



HAL
open science

Conception, synthèse et caractérisation de polyacylhydrazones hydrosolubles dans un but antibactérien

Kilian Caillaud

► **To cite this version:**

Kilian Caillaud. Conception, synthèse et caractérisation de polyacylhydrazones hydrosolubles dans un but antibactérien. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSE1143 . tel-04225998

HAL Id: tel-04225998

<https://theses.hal.science/tel-04225998>

Submitted on 3 Oct 2023

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.

N° d'ordre NNT :
2022LYSE1143



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 34
(Matériaux)

Spécialité de doctorat : Chimie
Discipline : Physico-Chimie

Soutenue publiquement le 21/07/2022, par :
Kilian Caillaud

**Conception, synthèse et caractérisation
de polyacylhydrazones hydrosolubles
dans un but antibactérien**

Devant le jury composé de :

Mme Sophie Monge-Darcos	Professeure des Universités, Université de Montpellier	Rapporteure
M. Matthieu Raynal	Chargé de recherche CNRS, Sorbonne Université	Rapporteur
Mme Simona Mura	Maître de Conférence, Université Paris-Sud	Examinatrice
Mme Florence Popowycz	Professeure des Universités, INSA Lyon	Examinatrice
M. Thomas Trimaille	Professeur des Universités, Université Lyon 1	Président
Mme Catherine Ladavière	Directrice de Recherche CNRS, Université Lyon 1	Directrice de Thèse
Mme Agnès Crépet	Ingénieure d'Études, Université Lyon 1	Invitée

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique
Vice-Président du Conseil d'Administration
Vice-Président du Conseil Formation et Vie Universitaire
Vice-Président de la Commission Recherche
Directrice Générale des Services

M. Frédéric FLEURY

M. Hamda BEN HADID
M. Didier REVEL
M. Philippe CHEVALLIER
M. Petru MIRONESCU
M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTÉ

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine
Faculté d'Odontologie
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux
Faculté de Médecine Lyon-Est
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)

Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

Doyenne : Mme Dominique SEUX
Doyenne : Mme Carole BURILLON
Doyen : M. Gilles RODE
Directeur : M. Xavier PERROT
Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DÉPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)
Département Informatique
Département Mécanique
École Supérieure de Chimie, Physique, Électronique (CPE Lyon)
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)
Institut National du Professorat et de l'Éducation

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1
Observatoire de Lyon
Polytechnique Lyon
UFR Biosciences

UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)
UFR Faculté des Sciences

Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Directeur : M. Behzad SHARIAT
Directeur : M. Marc BUFFAT
Directeur : M. Gérard PIGNAULT
Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Directeur : M. Christophe VITON
Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Directeur : Emmanuel PERRIN
Administratrice Provisoire : Mme Kathrin GISELER
Directeur : M. Yannick VANPOULLE

Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Jamais vais donner toi haut

Jamais vais laisser toi bas

Jamais vais courir autour et désertier toi

Jamais vais faire toi pleurer

Jamais vais dire au revoir

Jamais vais raconter un mensonge et blesser toi

Richard Astley, 1987

Remerciements

La présentation de ce travail de recherche est la finalité et l'aboutissement de longues années d'expérimentations et de réflexions. La critique de ce manuscrit permet ainsi de juger de la qualité des résultats mais également du travail fourni durant cette thèse, et c'est pourquoi je tiens d'abord à remercier la Pr. Sophie Monge-Darcos et le Dr. Matthieu Raynal d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. De la même façon, je remercie la Pr. Florence Popowycz, le Pr. Thomas Trimaille et la Dr. Simona Mura d'avoir répondu positivement pour faire partie du jury en tant qu'examineurs de la soutenance.

Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans la direction bienveillante de Catherine Ladavière, avec qui nous avons probablement arrêté de compter le nombre de fois où on est restés plantés devant une courbe à se demander ce qu'il fallait en penser, ni sans l'aide précieuse d'Agnès Crépet concernant les expériences en chromatographie. Merci à vous pour les discussions de haute qualité, le soutien quand ça n'allait pas aussi bien que cela aurait dû, et pour votre positivité et votre bonne humeur de manière générale. Grâce à vous j'espère avoir atteint une maturité suffisante dans la recherche. Merci également aux membres du projet DynaSWEET (Sébastien Vidal, David Gueyrard, Fanny Demontrond, Benoît Cournoyer, Julien Leclaire) pour leurs suggestions et leurs regards toujours bienveillants sur les résultats, qui étaient souvent loin des objectifs fixés au début du projet. Enfin, je remercie également tous les chercheurs, ingénieurs d'études ou techniciens qui ont participé de près ou de loin à cette thèse, en particulier Fernande Boisson-Da Cruz pour l'analyse et les corrections approfondies des parties RMN, Pierre Alcouffe pour les expériences en microscopie électronique, Élodie Fromentin pour les analyses LC-MS, Valentin Cinquin pour les réflexions sur le fonctionnement de l'ITC, Patrick Goetinck et Carlos Fernandez de Alba pour la formation et les expériences RMN, et enfin Fernande Boisson-Da Cruz, Florence Popowycz et Julien Bernard pour avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse. Sans votre aide précieuse, cette thèse aurait été bien différente, merci à vous.

Ces trois (+ quelques mois) années de thèse n'auraient pas pu aboutir sans l'incroyable et inconditionnel soutien de mes proches, en particulier de ma famille, qui ont dû subir mon syndrome de l'imposteur pendant tout ce temps. Je ne vous remercierai jamais assez. De la même façon, un énorme merci au Crew : Hugo, Valentin, Gaël, Camille, Quentin et Aodren, votre soutien a été primordial et j'ai vraiment hâte de fêter ça avec vous !

