailed Perfluoroalkyl Telomeric Surfactants Derived from Tris(Hydroxymethyl)Acrylamidomethane for Medical Applications. *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, 195 (4), 1289–1304. <https://doi.org/10.1002/macp.1994.021950414>.
- (135) Pavia, A. A.; Pucci, B.; Riess, J. G.; Zarif, L. New Perfluoroalkyl Telomeric Non-Ionic Surfactants: Synthesis, Physicochemical and Biological Properties. *Makromol. Chem.* **1992**, 193 (9), 2505–2517. <https://doi.org/10.1002/macp.1992.021930933>.
- (136) Pucci, B. Travaux Non Publiés.
- (137) Mayo, F. R. Chain Transfer in the Polymerization of Styrene: The Reaction of Solvents with Free Radicals<sup>1</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, 65 (12), 2324–2329. <https://doi.org/10.1021/ja01252a021>.
- (138) O'Brien, J. L.; Gornick, F. Chain Transfer in the Polymerization of Methyl Methacrylate. I. Transfer with Monomer and Thiols. The Mechanism of the Termination Reaction at 60°<sup>1</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77 (18), 4757–4763. <https://doi.org/10.1021/ja01623a019>.
- (139) Tobolsky, A. V. Dead-End Radical Polymerization. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80 (22), 5927–5929. <https://doi.org/10.1021/ja01555a009>.
- (140) Rigaud, J.-P. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 1983.
- (141) Boutevin, B.; Piétrasanta, Y. Cinétiques de Télomérisation, 7. Calcul de  $k/KTe$  En Polymérisation Radicalaire de Divers Monomères. *Makromol. Chem.* **1986**, 187 (7), 1657–1668. <https://doi.org/10.1002/macp.1986.021870710>.
- (142) *Polymer Handbook*, 3rd ed.; Brandrup, J., Immergut, E. H., Eds.; Wiley: New York, 1989.
- (143) Pucci, B.; Guy, E.; Vial-Reveillon, F.; Pavia, A. A. Télomères et cotélomères d'intérêt biologique et biomedical—I. étude de la télomérisation radicalaire de monomères type acryloylpeptides. *Eur. Polym. J.* **1988**, 24 (11), 1077–1086. [https://doi.org/10.1016/0014-3057\(88\)90068-7](https://doi.org/10.1016/0014-3057(88)90068-7).

- (144) Dainton, F. S.; Tordoff, M. The Polymerization of Acrylamide in Aqueous Solution. Part 3.—The Hydrogen Peroxide Photosensitized Reaction at 25° C. *Trans. Faraday Soc.* **1957**, *53* (0), 499–511. <https://doi.org/10.1039/TF9575300499>.
- (145) Stälher, K.; Selb, J.; Pucci, B.; Candau, F. Travaux Non Publiés.
- (146) Chapiro, A. Polymerization and Copolymerization in Associated Monomer Aggregates. *Eur. Polym. J.* **1973**, *9* (5), 417–427. [https://doi.org/10.1016/0014-3057\(73\)90044-X](https://doi.org/10.1016/0014-3057(73)90044-X).
- (147) Gal'perina, N. I.; Gugunava, T. A.; Gromov, V. F.; Khomikovskii, P. M.; Abkin, A. D. Radical Polymerization of Acrylic and Fluoracrylic Acids in Various Solvents. *Polym. Sci. USSR* **1975**, *17* (7), 1670–1677. [https://doi.org/10.1016/0032-3950\(75\)90169-0](https://doi.org/10.1016/0032-3950(75)90169-0).
- (148) Loubat, C.; Javidan, A.; Boutevin, B. Etude de La Télomérisation de l'acide Acrylique Par Les Mercaptans, 1 Télomérisation de l'acide Acrylique Par l'acide Thioglycolique; Influence de La Nature Du Solvant Sur La Valeur de La Constante de Transfert et de  $K_p/\sqrt{k_t}$ . *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, *201*, 2845–2852. [https://doi.org/10.1002/1521-3935\(20001201\)201:18<2845::AID-MACP2845>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1521-3935(20001201)201:18<2845::AID-MACP2845>3.0.CO;2-7).
- (149) Nandi, U. S.; Ghosh, P.; Palit, S. R. Water as a Chain-Transferring Agent in Vinyl Polymerization. *Nature* **1962**, *195* (4847), 1197–1198. <https://doi.org/10.1038/1951197a0>.
- (150) Saito, N.; Sugawara, T.; Matsuda, T. Synthesis and Hydrophilicity of Multifunctionally Hydroxylated Poly(Acrylamides). *Macromolecules* **1996**, *29* (1), 313–319. <https://doi.org/10.1021/ma950419n>.
- (151) Gautier, E. C. L.; Graham, A. E.; McKillop, A.; Standen, S. P.; Taylor, R. J. K. Acetal and Ketal Deprotection Using Montmorillonite K10: The First Synthesis of Syn-4,8-Dioxatricyclo[5.1.0.0<sup>3,5</sup>]-2,6-Octanedione. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (11), 1881–1884. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)00226-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)00226-8).
- (152) Chalais, S.; Laszlo, P.; Mathy, A. Catalysis of the Cyclohexadienone-Phenol Rearrangement by a Lewis-Acidic Clay System. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27* (23), 2627–2630. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)84602-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)84602-X).
- (153) Cornéilis, A.; Laszlo, P. Molding Clays into Efficient Catalysts. *Synlett* **1994**, *1994* (3), 155–161. <https://doi.org/10.1055/s-1994-22775>.
- (154) Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed.; Wiley: New York, 1999.
- (155) Corey, E. J.; Danheiser, R. L.; Chandrasekaran, S.; Siret, P.; Keck, G. E.; Gras, J. L. Stereospecific Total Synthesis of Gibberellic Acid. A Key Tricyclic Intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100* (25), 8031–8034. <https://doi.org/10.1021/ja00493a055>.
- (156) Bernady, K. F.; Floyd, M. B.; Poletto, J. F.; Weiss, M. J. Prostaglandins and Congeners. 20. Synthesis of Prostaglandins via Conjugate Addition of Lithium Trans-1-Alkenyltrialkylalanate Reagents. A Novel Reagent for Conjugate 1,4-Additions. *J. Org. Chem.* **1979**, *44* (9), 1438–1447. <https://doi.org/10.1021/jo01323a017>.
- (157) Polidori, A.; Moreau, L. *Communication Personnelle*.

- (158) Contino, C. *Etudes Sur La Vectorisation et Le Ciblage Cellulaire de Principes Actifs Par Des Systèmes Vésiculaires et Macromoléculaires*, Avignon, Avignon, 1997.
- (159) Kurenkov, V. F.; Myagchenkov, V. A. Effects of Reaction Medium on the Radical Polymerization and Copolymerization of Acrylamide. *Eur. Polym. J.* **1980**, *16* (12), 1229–1239. [https://doi.org/10.1016/0014-3057\(80\)90030-0](https://doi.org/10.1016/0014-3057(80)90030-0).
- (160) Plochocka, K. Effect of the Reaction Medium on Radical Copolymerization. *J. Macromol. Sci. Part C* **1981**, *20* (1), 67–148. <https://doi.org/10.1080/00222358108080015>.
- (161) Saini, G.; Leoni, A.; Franco, S. Solvent Effects in Radical Copolymerization. I. Acrylamide. *Makromol. Chem.* **1971**, *144* (1), 235–244. <https://doi.org/10.1002/macp.1971.021440118>.
- (162) Saini, G.; Leoni, A.; Franco, S. Solvent Effect in Radical Copolymerization. II. N,N-Dimethyl Acrylamide. *Makromol. Chem.* **1971**, *146* (1), 165–171. <https://doi.org/10.1002/macp.1971.021460117>.
- (163) Leoni, A.; Franco, S.; Saini, G. Solvent Effects in Radical Copolymerization. IV. N-Methyl Acrylamide. *Makromol. Chem.* **1973**, *165* (1), 97–104. <https://doi.org/10.1002/macp.1973.021650110>.
- (164) Leydet, A.; Barragan, V.; Boyer, B.; Roque, J.-P.; Pucci, B.; Pavia, A. A. Télomérisation Radicalaire de Monomères N-Acryloyl-N-Alkylamino Esters d'intérêt Biologique. *Macromol. Chem. Phys.* **1995**, *196* (12), 3877–3890. <https://doi.org/10.1002/macp.1995.021961202>.
- (165) Matheson, M. S.; Auer, E. E.; Bevilacqua, E. B.; Hart, E. J. Rate Constants in Free Radical Polymerizations. IV. Methyl Acrylate. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73* (11), 5395–5400. <https://doi.org/10.1021/ja01155a114>.
- (166) Matheson, M. S.; Auer, E. E.; Bevilacqua, E. B.; Hart, E. J. Rate Constants in Free Radical Polymerizations. I. Methyl Methacrylate. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71* (2), 497–504. <https://doi.org/10.1021/ja01170a034>.
- (167) Dainton, F. S.; Sisley, W. D. Polymerization of Methacrylamide in Aqueous Solution. Part 1.—Hydrogen-Peroxide Photosensitized Reaction. *Trans. Faraday Soc.* **1963**, *59* (0), 1369–1376. <https://doi.org/10.1039/TF9635901369>.
- (168) Guyot, B.; Améduri, B.; Boutevin, B.; Sidéris, A. Synthèse et Polymérisation de Monomères Acryliques Fluorés Substitués En Position  $\alpha$ , 4. Applications à l' $\alpha$ -Acétoxyacrylate et à l' $\alpha$ -Propionyloxyacrylate de 2-Perfluorooctyléthyle. *Macromol. Chem. Phys.* **1995**, *196* (6), 1875–1886. <https://doi.org/10.1002/macp.1995.021960607>.
- (169) Srivastava, S. K.; Chauhan, P. M. S.; Bhaduri, A. P. A Novel Strategy for N-Alkylation of Primary Amines. *Synth. Commun.* **1999**, *29* (12), 2085–2091. <https://doi.org/10.1080/00397919908086201>.
- (170) March, J. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 4th ed.; Wiley: New York, 1992.

- (171) Leuckart, R. Ueber Symmetrische Und Unsymmetrische Dimethylbernsteinsäure. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1885**, 18 (2), 2344–2352. <https://doi.org/10.1002/cber.188501802114>.
- (172) Awachie, P. I.; Agwada, V. C. Evidence for Rate Limiting C-H Bond Cleavage in the Leuckart Reaction. *Tetrahedron* **1990**, 46 (6), 1899–1910. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)89758-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)89758-1).
- (173) Wallach, O. Ueber Menthylamin. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1891**, 24 (2), 3992–3993. <https://doi.org/10.1002/cber.189102402292>.
- (174) Ram, S.; Ehrenkauf, R. E. Ammonium Formate in Organic Synthesis: A Versatile Agent in Catalytic Hydrogen Transfer Reductions. *Synthesis* **1988**, 1988 (2), 91–95. <https://doi.org/10.1055/s-1988-27478>.
- (175) Lukasiewicz, A. A Study of the Mechanism of Certain Chemical Reactions—I: The Mechanism of the Leuckart-Wallach Reaction and of the Reduction of Schiff Bases by Formic Acid. *Tetrahedron* **1963**, 19 (11), 1789–1799. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)99253-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)99253-1).
- (176) Eschweiler, W. Ersatz von an Stickstoff Gebundenen Wasserstoffatomen Durch Die Methylgruppe Mit Hilfe von Formaldehyd. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1905**, 38 (1), 880–882. <https://doi.org/10.1002/cber.190503801154>.
- (177) Clarke, H. T.; Gillespie, H. B.; Weisshaus, S. Z. The Action of Formaldehyde on Amines and Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, 55 (11), 4571–4587. <https://doi.org/10.1021/ja01338a041>.
- (178) Pine, S. H.; Sanchez, B. L. Formic Acid-Formaldehyde Methylation of Amines. *J. Org. Chem.* **1971**, 36 (6), 829–832. <https://doi.org/10.1021/jo00805a022>.
- (179) Borch, R. F.; Bernstein, M. D.; Durst, H. D. Cyanohydridoborate Anion as a Selective Reducing Agent. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93 (12), 2897–2904. <https://doi.org/10.1021/ja00741a013>.
- (180) Borch, R. F.; Hassid, A. I. New Method for the Methylation of Amines. *J. Org. Chem.* **1972**, 37 (10), 1673–1674. <https://doi.org/10.1021/jo00975a049>.
- (181) Mattson, R. J.; Pham, K. M.; Leuck, D. J.; Cowen, K. A. An Improved Method for Reductive Alkylation of Amines Using Titanium(IV) Isopropoxide and Sodium Cyanoborohydride. *J. Org. Chem.* **1990**, 55 (8), 2552–2554. <https://doi.org/10.1021/jo00295a060>.
- (182) Sondengam, B. L.; Hémo, J. H.; Charles, G. Sur Une Nouvelle Methode de Methylation Des Amines Primaires et Secondaires. *Tetrahedron Lett.* **1973**, 14 (3), 261–263. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)95635-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)95635-7).
- (183) Ślusarska, E.; Zwierzak, A. Phase-Transfer-Catalysed N-Alkylation of Diphenylphosphinamide and Diphenylphosphinanilide with Secondary Alkyl Bromides. *Synthesis* **1980**, 1980 (9), 717–719. <https://doi.org/10.1055/s-1980-29184>.



- (184) Ślusarska, E.; Zwierzak, A. One-Pot Phase-Transfer-Catalysed N-Alkylation of Diphenylphosphinamide with Alcohols in the Presence of Methanesulfonyl Chloride. *Synthesis* **1981**, 1981 (2), 155–156. <https://doi.org/10.1055/s-1981-29374>.
- (185) Schmidhammer, H.; Brossi, A. Synthesis of (–)- and (+)-2-Hydroxy-6-Keto-N-Methylmorphinans, Their O-Methyl Ethers, and 2-Deoxy Congeners. *Can. J. Chem.* **1982**, 60 (24), 3055–3060. <https://doi.org/10.1139/v82-437>.
- (186) Wann, S. R.; Thorsen, P. T.; Kreevoy, M. M. Reduction of Carboxylic Acid Derivatives by Tetrahydroborate(1-) Ion in Acidic Dimethyl Sulfoxide. *J. Org. Chem.* **1981**, 46 (12), 2579–2581. <https://doi.org/10.1021/jo00325a029>.
- (187) Mandal, S. B.; Giri, V. S.; Pakrashi, S. C. Reduction of Lactams to Cyclic Tertiary Amines by Sodium Borohydride. *Synthesis* **1987**, 1987 (12), 1128–1130. <https://doi.org/10.1055/s-1987-28197>.
- (188) Bhandari, K.; Sharma, V. L.; Chatterjee, S. K. ChemInform Abstract: A Convenient Method for the Reduction of Amides to Their Corresponding Amines. *ChemInform* **1991**, 22 (18). <https://doi.org/10.1002/chin.199118077>.
- (189) Satoh, T.; Suzuki, S.; Suzuki, Y.; Miyaji, Y.; Imai, Z. Reduction of Organic Compounds with Sodium Borohydride-Transition Metal Salt Systems: Reduction of Organic Nitrile, Nitro and Amide Compounds to Primary Amines. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 10 (52), 4555–4558. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)88749-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)88749-9).
- (190) Mathe', F.; Castanet, Y.; Mortreux, A.; Petit, F. Synthesis of 2-Butanone from Ethylene and Methyl Formate Catalysed by Rhodium-Iodide Complexes. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32 (32), 3989–3992. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(91\)80607-8](https://doi.org/10.1016/0040-4039(91)80607-8).
- (191) Polidori, A. Synthèse de Tensioactifs Glycolipidiques à Usage Biologique et Biomédical. Chimie, Avignon, faculté des sciences d'Avignon, 1994.
- (192) Brown, H. C.; Heim, P. Selective Reductions. XVIII. Fast Reaction of Primary, Secondary, and Tertiary Amides with Diborane. Simple, Convenient Procedure for the Conversion of Amides to the Corresponding Amines. *J. Org. Chem.* **1973**, 38 (5), 912–916. <https://doi.org/10.1021/jo00945a015>.
- (193) Prasad, A. S. B.; Kanth, J. V. B.; Periasamy, M. Convenient Methods for the Reduction of Amides, Nitriles, Carboxylic Esters, Acids and Hydroboration of Alkenes Using NaBH<sub>4</sub>/I<sub>2</sub> system. *Tetrahedron* **1992**, 48 (22), 4623–4628. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)81236-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)81236-9).
- (194) Atta-ur-Rahman; Basha, A.; Waheed, N.; Ahmed, S. A New Method for the Reduction of Amides to Amines with Sodium Borohydride. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 17 (3), 219–222. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(76\)80022-6](https://doi.org/10.1016/0040-4039(76)80022-6).
- (195) Kuehne, M. E.; Shannon, P. J. Reduction of Amides and Lactams to Amines by Reactions with Phosphorus Oxychloride and Sodium Borohydride. *J. Org. Chem.* **1977**, 42 (12), 2082–2087. <https://doi.org/10.1021/jo00432a010>.
- (196) Giri, V. S.; Ali, E.; Pakrashi, S. C. Convenient Total Synthesis of (DL)-Quebrachamine. *J. Heterocycl. Chem.* **1980**, 17 (5), 1133–1134. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570170563>.