On ne peut pas accomplir un tel travail pendant aussi longtemps sans un soutien quotidien de personnes qui vivent la même chose que vous. Merci à tous les doctorants pour les discussions, les pauses café, les blagues, les énigmes du Père Noël Secret, les croissants du vendredi, les apéros Discord pendant le confinement, le sport du midi, les repas à la MDP, les soirées Barabaar pour décompresser. Toutes ces choses et le soutien qu'on s'apporte font que la thèse paraît moins pénible au jour le jour, et c'est essentiel que ça reste comme ça, merci à vous (je ne vous nomme pas un par un parce que cette thèse est déjà assez longue comme ça, mais le cœur y est, et vous vous reconnaîtrez). Un merci spécial aux membres du bureau 425 (à André, Benjamin et Manon pour votre intégration dans le laboratoire et votre bonne humeur quotidienne ; à Euphrasie, Félix et Soumaya pour les petites discussions et le nombre de gâteaux impressionnant qui ont circulé dans ce bureau ; et surtout à toi Büşra qui m'aura supporté du début à la fin, merci pour ta bonne humeur permanente, les petits mots en turc que je n'ai pas encore oublié, tes pâtisseries feraient pâlir de jalousie n'importe quel professionnel... Je m'arrête là mais tu auras vraiment été indispensable à la réussite de cette thèse, teşekkür ederim !).

Je dédie ce paragraphe spécial au Mardinsa. Qui aurait cru qu'une réunion de quelques doctorants fauchés qui veulent boire une bière pas chère dans la Kfet de l'INSA un mardi soir aurait mené à une bande de potes aussi ouf ? Merci pour votre soutien quotidien, les relectures, les apéros, les week-ends, les festivals, les concerts, les vacances, ~~le tour d'Europe en train~~, les pauses Brawlstars, les soirées Civ6 ou RL, l'entraide pour la rédac... Yoanh, toi qui es arrivé au labo le même jour que moi, tu auras vraiment été un partenaire de thèse idéal, toujours là pour proposer ton aide ou pour parcourir l'entièreté du campus à la recherche de S. C., tu es vraiment une personne formidable que je suis content d'avoir rencontré. Mathieu, l'aîné, toujours là pour boire des shots à la bouteille allongé sur un bar ou taper du pied au Théâtre Antique avec Adam Beyer, profite bien du temps qu'il te reste à Strasbourg avant un retour à Lyon dans le futur j'espère. Léa, que de temps passé à commenter les matchs de NFL de la veille ! Tu étais toujours la première pour aller boire un coup, et à discuter de tout et de rien pour penser à autre chose, merci d'avoir été là pour les coups de mou. Anatole, on a trop de choses en commun pour que je les énumère ici, mais tu es vraiment une personne fantastique. Mais je ne peux pas ne pas mentionner cette fameuse soirée devant Worakls deux fois, avec un certain incident de clé. J'ai hâte de goûter tous les Eisbock de la Débauche un jour, même les dégueux. Mathilde, quelle incroyable personne tu es devenue. Bravo pour *Bien dans ma thèse*, pour le serveur Discord, pour tout ce que tu as fait et continue à faire pour les droits des doctorants, et encourager ceux qui sont encore dedans ou qui hésitent à s'y lancer, tu es d'utilité publique, et je suis extrêmement fier de te connaître, tu es formidable. Raph, Raphos, Raflouti, Rafouf, ou juste Raphaël, ta thèse n'aura pas été de tout repos non plus, surtout vers la fin, mais tu étais là pour donner un coup de main quand il le fallait. Promis on la fera cette course de F1, avec probablement une montagne de sushis.

Enfin, il me faut également remercier Charles, Gus et Hugo, avec qui j'ai créé *Memes au beurre salé* et *Neurchi de Bretons* au début de ma thèse. Tenir ces groupes Facebook et comptes Instagram et les voir grandir pendant ces trois ans a été une incroyable source de fierté et de satisfaction, qui sont indispensables pour se changer les idées en faisant quelque chose de totalement différent de la thèse. Un énorme merci à Alex de *Memes a ra mat* également, pour m'avoir grandement aidé à traduire mon résumé en breton, trugarez mat evit an diverradenn. Enfin, pour aller vers des remerciements plus terre à terre, je remercie les chaînes Youtube Lo-Fi Girl et Cercle d'exister et de m'avoir accompagné durant toute la période de rédaction, de la même façon que ma voisine du dessus qui joue du piano avec un talent discutable, contrairement à mes voisins du dessous qui eux jouent de la perceuse à toute heure de la journée avec une habileté sans conteste.

Table des matières

REMERCIEMENTS	2
LISTE DES ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION GENERALE.....	8
CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	14
I. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> , SES MECANISMES D'INFECTION ET SES PROTEINES DE SURFACE	17
II. LA CHIMIE COMBINATOIRE DYNAMIQUE	31
III. WATER-SOLUBLE (POLY)ACYLHYDRAZONES: SYNTHESSES AND APPLICATIONS (PUBLISHED REVIEW IN <i>MACROMOLECULAR CHEMISTRY AND PHYSICS</i>).....	43
IV. LE PROJET DYNASWEET DANS CE CONTEXTE	75
CHAPITRE II : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE POLYACYLHYDRAZONES A PARTIR DE MONOMÈRES « MODELES ».....	80
I. INTRODUCTION	82
II. ÉTUDE DE LA SOLUBILITÉ DES MONOMÈRES « MODELES » ET DES POLYACYLHYDRAZONES	84
III. MISE EN EVIDENCE DE LA POLYMERISATION	89
IV. INFLUENCE DU PH SUR LA POLYMERISATION	114
V. CONCLUSION SUR LES POLYACYLHYDRAZONES A BASE DE MONOMÈRES « MODELES ».....	126
CHAPITRE III : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE POLYACYLHYDRAZONES A PARTIR DE MONOMÈRES D'INTERET	128
I. INTRODUCTION	130
II. CARACTÉRISATION DES MONOMÈRES D'INTERET	133
III. POLYMERISATION A PARTIR DES MONOMÈRES D'INTERET	152
IV. CONCLUSION SUR LES POLYACYLHYDRAZONES A PARTIR DE MONOMÈRES D'INTERET	177
CHAPITRE IV : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE POLYACYLHYDRAZONE A PARTIR D'UN MONOMÈRE D'INTERET AUTO-ASSOCIATIF.....	180
I. INTRODUCTION	182
II. POLYMERISATION DU DIHYDRAZIDE D'INTERET AVEC UN DIALDEHYDE « MODELE »	184
III. CARACTÉRISATION DU CARACTÈRE AUTO-ASSOCIATIF DU DIHYDRAZIDE D'INTERET.....	194
IV. ANALYSE DE L'HYDROLYSE DU DHU	209
V. CONCLUSIONS SUR LA CARACTÉRISATION DU DIHYDRAZIDE D'INTERET AUTO-ASSOCIATIF	214
CHAPITRE V : PARTIE EXPERIMENTALE	216
I. SYNTHÈSE DES POLYACYLHYDRAZONES.....	218
II. CARACTÉRISATION DES MONOMÈRES ET DES POLYMERES	225
III. CARACTÉRISATION DE L'AUTO-ASSOCIATION DE MONOMÈRES	232
CONCLUSION GENERALE	242
RÉFÉRENCES	246
ANNEXES.....	264

Liste des abréviations

Monomères utilisés

DAG : Dialdéhyde « glucarate »

(2R,3S,4R,5S)-2,3,4,5-tetrahydroxy-N1,N6-bis(2-oxoéthyl)hexanediamide

DAGp : Dialdéhyde « glucarate » doublement protégé par acétalisation

(2R,3S,4R,5S)-N1,N6-bis(2,2-diméthoxyéthyl)-2,3,4,5-tetrahydroxyhexanediamide

DAGp_{1/2} : Dialdéhyde « glucarate » protégé sur une extrémité par acétalisation.

(2S,3R,4S,5R)-N1-(2,2-diméthoxyéthyl)-2,3,4,5-tetrahydroxy-N6-(2-oxoéthyl)hexanediamide

DAI : Dialdéhyde « iminodiacétate »

2,2'-(méthylazanediy)bis(N-(2-oxoéthyl)acétamide)

DAIp : Dialdéhyde « iminodiacétate » doublement protégé par acétalisation

2,2'-(méthylazanediy)bis(N-(2,2-diméthoxyéthyl)acétamide)

DAIp_{1/2} : Dialdéhyde « iminodiacétate » protégé sur une extrémité par acétalisation

N-(2,2-diméthoxyéthyl)-2-(méthyl(2-oxo-2-((2-oxoéthyl)amino)éthyl)amino)acétamide

DAP : Dialdéhyde « piperazine »

2,2'-(piperazine-1,4-diyl)diacétaldéhyde

DAPp : Dialdéhyde « piperazine » doublement protégé par acétalisation.

1,4-bis(2,2-diéthoxyéthyl)piperazine

DAPp_{1/2} : Dialdéhyde « piperazine » protégé sur une extrémité par acétalisation

2-(4-(2,2-diéthoxyéthyl)piperazin-1-yl)acétaldéhyde

DHG : Dihydraside « glucarate ».

(2R,3S,4R,5S)-2,3,4,5-tetraméthylhexanedihydraside

DHI : Dihydraside « iminodiacétate ».

2,2'-(méthylazanediy)di(acétohydraside)

DHS : Dihydraside succinique

DHU : Dihydraside « Ulrich »

4,4'-(6,9,12-trioxa-2,16-diazahéptadécane-1,17-diyl)di(benzohydraside)

GA : Glutaraldéhyde

PDAG : Dérivé inconnu du DAG, observé par spectrométrie de masse

PDAl : Dérivé inconnu du DAI, observé par spectrométrie de masse

TDC : 2,5-thiophènedicarboxaldéhyde

TPA : Téréphthalaldéhyde

Techniques d'analyse et grandeurs physiques

ΔG_{agg} : Différence d'enthalpie libre d'agrégation

ΔH_{agg} : Différence d'enthalpie d'agrégation

ΔS_{agg} : Différence d'entropie d'agrégation

AF4 : *Asymmetric flow field flow fractionation (Angl.)*

BCD, BCV : Bibliothèque combinatoire dynamique, virtuelle

CAC : Concentration d'agrégation critique

CCD : Chimie combinatoire dynamique

COSY : *Correlated Spectroscopy (Angl.)*

DEPT : *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Angl.)*

DLS : *Dynamic Light Scattering (Angl.)*

DOSY : *Diffusion-ordered spectroscopy (Angl.)*

DP : Degré de polymérisation

D_z : Diamètre hydrodynamique moyen

E_A : Énergie d'activation

ESI-TOF : *Electrospray Ionization Time-of-Flight (Angl.)*

HMBC : *Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Angl.)*

HPLC, UHPLC : *High pressure liquid chromatography (Angl.)*

HSQC : *Heteronuclear Single Quantum Coherence (Angl.)*

IR-ATR : *Infrared - Attenuated total reflection (Angl.)*

ITC : *Isothermal Titration calorimetry (Angl.)*

LC-MS : Chromatographie liquide couplée à un détecteur de spectrométrie de masse

LS : Light scattering (Angl.)