- (197) Pearson, D. A.; Blanchette, M.; Baker, M. L.; Guindon, C. A. Trialkylsilanes as Scavengers for the Trifluoroacetic Acid Deblocking of Protecting Groups in Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30* (21), 2739–2742. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)99113-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)99113-5).
- (198) Belleau, B.; Malek, G. New Convenient Reagent for Peptide Syntheses. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90* (6), 1651–1652. <https://doi.org/10.1021/ja01008a045>.
- (199) Zacharie, B.; Connolly, T. P.; Penney, C. L. A Simple One-Step Conversion of Carboxylic Acids to Esters Using EEDQ. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (21), 7072–7074. <https://doi.org/10.1021/jo00126a080>.
- (200) Lee, A. S.-Y.; Su, F.-Y.; Liao, Y.-C. A Simple and Efficient Hydrolyzing Method for Tetrahydropyranyl Ethers. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (7), 1323–1326. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)02602-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)02602-1).
- (201) Hepp, P. Ueber Monomethylanilin. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1877**, *10* (1), 327–329. <https://doi.org/10.1002/cber.18770100196>.
- (202) Pictet, A. Ueber Die Darstellung Der Secundären Aromatischen Amine. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, *20* (2), 3422–3424. <https://doi.org/10.1002/cber.18870200274>.
- (203) FONES, W. S. THE USE OF SODIUM HYDRIDE IN THE ALKYLATION OF N-SUBSTITUTED AMIDES. *J. Org. Chem.* **1949**, *14* (6), 1099–1102. <https://doi.org/10.1021/jo01158a020>.
- (204) Koziara, A.; Zawadzki, S.; Zwierzak, A. Phase-Transfer-Catalysed N-Alkylation of N-Substituted Carboxamides. *Synthesis* **1979**, *1979* (07), 527–529. <https://doi.org/10.1055/s-1979-28745>.
- (205) Baumgarten, H. E.; Fuerholzer, J. F.; Clark, R. David.; Thompson, R. D. Reactions of Amines. XII. The Structure of  $\alpha$ -Lactams. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (20), 3303–3305. <https://doi.org/10.1021/ja00903a061>.
- (206) Rothman, E. S.; Serota, S.; Swern, D. Enol Esters. II.1a N-Acylation of Amides and Imides. *J. Org. Chem.* **1964**, *29* (3), 646–650. <https://doi.org/10.1021/jo01026a031>.
- (207) Bojarski, J. T.; Mokrosz, J. L.; Bartoń, H. J.; Paluchowska, M. H. Recent Progress in Barbituric Acid Chemistry. In *Advances in Heterocyclic Chemistry*; Katritzky, A. R., Ed.; Academic Press, 1985; Vol. 38, pp 229–297. [https://doi.org/10.1016/S0065-2725\(08\)60921-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2725(08)60921-6).
- (208) LaLonde, R. T.; Davis, C. B. Triamides Prepared by the Diacylation of Amides. *J. Org. Chem.* **1970**, *35* (3), 771–774. <https://doi.org/10.1021/jo00828a050>.
- (209) Baburao, K.; Costello, A. M.; Petterson, R. C.; Sander, G. E. Acyclic Imides. A General Method of N-Acylation of Amides. *J. Chem. Soc. C Org.* **1968**, No. 0, 2779–2781. <https://doi.org/10.1039/J39680002779>.
- (210) Oikawa, Y.; Yoshioka, T.; Yonemitsu, O. Specific Removal of O-Methoxybenzyl Protection by DDQ Oxidation. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23* (8), 885–888. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)86974-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)86974-9).

- (211) Oikaw, Y.; Yoshioka, T.; Yonemitsu, O. Protection of Hydroxy Groups by Intramolecular Oxidative Formation of Methoxybenzylidene Acetals with DDQ. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23 (8), 889–892. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)86975-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)86975-0).
- (212) Oikawa, Y.; Tanaka, T.; Horita, K.; Yoshioka, T.; Yonemitsu, O. DMPM (3,4-Dimethoxybenzyl) Protecting Group for Hydroxy Function More Readily Removable than MPM (P-Methoxybenzyl) Protecting Group by DDQ Oxidation. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25 (47), 5393–5396. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)91293-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)91293-6).
- (213) Tanaka, T.; Oikawa, Y.; Hamada, T.; Yonemitsu, O. Total Synthesis of Tylonolide, the Aglycone of the 16-Membered Ring Macrolide Tylosin, from D-Glucose. Selective Application of MPM and DMPM Protecting Groups for Hydroxy Functions. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27 (31), 3651–3654. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)84872-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)84872-8).
- (214) Ikemoto, N.; Schreiber, S. L. Total Synthesis of (-)-Hikizimycin Employing the Strategy of Two-Directional Chain Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114 (7), 2524–2536. <https://doi.org/10.1021/ja00033a029>.
- (215) Piva, O.; Amougay, A.; Pete, J.-P. Direct Oxidation of Benzylic and Allylic Silyl Ethers to Carbonyl Compounds. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32 (32), 3993–3996. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(91\)80608-9](https://doi.org/10.1016/0040-4039(91)80608-9).
- (216) Hoye, T. R.; Caruso, A. J.; Dellaria, J. F.; Kurth, M. J. Two Syntheses of DI-Aplysistatin. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104 (24), 6704–6709. <https://doi.org/10.1021/ja00388a038>.
- (217) Oikawa, Y.; Tanaka, T.; Horita, K.; Yonemitsu, O. Selective Hydrogenolysis of the Benzyl Protecting Group for Hydroxy Function with Raney Nickel in the Presence of the MPM (4-Methoxybenzyl) and DMPM (3,4-Dimethoxybenzyl) Protecting Groups. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25 (47), 5397–5400. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)91294-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)91294-8).
- (218) Horita, K.; Yoshioka, T.; Tanaka, T.; Oikawa, Y.; Yonemitsu, O. On the Selectivity of Deprotection of Benzyl, Mpm (4-Methoxybenzyl) and Dmpm (3,4-Dimethoxybenzyl) Protecting Groups for Hydroxy Functions. *Tetrahedron* **1986**, 42 (11), 3021–3028. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)90593-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)90593-9).
- (219) Keusenkothen, P. F.; Smith, M. B. Anchimeric Assistance in the N-Alkylation of 5-Alkoxyethyl-2-Pyrrolidinone Derivatives. *Synth. Commun.* **1992**, 22 (20), 2935–2940. <https://doi.org/10.1080/00397919208021117>.
- (220) Johnson, H. E.; Crosby, D. G. N-Alkylation of Amides. A Novel Procedure. *J. Org. Chem.* **1962**, 27 (6), 2205–2205. <https://doi.org/10.1021/jo01053a501>.
- (221) Johnson, H. E.; Crosby, D. G. Reaction of Hydantoin with Acetals. *J. Org. Chem.* **1962**, 27 (6), 2077–2080. <https://doi.org/10.1021/jo01053a041>.
- (222) Auerbach, Joseph.; Zamore, McFord.; Weinreb, S. M. N-Methylation of Amides, Lactams, and Ureas. *J. Org. Chem.* **1976**, 41 (4), 725–726. <https://doi.org/10.1021/jo00866a038>.
- (223) Dubé, D.; Scholte, A. A. Reductive N-Alkylation of Amides, Carbamates and Ureas. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40 (12), 2295–2298. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(99\)00211-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)00211-7).

- (224) Dainton, F. S.; Eaton, R. S. The polymerization of acrylonitrile in aqueous solution. Part III. The ferric ion-photosensitized reaction at 15, 25, 30, and 50°C. *J. Polym. Sci.* **1959**, 39 (135), 313–320. <https://doi.org/10.1002/pol.1959.1203913524>.
- (225) Revzin, A.; Bagdasaryan, K. Determination of the Absolute Rate Constants of Radical Reactions .3. Polymerization of Akrylonitrile, 4-Vinylpyridine and 2-Methyl-5-Vinylpyridine. *Zhurnal Fiz. Khimii* **1964**, 38 (4), 1020–1023.
- (226) Gould, R. J.; Ginsberg, B. H.; Spector, A. A. Effects of Octyl Beta-Glucoside on Insulin Binding to Solubilized Membrane Receptors. *Biochemistry* **1981**, 20 (24), 6776–6781. <https://doi.org/10.1021/bi00527a006>.
- (227) Tsuchiya, T.; Saito, S. Use of N-Octyl-β-D-Thioglucoside, a New Nonionic Detergent, for Solubilization and Reconstitution of Membrane Proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* **1984**, 96 (5), 1593–1597. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134989>.
- (228) Plusquellec, D.; Chevalier, G.; Talibart, R.; Wroblewski, H. Synthesis and Characterization of 6-O-(N-Heptylcarbonyl)-Methyl-α-d-Glucopyranoside, a New Surfactant for Membrane Studies. *Anal. Biochem.* **1989**, 179 (1), 145–153. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90215-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90215-7).
- (229) Chang, H. W.; Bock, E. Pitfalls in the Use of Commercial Nonionic Detergents for the Solubilization of Integral Membrane Proteins: Sulfhydryl Oxidizing Contaminants and Their Elimination. *Anal. Biochem.* **1980**, 104 (1), 112–117. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90283-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90283-3).
- (230) *Nonionic Surfactants*; Schick, M. J., Ed.; Surfactant science series; Dekker: New York [, 1966.
- (231) Mimms, L. T.; Zampighi, G.; Nozaki, Y.; Tanford, C.; Reynolds, J. A. Phospholipid Vesicle Formation and Transmembrane Protein Incorporation Using Octyl Glucoside. *Biochemistry* **1981**, 20 (4), 833–840. <https://doi.org/10.1021/bi00507a028>.
- (232) Helenius, A.; Sarvas, M.; Simons, K. Asymmetric and Symmetric Membrane Reconstitution by Detergent Elimination. Studies with Semliki-Forest-Virus Spike Glycoprotein and Penicillinase from the Membrane of *Bacillus Licheniformis*. *Eur. J. Biochem.* **1981**, 116 (1), 27–35. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb05296.x>.
- (233) Robinson, N. C.; Wiginton, D.; Talbert, L. Phenyl-Sepharose-Mediated Detergent-Exchange Chromatography: Its Application to Exchange of Detergents Bound to Membrane Proteins. *Biochemistry* **1984**, 23 (25), 6121–6126. <https://doi.org/10.1021/bi00320a034>.
- (234) Jones, O. T.; Eubanks, J. H.; Earnest, J. P.; McNamee, M. G. A Minimum Number of Lipids Are Required to Support the Functional Properties of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Biochemistry* **1988**, 27 (10), 3733–3742. <https://doi.org/10.1021/bi00410a032>.
- (235) Popot, J. L.; Gerchman, S. E.; Engelmann, D. M. Refolding of Bacteriorhodopsin in Lipid Bilayers. A Thermodynamically Controlled Two-Stage Process. *J. Mol. Biol.* **1987**, 198 (4), 655–676. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90208-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90208-7).