MALDI-TOF : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight (Angl.)*

MALS : Diffusion de la lumière multi-angles

MET : Microscopie électronique à transmission

NA : Non applicable

PdI : Indice de polydispersité

RI : Indice de réfraction

RMN : Résonance magnétique nucléaire

rpm : rotation par minute

SEC : Chromatographie d'exclusion stérique

UA : Unité arbitraire

uma : unité de masse atomique

UV : Ultraviolet

Matériaux et réactifs

4a-Phe : 4-aminophénylalanine

ACN : Acétonitrile

AcOH : Acide acétique

CHCA : Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique

DHB : Acide 2,5-dihydroxybenzoïque

DMF : Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EtOH : Ethanol

HFIP : Hexafluoroisopropanol

iPrOH : Isopropanol

MeOH : Méthanol

PA : *Pseudomonas aeruginosa*

PAcH : Polyacylhydrazone

PCA : Polycarbinolamine

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : Tétrahydrofurane

Introduction Générale

Depuis l'aube de l'humanité, se protéger des maladies est une priorité. Récemment, la pandémie de Covid-19 nous l'a rappelé, à travers l'élaboration rapide de plusieurs vaccins pour lutter contre le coronavirus. Toutefois, l'apparition de variants de ce virus a rendu certains de ces vaccins moins efficaces, en raison de la mutation de certaines souches. Pour des bactéries, la mutation des espèces mène à l'apparition de résistances, notamment aux antibiotiques. Ce phénomène pose donc de nombreux problèmes de santé publique, car ces bactéries deviennent plus difficiles à soigner à grande échelle, tant les médicaments perdent en efficacité.

De nos jours, une des bactéries les plus préoccupantes par sa multirésistance aux antibiotiques est sans conteste *Pseudomonas aeruginosa* (PA), dont la recherche de nouveaux traitements a été rendue prioritaire par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). La Figure 1 montre ainsi l'évolution de l'intérêt porté à cette bactérie par la recherche académique, qui est croissant depuis une trentaine d'années.

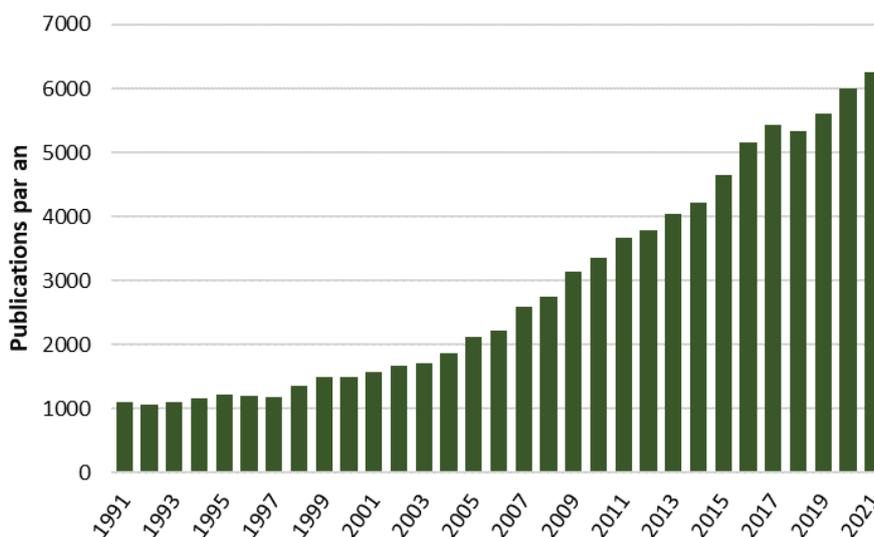


Figure 1 - Statistiques sur le nombre de publications par an entre 1991 et 2021 comportant « *Pseudomonas aeruginosa* » dans les mots-clés (obtenues par Web of Science).

Le projet DynaSWEET, financé par l'ANR, s'inscrit dans cette dynamique en imaginant des structures macromoléculaires dynamiques (des dynamères) capables d'isoler les bactéries pour les empêcher de provoquer des infections chroniques. Pour cela, des macrocycles comportant des sucres ont pour objectif de servir de ligands à des protéines de surface de PA (les lectines), tandis que ces macrocycles seraient eux-mêmes liés entre eux par des liaisons dynamiques, formant ainsi un polymère (ou dynamère dans ce cas). Ce type de structure pourrait éventuellement être utilisé conjointement à des antibiotiques pour augmenter leur efficacité.

L'utilisation de liaisons dynamiques pour la conception des polymères, ou dynamères, permet une flexibilité dans la configuration et la conformation de l'enchaînement des unités de répétition, menant à un polymère théoriquement capable de s'adapter à la distribution des protéines de surface de PA, grâce à la chimie combinatoire dynamique. Ces liaisons, sélectionnées pour ce projet DynaSWEET, sont des liaisons disulfures entre les composants des ligands macrocycliques, et des fonctions acylhydrazones pour celles liant les macrocycles à des unités de répétition permettant de les espacer.

Cette thèse correspond à la partie « polymères/dynamères » de ce projet DynaSWEET, et plus particulièrement à la synthèse de polyacylhydrazones. Ce type de polymère est relativement peu décrit dans la littérature (Figure 2), mais possède de nombreux avantages, comme celui de pouvoir changer sa constitution en unités de répétition en fonction des conditions du milieu, et de posséder des domaines de réversibilité (milieu acide) et de stabilité (milieu basique).

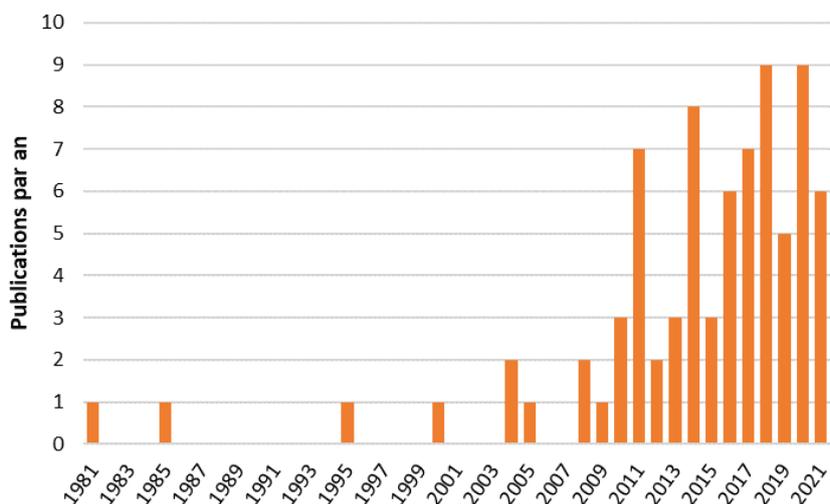


Figure 2 - Statistiques sur le nombre de publications par an entre 1981 et 2021 comportant « polyacylhydrazone » ou « poly(acylhydrazone) » dans les mots-clés (obtenues par Web of Science)

Ces polymères sont synthétisés à partir de monomères dihydrazides et de monomères dialdéhydes dont la structure chimique peut varier (*i.e.* la nature de R_1 et R_2 dans la Figure 3). Outre leur synthèse, un autre objectif de cette thèse est que les polyacylhydrazones obtenus soient suffisamment solubles dans l'eau pour être ensuite valorisés dans leur future application biologique.

Afin de réaliser ces objectifs, une mise au point de la chimie de synthèse des polyacylhydrazones et des techniques d'analyse pour les caractériser a été tout d'abord effectuée sur des monomères dihydrazides et dialdéhydes « modèles ». Ces derniers ont été sélectionnés pour leur satisfaisante hydrosolubilité et accessibilité commerciale. Dans un second temps, des monomères

dialdéhydes et dihydrazides d'intérêt pour le projet DynaSWEET, synthétisés par Fanny Demontrond (doctorante dans l'équipe LCO2, à l'ICBMS, partenaire du projet ANR), ont été employés pour élaborer les polyacylhydrazones.

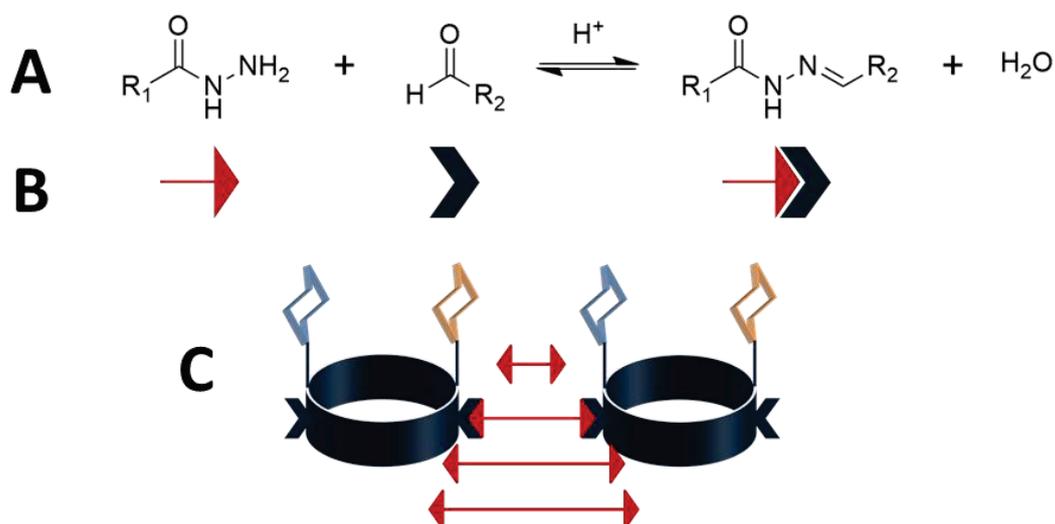


Figure 3 - A) Réaction de formation de la liaison acylhydrazone, à partir d'une fonction hydrazide et une fonction aldéhyde. **B)** Représentation schématique d'une fonction hydrazide, aldéhyde, et acylhydrazone. **C)** Représentation schématique du *design* du dynamère visé dans le projet DynaSWEET. Il comporte des glycoclusters macrocycliques liés entre eux par des bras « espaceurs » bifonctionnels de différentes longueurs, capables ainsi de s'ajuster à la distribution surfacique de lectines de PA.

Il a été choisi de scinder ce manuscrit de thèse en cinq chapitres pour présenter tout ce travail de recherche.

- Le premier chapitre sera consacré à l'étude bibliographique des différents concepts considérés au cours de cette thèse, à savoir le contexte biologique et la description de *Pseudomonas aeruginosa*, les concepts et objectifs de la chimie combinatoire dynamique, ainsi qu'une partie rédigée sous la forme d'une revue (récemment acceptée dans *Macromolecular Chemistry and Physics*) consacrée aux (poly)acylhydrazones hydrosolubles. Enfin, une dernière sous-partie présentera plus en détail le projet DynaSWEET, ainsi que les recherches réalisées par les autres partenaires de ce projet.
- Le deuxième chapitre portera sur la synthèse des polyacylhydrazones formés à partir des monomères « modèles » et leur caractérisation par différentes techniques d'analyse.
- Le troisième chapitre décrira et discutera les résultats concernant la deuxième génération de polyacylhydrazones, à savoir celle obtenue à partir des monomères d'intérêt. L'analyse des monomères et des polymères sera là aussi réalisée à l'aide de différentes techniques de caractérisation.

Introduction Générale

- Le quatrième chapitre explorera un monomère dihydrazide particulier, en raison du polyacylhydrazone qu'il forme avec un monomère dialdéhyde « modèle », et aussi en raison de son comportement physico-chimique en solution dans l'eau, conduisant à des objets inattendus issus de son auto-association.
- Enfin, le cinquième et dernier chapitre correspondra à une description des conditions expérimentales de synthèse et d'analyse, utilisées et mises au point lors de ce travail de thèse.