- (236) Fu, R.; Cross, T. A. Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Investigation of Protein and Polypeptide Structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, *28*, 235–268. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.28.1.235>.
- (237) Carey, M. C.; Small, D. M. Micelle Formation by Bile Salts. Physical-Chemical and Thermodynamic Considerations. *Arch. Intern. Med.* **1972**, *130* (4), 506–527.
- (238) Sanders, C. R.; Landis, G. C. Reconstitution of Membrane Proteins into Lipid-Rich Bilayered Mixed Micelles for NMR Studies. *Biochemistry* **1995**, *34* (12), 4030–4040. <https://doi.org/10.1021/bi00012a022>.
- (239) Howard, K. P.; Opella, S. J. High-Resolution Solid-State NMR Spectra of Integral Membrane Proteins Reconstituted into Magnetically Oriented Phospholipid Bilayers. *J. Magn. Reson. B* **1996**, *112* (1), 91–94. <https://doi.org/10.1006/jmrb.1996.0116>.
- (240) Sanders, C. R.; Prosser, R. S. Bicelles: A Model Membrane System for All Seasons? *Struct. Lond. Engl. 1993* **1998**, *6* (10), 1227–1234. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(98\)00123-3](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(98)00123-3).
- (241) Garber, S. M.; Lorigan, G. A.; Howard, K. P. Magnetically Oriented Phospholipid Bilayers for Spin Label EPR Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (13), 3240–3241. <https://doi.org/10.1021/ja984371f>.
- (242) Kimura, null; Kano, null; Fujiwara, null. Two-Dimensional NMR Study of a Liquid-Crystal Solution under Magic-Angle Spinning. Conformation of Carboxylic Ionophore Lasalocid A Dissolved in a Lyotropic Liquid Crystal. *J. Magn. Reson. B* **1996**, *112* (1), 44–50. <https://doi.org/10.1006/jmrb.1996.0107>.
- (243) Boden, N.; Jackson, P. H.; McMullen, K.; Holmes, M. C. Are “Nematic” Amphiphilic Liquid Crystalline Mesophases Thermodynamically Stable? *Chem. Phys. Lett.* **1979**, *65* (3), 476–479. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(79\)80275-4](https://doi.org/10.1016/0009-2614(79)80275-4).
- (244) E, C.; P, B.; N, M.; Ji, P.; B, P. Stabilization of Integral Membrane Proteins in Aqueous Solution Using Fluorinated Surfactants. *Biochimie* **1998**, *80* (5–6), 515–530. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(00\)80017-6](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(00)80017-6).
- (245) Barthélémy, P.; Ameduri, B.; Chabaud, E.; Popot, J. L.; Pucci, B. Synthesis and Preliminary Assessments of Ethyl-Terminated Perfluoroalkyl Nonionic Surfactants Derived from Tris(Hydroxymethyl)Acrylamidomethane. *Org. Lett.* **1999**, *1* (11), 1689–1692. <https://doi.org/10.1021/ol990558f>.
- (246) Kisselev, O. G.; Kao, J.; Ponder, J. W.; Fann, Y. C.; Gautam, N.; Marshall, G. R. Light-Activated Rhodopsin Induces Structural Binding Motif in G Protein Alpha Subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95* (8), 4270–4275. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4270>.
- (247) Girvin, M. E.; Rastogi, V. K.; Abildgaard, F.; Markley, J. L.; Fillingame, R. H. Solution Structure of the Transmembrane H<sup>+</sup>-Transporting Subunit c of the F1F0 ATP Synthase. *Biochemistry* **1998**, *37* (25), 8817–8824. <https://doi.org/10.1021/bi980511m>.
- (248) Schafmeister, C. E.; Miercke, L. J.; Stroud, R. M. Structure at 2.5 Å of a Designed Peptide That Maintains Solubility of Membrane Proteins. *Science* **1993**, *262* (5134), 734–738. <https://doi.org/10.1126/science.8235592>.

- (249) Caliceti, P.; Schiavon, O.; Veronese, F. M. Biopharmaceutical Properties of Uricase Conjugated to Neutral and Amphiphilic Polymers. *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10* (4), 638–646. <https://doi.org/10.1021/bc980155k>.
- (250) *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*; Harris, J. M., Ed.; Topics in applied chemistry; Plenum Press: New York, 1992.
- (251) Katre, N. V. The Conjugation of Proteins with Polyethylene Glycol and Other Polymers: Altering Properties of Proteins to Enhance Their Therapeutic Potential. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1993**, *10* (1), 91–114. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(93\)90005-O](https://doi.org/10.1016/0169-409X(93)90005-O).
- (252) Veronese, F. M.; Morpurgo, M. Bioconjugation in Pharmaceutical Chemistry. *Farm. Soc. Chim. Ital.* **1989** **1999**, *54* (8), 497–516. [https://doi.org/10.1016/s0014-827x\(99\)00066-x](https://doi.org/10.1016/s0014-827x(99)00066-x).
- (253) Lasic, D. D.; Needham, David. The “Stealth” Liposome: A Prototypical Biomaterial. *Chem. Rev.* **1995**, *95* (8), 2601–2628. <https://doi.org/10.1021/cr00040a001>.
- (254) Torchilin, V. P.; Shtilman, M. I.; Trubetskoy, V. S.; Whiteman, K.; Milstein, A. M. Amphiphilic Vinyl Polymers Effectively Prolong Liposome Circulation Time in Vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1195* (1), 181–184. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90025-6).
- (255) Freij-Larsson, C.; Nylander, T.; Jannasch, P.; Wesslén, B. Adsorption Behaviour of Amphiphilic Polymers at Hydrophobic Surfaces: Effects on Protein Adsorption. *Biomaterials* **1996**, *17* (22), 2199–2207. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)00050-6](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)00050-6).
- (256) Lu, D. R.; Lee, S. J.; Park, K. Calculation of Solvation Interaction Energies for Protein Adsorption on Polymer Surfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1991**, *3* (2), 127–147. <https://doi.org/10.1163/156856291x00232>.
- (257) Silver, F.; Doillon, C. *Biocompatibility: Interactions of Biological and Implantable Materials*; Vch Pub: New York, N.Y, 1989.
- (258) Woerly, S.; Plant, G. W.; Harvey, A. R. Neural Tissue Engineering: From Polymer to Biohybrid Organs. *Biomaterials* **1996**, *17* (3), 301–310. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85568-2](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85568-2).
- (259) Blezer, R.; Lindhout, T.; Keszler, B.; Kennedy, J. P. Amphiphilic Networks. *Polym. Bull.* **1995**, *34* (1), 101–107. <https://doi.org/10.1007/BF00294894>.
- (260) Haigh, R.; Rimmer, S.; Fullwood, N. J. Synthesis and Properties of Amphiphilic Networks. 1: The Effect of Hydration and Polymer Composition on the Adhesion of Immunoglobulin-G to Poly(Laurylmethacrylate-Stat-Glycerolmonomethacrylate-Stat-Ethylene-Gly Col-Dimethacrylate) Networks. *Biomaterials* **2000**, *21* (7), 735–739. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(99\)00245-8](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(99)00245-8).
- (261) Tribet, C.; Porcar, I.; Bonnefont, P. A.; Audebert, R. Association between Hydrophobically Modified Polyanions and Negatively Charged Bovine Serum Albumin. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (7), 1327–1333. <https://doi.org/10.1021/jp973022p>.
- (262) De Gennes, P. G.; Taupin, C. Microemulsions and the Flexibility of Oil/Water Interfaces. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86* (13), 2294–2304. <https://doi.org/10.1021/j100210a011>.