Chapitre I :

Étude bibliographique

Sommaire du chapitre

I.	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA, SES MECANISMES D'INFECTION ET SES PROTEINES DE SURFACE</i>	17
1.	<i>Généralités sur les bactéries</i>	17
a.	Les bactéries à Gram négatif et positif	17
b.	Multirésistance aux antibiotiques	19
2.	<i>Pseudomonas aeruginosa et ses mécanismes d'infection</i>	20
a.	Présentation	20
i.	Description de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
ii.	Pathologies liées à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
b.	Mécanisme d'infection	22
i.	Mécanisme global	22
ii.	Les facteurs de virulence	22
iii.	Le biofilm	23
c.	Traitements actuels et en cours de développement	25
i.	Les antibiotiques	25
ii.	Autres traitements	26
3.	<i>Les lectines de Pseudomonas aeruginosa</i>	27
a.	Présentation des lectines de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
b.	Les stratégies d'inhibition des lectines	28
4.	<i>Conclusion</i>	30
II.	LA CHIMIE COMBINATOIRE DYNAMIQUE	31
1.	<i>Introduction</i>	31
a.	La chimie combinatoire « statique »	31
b.	La chimie combinatoire dynamique	32
2.	<i>Principe de la chimie combinatoire dynamique</i>	33
a.	Description du mécanisme	33
b.	Bibliothèques combinatoires dynamiques	35
i.	Description	35
ii.	Diversité à travers la réversibilité de la formation de liaisons	36
iii.	Diversité conformationnelle	36
iv.	Biais dans les BCD	37
3.	<i>Les dynamères</i>	38
a.	Description, avantages et limites des dynamères par rapport aux polymères non dynamiques	38
b.	Propriétés et applications des dynamères	39
c.	Méthodes de caractérisation des bibliothèques combinatoires dynamiques	41
4.	<i>Conclusion</i>	41
III.	WATER-SOLUBLE (POLY)ACYLHYDRAZONES: SYNTHESSES AND APPLICATIONS (PUBLISHED REVIEW IN <i>MACROMOLECULAR CHEMISTRY AND PHYSICS</i>)	43
1.	<i>Abstract</i>	43
2.	<i>Introduction</i>	43
3.	<i>Acylhydrazone function</i>	45
a.	Description of the acylhydrazone function	45
b.	Catalysis of the acylhydrazone formation	47
c.	Portfolio of (supra)molecular structures implying acylhydrazone bonds, from organic-solvent syntheses	50
4.	<i>Single bond acylhydrazone synthesis strategies</i>	53
a.	Synthesis strategies in organic solvents with a water-soluble purpose	53
b.	Synthesis strategies in aqueous medium	55
5.	<i>Multiple bond acylhydrazones synthesis strategies</i>	59
a.	Synthetic polymers with acylhydrazone functions in the main chain	60
i.	Synthesis strategies in organic solvents	61
ii.	Synthesis strategies in aqueous solvents	63

b.	Synthetic polymers with acylhydrazone functions in side chains	66
c.	Bio-based polymers with acylhydrazone functions in the main and side chains	70
6.	<i>Conclusion and Discussion</i>	73
IV.	LE PROJET DYNASWEET DANS CE CONTEXTE	75
1.	<i>Présentation d'inhibiteurs de Pseudomonas aeruginosa</i>	75
2.	<i>Des ligands dynamiques pour LecA et LecB...</i>	75
3.	<i>...aux polymères dynamiques pour la bactérie</i>	78

Cette étude bibliographique a pour objectif d'exposer l'état de l'art des différents aspects abordés au cours de cette thèse. Ainsi, dans une première partie, la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, ses mécanismes d'infection, ainsi que ses glycoprotéines de surface (les lectines) seront décrits. Dans une deuxième partie, les notions fondamentales de la chimie combinatoire dynamique, ses limites, et ses atouts, comme celui de conduire à la formation de polymères dynamiques, seront présentés. Ensuite, une troisième partie, correspondant à une revue, récemment publiée dans *Macromolecular Chemistry and Physics*, rassemblera la littérature sur la synthèse et les applications des (poly)acylhydrazones hydrosolubles. Cette partie viendra compléter des notions décrites dans la deuxième. Enfin, la dernière et quatrième partie permettra de situer le projet DynaSWEET dans son contexte, et d'en introduire ses objectifs.

I. *Pseudomonas aeruginosa*, ses mécanismes d'infection et ses protéines de surface

Cette première partie de l'étude bibliographique expose le contexte biologique dans lequel s'inscrit cette thèse, à savoir une espèce de bactérie appelée *Pseudomonas aeruginosa*. Dans un premier temps, quelques généralités à propos des bactéries seront établies, puis la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (PA) sera décrite, ainsi que son mécanisme d'infection et les traitements de soin déjà disponibles. Enfin, les lectines, des protéines cibles clés de PA, seront présentées, ainsi que les stratégies utilisées actuellement pour les inhiber.

1. Généralités sur les bactéries

a. Les bactéries à Gram négatif et positif

Les bactéries sont des organismes unicellulaires procaryotes, ne contenant pas de noyau. L'ADN y est alors libre dans le cytoplasme. D'une taille de l'ordre du micromètre, elles peuvent prendre de nombreuses formes, comme des bacilles ou des coques.

Les bactéries se distinguent en deux grandes familles, en fonction de leur coloration par le test de Gram¹ (Figure 4). Ce test, développé par Hans Gram en 1884, permet de différencier les bactéries à partir des compositions de leur paroi, grâce à une série de colorations/décolorations. Les bactéries présentant une coloration violette à l'issue de ce test sont appelées « à Gram positif », et possèdent une membrane interne cytoplasmique, composée de phospholipides, entourée par une épaisse paroi composée majoritairement de peptidoglycanes. Par exemple, la bactérie *Staphylococcus aureus* appartient à cette famille.²

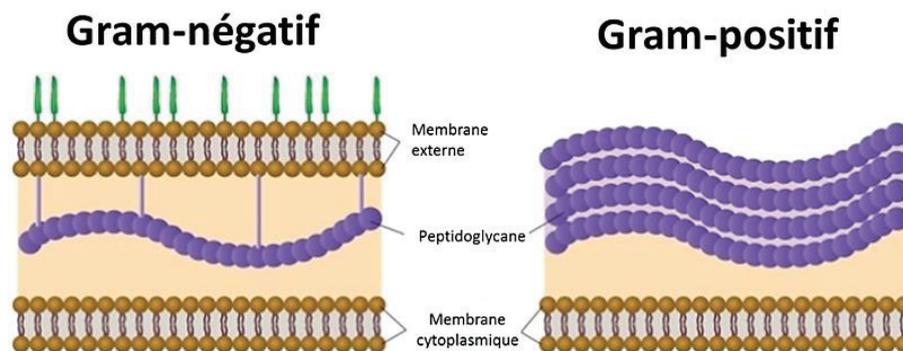


Figure 4 - Structure membranaire des bactéries à Gram positif et négatif, adapté de Shahriari *et al.*¹

Les bactéries présentant une coloration rose à l'issue du test de Gram sont appelées « à Gram négatif ». La particularité de ces bactéries est qu'elles présentent trois couches membranaires successives. La membrane la plus externe est composée de phospholipides, de lipopolysaccharides (LPS) et de protéines. Certaines de ces protéines, les porines, ont la propriété d'ouvrir la membrane par des canaux hydrophiles internes permettant un échange de nutriments constant avec le milieu extracellulaire. D'autres protéines, appelées pompes à efflux, sont des canaux actifs permettant l'éjection de composants indésirables vers l'extérieur de la cellule. La couche suivante est une paroi poreuse de peptidoglycane, bien plus fine que celle des bactéries à Gram positif. Enfin, une membrane interne cytoplasmique, constituée de phospholipides, complète l'assemblage. Des structures protéiques filamenteuses, appelées *fimbriae* ou *pili*, peuvent être fixés à la membrane externe. Leur rôle principal est la reconnaissance cellulaire et l'adhésion de la bactérie sur différentes surfaces. Par exemple, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sont des bactéries à Gram négatif. Enfin, les bactéries peuvent également être pourvues de flagelle, permettant la mobilité de la cellule.²

La plupart des bactéries sont inoffensives et ont même un effet bénéfique pour les êtres humains, mais une partie d'entre elles peut provoquer des maladies infectieuses susceptibles d'entraîner des conséquences graves, comme la tuberculose, le choléra, la syphilis, ou encore la peste. Ces bactéries nuisibles sont traditionnellement traitées avec des antibiotiques depuis les années 1940³, après leur découverte par Alexander Fleming en 1928.

b. Multirésistance aux antibiotiques

La découverte des antibiotiques, et la généralisation de leur utilisation après la Seconde Guerre Mondiale, a permis une formidable avancée dans le traitement des maladies infectieuses et dans la santé publique en général. Cependant, la résistance des bactéries à ces antibiotiques est devenue de plus en plus préoccupante au fil du temps, impliquant que certaines maladies infectieuses soient devenues presque intraitables.⁴ Cela a amené une mobilisation de la recherche vers la découverte de toujours plus d'antibiotiques.⁵

La résistance aux antibiotiques est pourtant naturelle, et résulte du procédé de sélection naturelle théorisé par Darwin. En effet, une résistance à des antibiotiques a été décelée sur des bactéries vieilles de plus de 2 000 ans, isolées dans la banquise de l'Arctique.⁴ La raison de la généralisation de la résistance provient de la pression de sélection, qui permet aux bactéries résistantes de devenir majoritaires parmi leurs semblables.

Cette résistance peut être intrinsèque, ce qui peut expliquer la propension de certaines bactéries à être initialement moins sensibles à un antibiotique que d'autres. Ainsi, les bactéries Gram-négatives sont naturellement plus résistantes que les bactéries Gram-positives, principalement en raison de la présence de leur membrane extérieure qui contribue à réduire leur perméabilité.⁶ La résistance peut également varier au sein même des bactéries Gram-négatives. Par exemple, la perméabilité de la membrane de PA est au moins douze fois plus faible que celle de *E. coli*,⁷ principalement dû au fait que moins de 1% des porines de PA sont réellement actives.³ Un autre mécanisme de résistance intrinsèque peut être lié à des pompes à efflux très actives.⁵ La capacité de certaines bactéries à établir des infections à l'aide de la formation d'un biofilm leur offre également une protection supplémentaire et augmente leur résistance.⁶

Il existe également une résistance acquise, qui s'obtient par mutation de certains gènes. Certaines bactéries vont ainsi produire des enzymes capables de dégrader l'antibiotique, tandis que d'autres vont modifier la cible de l'antibiotique pour le rendre inefficace.⁵ De plus, certaines souches vont muter pour pouvoir sur-exprimer leurs pompes à efflux et ainsi diminuer drastiquement la dose à l'intérieur de la cellule.⁶

Ainsi, de nos jours, un antibiotique est rarement utilisé seul sur des souches résistantes. En effet, le phénomène de résistance a statistiquement moins de risque d'apparaître si plusieurs antibiotiques sont combinés, ou si un antibiotique est combiné à un inhibiteur d'enzyme dégradant les antibiotiques. De plus, les nouveaux traitements sont prioritairement réservés aux bactéries les plus préoccupantes, comme *Klebsiella pneumoniae* ou PA.⁵

2. *Pseudomonas aeruginosa* et ses mécanismes d'infection

Une des bactéries les plus résistantes aux antibiotiques est *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Dans cette partie, cette bactérie sera tout d'abord décrite, puis ses mécanismes d'action seront présentés. Enfin les traitements pour l'éradiquer, ainsi que ses mécanismes de résistance seront abordés.