- (263) Popot, J. L.; Engelman, D. M. Membrane Protein Folding and Oligomerization: The Two-Stage Model. *Biochemistry* **1990**, *29* (17), 4031–4037. <https://doi.org/10.1021/bi00469a001>.
- (264) Georges, M. K.; Veregin, R. P. N.; Kazmaier, P. M.; Hamer, G. K. Narrow Molecular Weight Resins by a Free-Radical Polymerization Process. *Macromolecules* **1993**, *26* (11), 2987–2988. <https://doi.org/10.1021/ma00063a054>.
- (265) Bertin, D.; Boutevin, B. Controlled Radical Polymerization. *Polym. Bull.* **1996**, *37* (3), 337–344. <https://doi.org/10.1007/BF00318066>.
- (266) Wang, J.-S.; Matyjaszewski, K. Controlled/"living" Radical Polymerization. Atom Transfer Radical Polymerization in the Presence of Transition-Metal Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (20), 5614–5615. <https://doi.org/10.1021/ja00125a035>.
- (267) Moineau, G.; Dubois, Ph.; Jérôme, R.; Senninger, T.; Teyssié, Ph. Alternative Atom Transfer Radical Polymerization for MMA Using FeCl<sub>3</sub> and AIBN in the Presence of Triphenylphosphine: An Easy Way to Well-Controlled PMMA. *Macromolecules* **1998**, *31* (2), 545–547. <https://doi.org/10.1021/ma971132o>.
- (268) Chiefari, J.; Chong, Y. K. (Bill); Ercole, F.; Krstina, J.; Jeffery, J.; Le, T. P. T.; Mayadunne, R. T. A.; Meijs, G. F.; Moad, C. L.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process. *Macromolecules* **1998**, *31* (16), 5559–5562. <https://doi.org/10.1021/ma9804951>.
- (269) Rademacher, J. T.; Baum, M.; Pallack, M. E.; Brittain, W. J.; Simonsick, W. J. Atom Transfer Radical Polymerization of N,N-Dimethylacrylamide. *Macromolecules* **2000**, *33* (2), 284–288. <https://doi.org/10.1021/ma991550o>.
- (270) Magny, B.; Lafuma, F.; Iliopoulos, I. Determination of Microstructure of Hydrophobically Modified Water-Soluble Polymers by <sup>13</sup>C n.m.r. *Polymer* **1992**, *33* (15), 3151–3154. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(92\)90227-N](https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)90227-N).
- (271) Bataille, P.; Bourassa, H. Determination of the Reactivity Parameters for the Copolymerization of Butyl Acrylate with Vinyl Acetate. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **1989**, *27* (1), 357–365. <https://doi.org/10.1002/pola.1989.080270130>.
- (272) Frisch, K. C.; Rumao, L. P. Catalysis in Isocyanate Reactions. *J. Macromol. Sci. Part C* **1970**, *5*, 103–149. <https://doi.org/10.1080/15583727008085365>.
- (273) Baker, J. W.; Gaunt, J. 4. The Mechanism of the Reaction of Aryl Isocyanates with Alcohols and Amines. Part III. The “Spontaneous” Reaction of Phenyl Isocyanate with Various Alcohols. Further Evidence Relating to the Anomalous Effect of Dialkylanilines in the Base-Catalysed Reaction. *J. Chem. Soc. Resumed* **1949**, No. 0, 19–24. <https://doi.org/10.1039/JR9490000019>.
- (274) SATO, M. The Rate of the Reaction of Isocyanates with Alcohols. II. *J. Org. Chem.* **1962**, *27* (3), 819–825. <https://doi.org/10.1021/jo01050a031>.

- (275) Prata, H.; Alexandra, C. Synthèse de Nouvelles Molécules Amphiphiles Glycosidiques : Les Carbamates de Glycoside Comme Agents de Glycosylation. thesis, Avignon, 1998.
- (276) Robertson, W. G. P.; Stutchbury, J. E. 758. Kinetics of Some Alcohol–Isocyanate Reactions. *J. Chem. Soc. Resumed* **1964**, No. 0, 4000–4003. <https://doi.org/10.1039/JR9640004000>.
- (277) Helferich, B.; Zirner, J. Zur Synthese von Tetraacetyl-Hexosen Mit Freiem 2-Hydroxyl. Synthese Einiger Disaccharide. *Chem. Ber.* **1962**, 95 (11), 2604–2611. <https://doi.org/10.1002/cber.19620951103>.
- (278) Laschewsky, A.; Zerbe, I. Polymerizable and Polymeric Zwitterionic Surfactants: 1. Synthesis and Bulk Properties. *Polymer* **1991**, 32 (11), 2070–2080. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(91\)90175-I](https://doi.org/10.1016/0032-3861(91)90175-I).
- (279) Boutevin, B.; Rigal, G.; Asri, M. E.; Lakhlifi, T. Mise Au Point Sur l’analyse Par Chromatographie Par Exclusion Stérique En Milieu Aqueux de Télomères de l’acide Acrylique. *Macromol. Chem. Phys.* **1995**, 196 (3), 891–902. <https://doi.org/10.1002/macp.1995.021960317>.
- (280) Ohtani, H.; Tsukamoto, Y.; Sakoda, Y.; Hamaguchi, H. Fluorescence Spectra of Bacteriorhodopsin and the Intermediates O and Q at Room Temperature. *FEBS Lett.* **1995**, 359 (1), 65–68. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01440-C](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01440-C).
- (281) Samatey, F. A.; Zaccai, G.; Engelman, D. M.; Etchebest, C.; Popot, J.-L. Rotational Orientation of Transmembrane  $\alpha$ -Helices in Bacteriorhodopsin: A Neutron Diffraction Study. *J. Mol. Biol.* **1994**, 236 (4), 1093–1104. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(94\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(94)90014-0).
- (282) Pebay-Peyroula, E.; Rummel, G.; Rosenbusch, J. P.; Landau, E. M. X-Ray Structure of Bacteriorhodopsin at 2.5 Angstroms from Microcrystals Grown in Lipidic Cubic Phases. *Science* **1997**, 277 (5332), 1676–1681. <https://doi.org/10.1126/science.277.5332.1676>.
- (283) Pierre, Y.; Breyton, C.; Kramer, D.; Popot, J. L. Purification and Characterization of the Cytochrome B6 f Complex from Chlamydomonas Reinhardtii. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270 (49), 29342–29349. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29342>.
- (284) Nakamae, K.; Miyata, T.; Ootsuki, N.; Okumura, M.; Kinomura, K. Surface Characterizations of Copolymer Films with Pendant Monosaccharides. *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, 195 (6), 1953–1963. <https://doi.org/10.1002/macp.1994.021950606>.
- (285) Nakamae, K.; Miyata, T.; Ootsuki, N.; Okumura, M.; Kinomura, K. Surface Studies on Copolymers Having Pendant Monosaccharides. *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, 195 (7), 2663–2675. <https://doi.org/10.1002/macp.1994.021950733>.
- (286) Miyata, T.; Ootsuki, N.; Nakamae, K.; Okumura, M.; Kinomura, K. Protein Adsorption on a Copolymer Having Pendant Monosaccharide Groups. Relationship between Surface Free Energy and Protein Adsorption. *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, 195 (11), 3597–3607. <https://doi.org/10.1002/macp.1994.021951107>.
- (287) Sugiyama, K.; Ohga, K.; Aoki, H. Emulsion Copolymerization of 2-(Acryloyloxy)Ethylphosphoryl-Choline with Vinyl Monomers and Protein Adsorption at



- Resultant Copolymer Microspheres. *Macromol. Chem. Phys.* **1995**, *196* (6), 1907–1916. <https://doi.org/10.1002/macp.1995.021960610>.
- (288) Koňák, Č.; Tuzar, Z.; Kopečková, P.; Andrade, J. D.; Kopeček, J. Association of Graft Copolymers of Alkyl Methacrylates with  $\alpha$ -Methyl- $\omega$ -Hydroxy-Poly(Oxyethylene) Ethacrylates. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1995**, *60* (11), 1971–1985. <https://doi.org/10.1135/cccc19951971>.
- (289) Konak, C.; Kopeckova, P.; Kopecek, J. Photoregulated Association of N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide Copolymers with Azobenzene-Containing Side Chains. *Macromolecules* **1992**, *25* (20), 5451–5456. <https://doi.org/10.1021/ma00046a051>.
- (290) Chiu, H.-C.; Chern, C.-S.; Lee, C.-K.; Chang, H.-F. Synthesis and Characterization of Amphiphilic Poly(Ethylene Glycol) Graft Copolymers and Their Potential Application as Drug Carriers. *Polymer* **1998**, *39* (8), 1609–1616. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(97\)00436-9](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(97)00436-9).
- (291) Koňák, Č.; Tuzar, Z.; Kopečková, P.; Andrade, J. D.; Kopeček, J. Association of Graft Copolymers of Alkyl Methacrylates with  $\alpha$ -Methyl- $\omega$ -Hydroxy-Poly(Oxyethylene) Ethacrylates. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1995**, *60* (11), 1971–1985. <https://doi.org/10.1135/cccc19951971>.
- (292) Fidler, J.; Rodger, P. M. Solvation Structure around Aqueous Alcohols. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (36), 7695–7703. <https://doi.org/10.1021/jp9907903>.
- (293) Graziano, G. Hydration Thermodynamics of Aliphatic Alcohols. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1* (15), 3567–3576. <https://doi.org/10.1039/A903082D>.
- (294) Jorgensen, W. L.; Gao, J. Monte Carlo Simulations of the Hydration of Ammonium and Carboxylate Ions. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90* (10), 2174–2182. <https://doi.org/10.1021/j100401a037>.
- (295) Nandi, N.; Bhattacharyya, K.; Bagchi, B. Dielectric Relaxation and Solvation Dynamics of Water in Complex Chemical and Biological Systems. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (6), 2013–2046. <https://doi.org/10.1021/cr980127v>.
- (296) Ehrlich, P. *Collected Studies in Immunology*; J. Wiley: New York, 1906; Vol. 2.
- (297) Ehrlich, P. *Immunology and Cancer Research*; Collected Papers of Paul Ehrlich; Himmelweit, F.; Pergamon Press: London, 1956; Vol. 2.
- (298) Matte, G.; Loc, T. B.; Bernard, J. *Compt. Rend. Acad. Sci.* **248**, 1626–1629.
- (299) Ringsdorf, H. Structure and Properties of Pharmacologically Active Polymers. *J. Polym. Sci. Part C-Polym. Symp.* **1975**, No. 51, 135–153.
- (300) Breslow, D.; Edwards, E.; Newburg, N. Divinyl Ether-Maleic Anhydride (Pyran) Copolymer Used to Demonstrate Effect of Molecular-Weight on Biological-Activity. *Nature* **1973**, *246* (5429), 160–162. <https://doi.org/10.1038/246160a0>.
- (301) Przybylski, M.; Fell, E.; Ringsdorf, H.; Zaharko, D. S. Pharmacologically Active Polymers, 17. Syntheses and Characterization of Polymeric Derivatives of the Antitumor

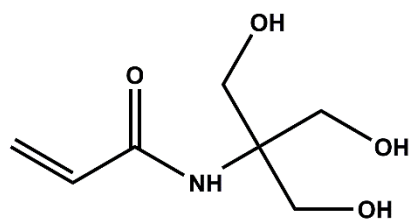
- Agent Methotrexate. *Makromol. Chem.* **1978**, *179* (7), 1719–1733. <https://doi.org/10.1002/macp.1978.021790707>.
- (302) Kope, J. Development of Tailor-Made Polymeric Prodrugs for Systemic and Oral Delivery. *J. Bioact. Compat. Polym.* **1988**, *3* (1), 16–26. <https://doi.org/10.1177/088391158800300103>.
- (303) Kopecek, J.; Kopeckova, P.; Konak, C. Biorecognizable Polymers: Design, Structure, and Bioactivity. *J. Macromol. Sci.-Pure Appl. Chem.* **1997**, *A34* (10), 2103–2117. <https://doi.org/10.1080/10601329708010328>.
- (304) Ulbrich, K.; Strohalm, J.; Subr, V.; Plocova, D.; Duncan, R.; Rihova, B. Polymeric Conjugates of Drugs and Antibodies for Site-Specific Drug Delivery. *Macromol. Symp.* **1996**, *103*, 177–192.
- (305) Caiolfa, V. R.; Zamai, M.; Fiorino, A.; Frigerio, E.; Pellizzoni, C.; d'Argy, R.; Ghiglieri, A.; Castelli, M. G.; Farao, M.; Pesenti, E.; Gigli, M.; Angelucci, F.; Suarato, A. Polymer-Bound Camptothecin: Initial Biodistribution and Antitumour Activity Studies. *J. Controlled Release* **2000**, *65* (1–2), 105–119. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00243-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00243-6).
- (306) Ambler, L.; Brookman, L.; Brown, J.; Goddard, P.; Petrak, K. Soluble Polymeric Carriers for Drug Delivery .5. Solution Properties and Biodistribution Behavior of N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide-Co-N-(2-[4-Hydroxyphenyl]Ethyl) Acrylamide Copolymer Substituted with Cholesterol. *J. Bioact. Compat. Polym.* **1992**, *7* (3), 223–241. <https://doi.org/10.1177/088391159200700301>.
- (307) Arranz, F.; Bejarano, E. M.; Sanchez-Chaves, M. Poly(Vinyl Alcohol) Functionalized by Chloroacetate Groups. Coupling of Bioactive Carboxylic Acids. *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, *195* (12), 3789–3798. <https://doi.org/10.1002/macp.1994.021951205>.
- (308) Yolles, S.; Morton, J. F.; Sartori, M. F. Preparation of Steroid Esters of Hydroxypropyl Cellulose. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1979**, *17* (12), 4111–4113. <https://doi.org/10.1002/pol.1979.170171231>.
- (309) Pitt, C. G.; Wertheim, J.; Wang, C. T.; Shah, S. S. Polymer-Drug Conjugates: Manipulation of Drug Delivery Kinetics. *Macromol. Symp.* **1997**, *123* (1), 225–234. <https://doi.org/10.1002/masy.19971230122>.
- (310) Fördedal, H.; Sjöblom, J.; Saeten, J. O.; Gestblom, B. O. Interactions between Drugs and Nonionic Lamellar Liquid Crystals as Studied by Dielectric Spectroscopy and Phase Equilibria. *J. Colloid Interface Sci.* **1992**, *150* (2), 295–304. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(92\)90198-U](https://doi.org/10.1016/0021-9797(92)90198-U).
- (311) Ringsdorf, H.; Schlarb, B.; Venzmer, J. Molecular Architecture and Function of Polymeric Oriented Systems: Models for the Study of Organization, Surface Recognition, and Dynamics of Biomembranes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27* (1), 113–158. <https://doi.org/10.1002/anie.198801131>.
- (312) Simon, J.; Kühner, M.; Ringsdorf, H.; Sackmanna, E. Polymer-Induced Shape Changes and Capping in Giant Liposomes. *Chem. Phys. Lipids* **1995**, *76* (2), 241–258. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(95\)02447-Q](https://doi.org/10.1016/0009-3084(95)02447-Q).

- (313) Zignani, M.; Drummond, D. C.; Meyer, O.; Hong, K.; Leroux, J. C. In Vitro Characterization of a Novel Polymeric-Based PH-Sensitive Liposome System. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1463* (2), 383–394. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00234-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00234-5).
- (314) Kaneda, Y. Virosomes: Evolution of the Liposome as a Targeted Drug Delivery System. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *43* (2), 197–205. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00069-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00069-7).
- (315) Cryz, S. J.; Que, J. U.; Glück, R. A Virosome Vaccine Antigen Delivery System Does Not Stimulate an Antiphospholipid Antibody Response in Humans. *Vaccine* **1996**, *14* (14), 1381–1383. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00040-0).
- (316) Grimaldi, S.; Giuliani, A.; Giuliani, A.; Ferroni, L.; Lisi, A.; Santoro, N.; Pozzi, D. Engineered Liposomes and Virosomes for Delivery of Macromolecules. *Res. Virol.* **1995**, *146* (4), 289–293. [https://doi.org/10.1016/0923-2516\(96\)80574-7](https://doi.org/10.1016/0923-2516(96)80574-7).
- (317) Bader, H.; Ringsdorf, H.; Skura, J. Liposomes from Polymerizable Glycolipids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, *20* (1), 91–92. <https://doi.org/10.1002/anie.198100911>.
- (318) Paleos, C. M.; Malliaris, A. Polymerization of Micelle-Forming Surfactants. *J. Macromol. Sci. Part C* **1988**, *28* (3–4), 403–419. <https://doi.org/10.1080/15583728808085381>.
- (319) Dorn, K.; Hoerpel, G.; Ringsdorf, H. Polymeric Antitumor Agents on a Molecular and Cellular Level. In *Bioactive Polymeric Systems: An Overview*; Gebelein, C. G., Carraher, C. E., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1985; pp 531–585. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0405-1\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0405-1_19).
- (320) Kwon, G. S.; Kataoka, K. Block Copolymer Micelles as Long-Circulating Drug Vehicles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *16* (2), 295–309. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(95\)00031-2](https://doi.org/10.1016/0169-409X(95)00031-2).
- (321) Kwon, G. S.; Okano, T. Polymeric Micelles as New Drug Carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, *21* (2), 107–116. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00401-2](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00401-2).
- (322) Cammas, S.; Kataoka, K. Functional Poly[(Ethylene Oxide)-Co-( $\beta$ -Benzyl-L-Aspartate)] Polymeric Micelles: Block Copolymer Synthesis and Micelles Formation. *Macromol. Chem. Phys.* **1995**, *196* (6), 1899–1905. <https://doi.org/10.1002/macp.1995.021960609>.
- (323) Kim, S. Y.; Shin, I. G.; Lee, Y. M. Amphiphilic Diblock Copolymeric Nanospheres Composed of Methoxy Poly(Ethylene Glycol) and Glycolide: Properties, Cytotoxicity and Drug Release Behaviour. *Biomaterials* **1999**, *20* (11), 1033–1042. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00249-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00249-X).
- (324) Bronich, T. K.; Nehls, A.; Eisenberg, A.; Kabanov, V. A.; Kabanov, A. V. Novel Drug Delivery Systems Based on the Complexes of Block Ionomers and Surfactants of Opposite Charge. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **1999**, *16* (1), 243–251. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(99\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(99)00075-2).
- (325) Kim, I.-S.; Jeong, Y.-I.; Cho, C.-S.; Kim, S.-H. Thermo-Responsive Self-Assembled Polymeric Micelles for Drug Delivery in Vitro. *Int. J. Pharm.* **2000**, *205* (1), 165–172. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00501-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00501-9).

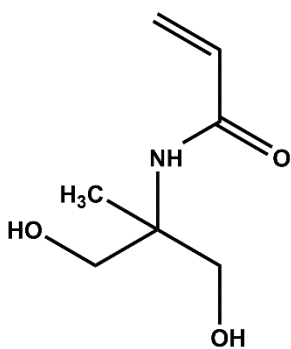
- (326) Liu, M.; Kono, K.; Fréchet, J. M. J. Water-Soluble Dendritic Unimolecular Micelles:: Their Potential as Drug Delivery Agents. *J. Controlled Release* **2000**, *65* (1), 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00245-X](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00245-X).
- (327) Liu, H.; Farrell, S.; Uhrich, K. Drug Release Characteristics of Unimolecular Polymeric Micelles. *J. Controlled Release* **2000**, *68* (2), 167–174. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00247-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00247-9).
- (328) Liu, H.; Jiang, A.; Guo, J.; Uhrich, K. E. Unimolecular Micelles: Synthesis and Characterization of Amphiphilic Polymer Systems. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **1999**, *37* (6), 703–711. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0518\(19990315\)37:6<703::AID-POLA5>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0518(19990315)37:6<703::AID-POLA5>3.0.CO;2-O).
- (329) Kuijpers, A. J.; Wachem, P. B. van; Luyn, M. J. A. van; Brouwer, L. A.; Engbers, G. H. M.; Krijgsveld, J.; Zaat, S. a. J.; Dankert, J.; Feijen, J. In vitro and in vivo evaluation of gelatin-chondroitin sulphate hydrogels for controlled release of antibacterial proteins. *Biomaterials* **2000**, *21* (17), 1763–1772. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00064-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00064-8).
- (330) García, O.; Blanco, M. D.; Martín, J. A.; Teijón, J. M. 5-Fluorouracil Trapping in Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate-Co-Acrylamide) Hydrogels: In Vitro Drug Delivery Studies. *Eur. Polym. J.* **2000**, *36* (1), 111–122. [https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(99\)00037-3](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(99)00037-3).
- (331) Peppas, N. A. Hydrogels and Drug Delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1997**, *2* (5), 531–537. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(97\)80103-3](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(97)80103-3).
- (332) Lee, W.-F.; Hung, G.-C. Thermoreversible Hydrogels. I. Synthesis and Effect of a Hydrophobic Monomer on Swelling Behaviors of Thermoreversible Gels Prepared by Copolymerizing N-Alkoxyalkylacrylamide with Butyl Acrylate. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *64* (8), 1477–1484. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970523\)64:8<1477::AID-APP4>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970523)64:8<1477::AID-APP4>3.0.CO;2-E).
- (333) Vakkalanka, S. K.; Peppas, N. A. Swelling Behavior of Temperature- and PH-Sensitive Block Terpolymers for Drug Delivery. *Polym. Bull.* **1996**, *36* (2), 221–225. <https://doi.org/10.1007/BF00294910>.
- (334) Ghandehari, H.; Kopečková, P.; Kopeček, J. In Vitro Degradation of PH-Sensitive Hydrogels Containing Aromatic Azo Bonds. *Biomaterials* **1997**, *18* (12), 861–872. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00007-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00007-0).
- (335) Yeh, P.-Y.; Kopečková, P.; Kopeček, J. Degradability of Hydrogels Containing Azoaromatic Crosslinks. *Macromol. Chem. Phys.* **1995**, *196* (7), 2183–2202. <https://doi.org/10.1002/macp.1995.021960709>.
- (336) Edelman, E. R.; Nathan, A.; Katada, M.; Gates, J.; Karnovsky, M. J. Perivascular Graft Heparin Delivery Using Biodegradable Polymer Wraps. *Biomaterials* **2000**, *21* (22), 2279–2286. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00154-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00154-X).
- (337) Stähler, K.; Selb, J.; Barthelemy, P.; Pucci, B.; Candau, F. Novel Hydrocarbon and Fluorocarbon Polymerizable Surfactants: Synthesis, Characterization and Mixing Behavior. *Langmuir* **1998**, *14* (17), 4765–4775. <https://doi.org/10.1021/la980245d>.

- (338) Stähler, K.; Selb, J.; Candau, F. A Study of Multicompartment Polymeric Micelles. *Mater. Sci. Eng. C* **1999**, *10* (1), 171–178. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(99\)00123-X](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(99)00123-X).
- (339) Weberskirch, R.; Preuschen, J.; Spiess, H. W.; Nuyken, O. Design and Synthesis of a Two Compartment Micellar System Based on the Self-Association Behavior of Poly(N-Acylethyleneimine) End-Capped with a Fluorocarbon and a Hydrocarbon Chain. *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, *201* (10), 995–1007. [https://doi.org/10.1002/1521-3935\(20000601\)201:10<995::AID-MACP995>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1521-3935(20000601)201:10<995::AID-MACP995>3.0.CO;2-T).
- (340) Dan, Y.; Chen, S.; Zhang, Y.; Xiang, F. Viscosity Enhancement of Complexed Solutions Formed through the Complexation of Nonionic Water-Soluble Polymers with Chemically Complementary Structures in Aqueous Media. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2000**, *38* (8), 1069–1077. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0488\(20000415\)38:8<1069::AID-POLB7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0488(20000415)38:8<1069::AID-POLB7>3.0.CO;2-7).
- (341) Wang, Q.; Gao, J.; Dan, Y.; Chen, Z. Preparation of Novel Polymer Materials through Intermacromolecular Complexation. *Mater. Sci. Eng. C* **1999**, *10* (1), 135–140. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(99\)00106-X](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(99)00106-X).
- (342) Briscoe, B.; Luckham, P.; Zhu, S. The Effects of Hydrogen Bonding upon the Viscosity of Aqueous Poly(Vinyl Alcohol) Solutions. *Polymer* **2000**, *41* (10), 3851–3860. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00550-9](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00550-9).
- (343) Selb, J.; Biggs, S.; Renoux, D.; Candau, F. Hydrophobic and Electrostatic Interactions in Water-Soluble Associating Copolymers. In *Hydrophilic Polymers; Advances in Chemistry; American Chemical Society, 1996; Vol. 248, pp 251–278*. <https://doi.org/10.1021/ba-1996-0248.ch015>.
- (344) Robb, I. D.; Smeulders, J. B. A. F. The Rheological Properties of Weak Gels of Poly(Vinyl Alcohol) and Sodium Borate. *Polymer* **1997**, *38* (9), 2165–2169. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(96\)00755-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(96)00755-0).
- (345) Liu, L.; Xia, D.; Zhang, Q.; Huang, M.-Y.; Jiang, Y.-Y. Hydrogenation of Aldehydes and Ketones Catalyzed by Zeolite-Supported Polyvinyl Alcohol–Amino Acid–Platinum Complex. *Polym. Adv. Technol.* **1999**, *10* (1–2), 103–107. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1581\(199901/02\)10:1/2<103::AID-PAT777>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1581(199901/02)10:1/2<103::AID-PAT777>3.0.CO;2-T).
- (346) Hirai, M.; Hirai, T.; Ueki, T. Conformational Change on Polymer Chains of Partially Formalized Poly(Vinyl Alcohol)-Iodine Color Complex Studied by Using Synchrotron Radiation Small-Angle X-Ray Solution Scattering. *Makromol. Chem.* **1993**, *194* (10), 2885–2895. <https://doi.org/10.1002/macp.1993.021941021>.
- (347) Ezzell, S. A.; McCormick, C. L. Water-Soluble Copolymers. 39. Synthesis and Solution Properties of Associative Acrylamido Copolymers with Pyrenesulfonamide Fluorescence Labels. *Macromolecules* **1992**, *25* (7), 1881–1886. <https://doi.org/10.1021/ma00033a007>.

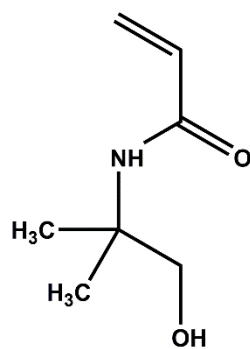
**RÉCAPITULATIF DES**  
**FORMULES DES PRINCIPAUX**  
**COMPOSÉS**



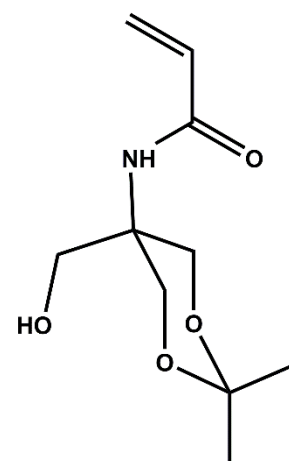
THAM



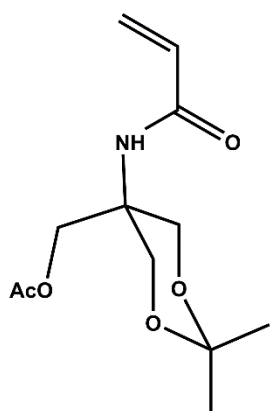
1



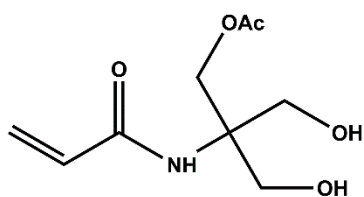
2



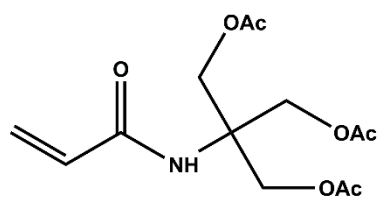
3



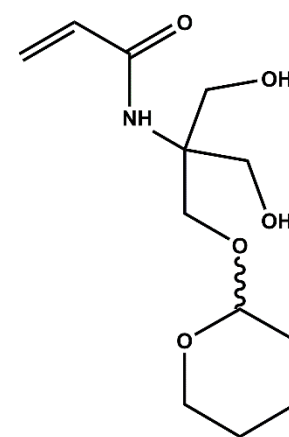
4



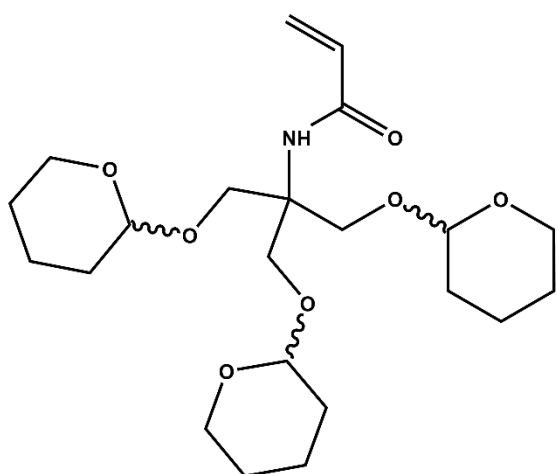
5



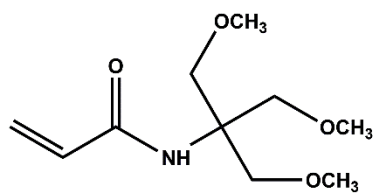
7



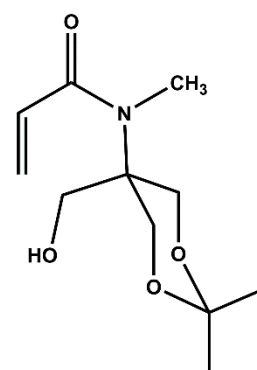
11



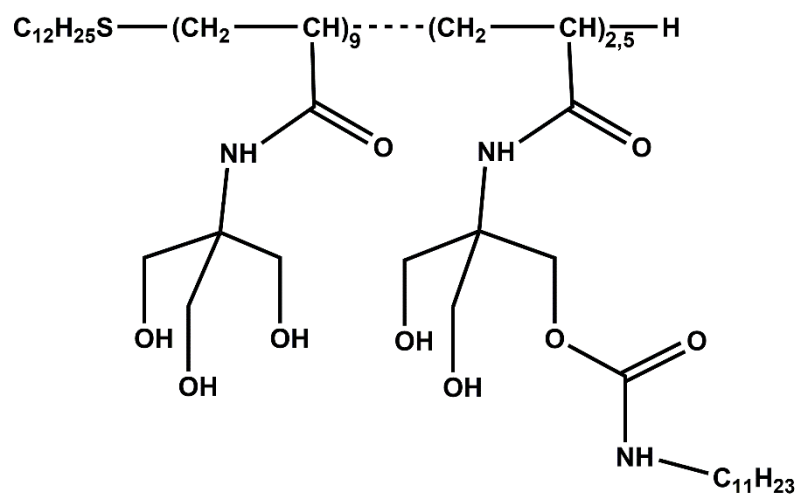
13



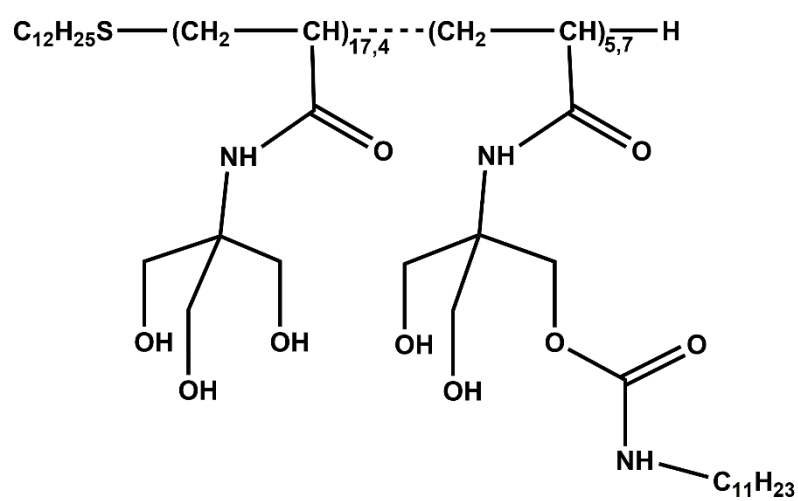
16



27

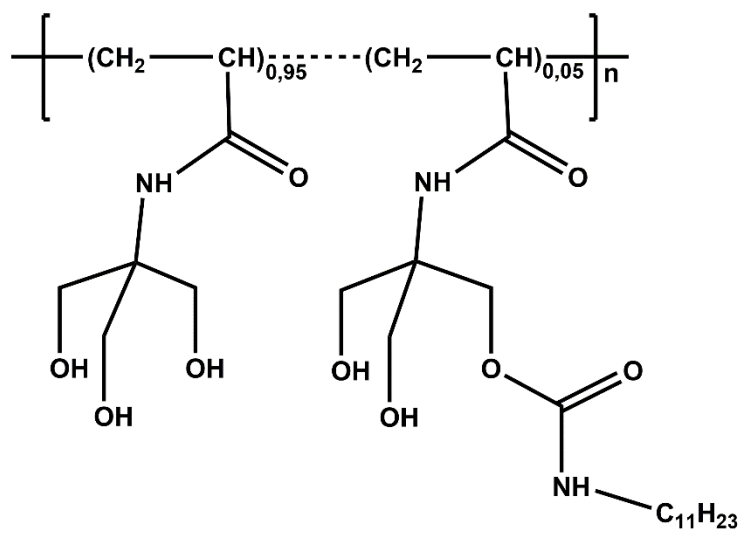


**74' ou C112**

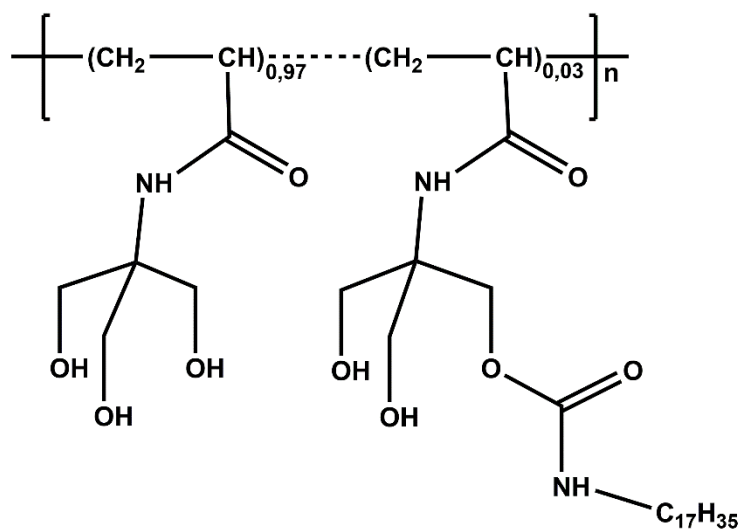


**76' ou C115**





114"/5/C<sub>11</sub>



114"/3/C<sub>17</sub>

## **RÉSUMÉ**

Les travaux décrits dans cette thèse ont eu pour objectif la synthèse et les études physico-chimiques d'une part de cotélomères amphiphiles dérivés du Tris(hydroxyméthyl)acrylamidométhane (THAM) destinés à assurer le maintien de protéines transmembranaires en solution aqueuse et d'autre part de polymères amphiphiles hydrosolubles associatifs capables d'assurer la vectorisation de principes actifs *in-vivo*.

Après un bref rappel bibliographique sur les potentialités des monomères dérivés du THAM, la synthèse et les études de cinétique de polymérisation radicalaire de plusieurs dérivés de ce monomère sont décrites dans le premier chapitre. Les résultats obtenus ont permis de montrer que la réactivité élevée de ce monomère est essentiellement due à l'établissement de fortes liaisons hydrogène intermoléculaires entre les fonctions hydroxyle du THAM.

Le deuxième chapitre est consacré à la synthèse de cotélomères amphiphiles (ou amphipols) aptes à maintenir une protéine membranaire en solution aqueuse pendant plusieurs semaines sous sa forme native. Ces cotélomères forment des associations très stables avec la protéine en s'enroulant autour de celle-ci.

Dans le troisième chapitre, sont introduites les notions de vectorisation-ciblage et exposés les travaux les plus récents basés sur ce concept. La synthèse de polymères amphiphiles associatifs utilisables comme vecteurs de principe actifs est alors décrite, les études rhéologiques ont montré les potentialités de ces structures mais également l'importance du mode de préparation choisie non seulement sur leur pouvoir associatif mais également sur leur comportement en solution aqueuse.

Mots clés : THAM, cinétique, télomères, amphipols, polyTris associatif.

## *ABSTRACT*

In this work we describe the synthesis and the physico-chemical studies of amphiphilic cotelomers derived from Tris(hydroxymethyl)acrylamidomethane (THAM). These molecules could be used either to maintain integral membrane proteins (IMPs) in aqueous solution or as amphiphilic macromolecular drug carrier.

After a short overview of THAM derivatives, the synthesis of several THAM-based monomers and the characterization of the free radical polymerization kinetic are reported for each monomer in a first chapter. The results showed that the high reactivity of this monomer was essentially due to the strong intermolecular hydrogen bonds established between THAM hydroxyl functions.

The second chapter is dedicated to the synthesis of amphiphilic THAM-based cotelomers called amphipols. Such short macromolecules are able to maintain an IMP in aqueous solution under its native form for many weeks. Neutral amphipols were found to strongly bind the transmembrane domain of the IMPs and thus leading to the formation of long-term stable complexes.

The third chapter introduces the drug-carrying and cells targetting and explains the most recent works based on this concept. It also describes the synthesis of associative amphiphilic THAM-based polymers that were expected as suitable candidate as drug carriers. The rheological studies gave some encouraging preliminary results and revealed the importance of the involved strategy pathway. Indeed, we observed that the method of synthesis affected both the associative properties and the behavior in aqueous solution of the yielded polymers.

Key-words: THAM, kinetic, telomers, amphipols, associative polyTris.