a. Présentation

i. Description de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, découverte en 1882 à partir de colorations bleues-vertes sur des plaies de soldats, n'appartient pas à la flore bactériale humaine.⁸ Il s'agit d'une bactérie ubiquitaire et principalement répandue dans l'eau, qui possède une grande adaptabilité à son environnement.² En effet, après le séquençage complet du génome de PA, Stover *et al.*⁹ ont montré que 8,4% de celui-ci est constitué de gènes impliqués dans la régulation. Cette grande adaptabilité lui confère un potentiel de résistance aux antibiotiques accru, car la capacité d'apparition de souches mutantes est plus importante. Ainsi, d'après le rapport du réseau REA-Raisin (réseau de surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte), PA est le germe le plus fréquemment rencontré lors d'infections nosocomiales en réanimation en France et représente 19,9% des micro-organismes rencontrés.¹⁰ De plus, un récent rapport de l'OMS a statué que PA faisait partie des trois souches de bactéries dont la recherche de nouveaux antibiotiques est hautement prioritaire, en raison de sa multirésistance.⁵

Concernant sa structure, il s'agit d'une bactérie Gram-négative (*i.e.*, présentant une structure membranaire à trois couches). Elle possède une forme bacillaire, d'une longueur maximale de 5 µm. PA comporte un flagelle, dont la principale utilité est sa mobilité et son adhérence aux cellules épithéliales.¹¹ Cette bactérie présente quelques *fimbriae*, ou *pili*, qui sont regroupés à ses pôles et servent également à l'adhérence de la bactérie aux cellules extérieures.¹²

ii. Pathologies liées à *Pseudomonas aeruginosa*

Comme présenté dans le précédent paragraphe, PA est particulièrement fréquente en milieu hospitalier, et n'est pas ou peu pathogène pour une personne saine, la peau et les muqueuses constituant normalement une barrière efficace contre cette bactérie. Ainsi, PA est virulente si elle

arrive à entrer dans le corps à travers des plaies, des brûlures, ou des lésions de muqueuses.⁸ C'est la raison pour laquelle cette bactérie est qualifiée d'« opportuniste ».

De ce fait, les individus les plus à risque vis-à-vis de PA sont les patients atteints de mucoviscidose, qui se manifeste entre autres par une altération de l'épithélium respiratoire, ouvrant la voie à une infection par la bactérie. Ainsi, la plupart des études montrent que 70 à 80% des adolescents atteints de mucoviscidose développent une infection à PA.^{13,14} Les infections seront donc principalement bronchiques ou pulmonaires, aiguës ou chroniques, et sont la première cause de mortalité des personnes atteinte de la mucoviscidose. De la même façon, les patients hospitalisés sous ventilation assistée et immunodéprimés sont susceptibles de développer des pneumonies, suite à une infection par PA. Ces infections peuvent aller jusqu'à une septicémie.^{8,14}

Chez les patients victimes de brûlures ouvertes, notamment les grands brûlés, le risque de développer une infection cutanée par PA est également très important, du fait des lésions graves sur la peau. Les patients atteints d'ulcères ou de lésions macérées et humides peuvent également développer ce type d'infections.¹⁴ D'autres infections peuvent aussi survenir, comme des infections oculaires ou urinaires. Enfin, des infections moins fréquentes sont observées, comme des otites externes, des infections ostéo-articulaires, ou encore des endocardites.¹⁴ La Figure 5 rapporte les principaux sites infectieux en service de réanimation en France en 2016, avec leur prévalence.¹⁰

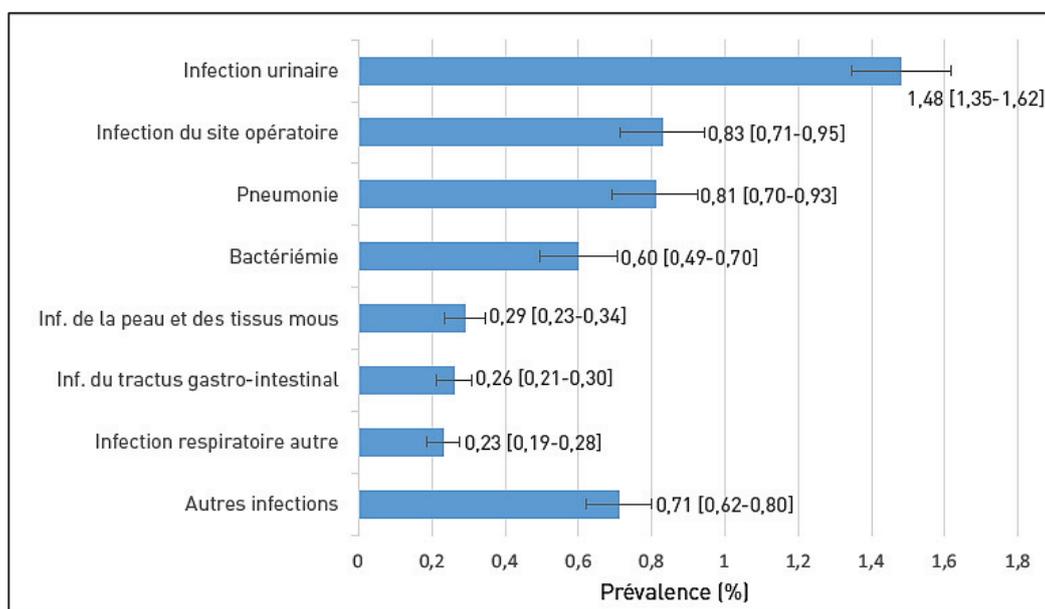


Figure 5 - Prévalence des sites infectieux par PA en service de réanimation en 2016. Tirée du rapport « Santé Publique France » de juin 2017.¹⁰

b. Mécanisme d'infection

Dans cette partie, le mécanisme d'infection par PA sera décrit en prenant pour exemple une infection pulmonaire chez des patients atteints de mucoviscidose. Cette infection est connue pour avoir de graves conséquences (75% des décès chez les individus atteints de mucoviscidose).¹⁵

i. Mécanisme global

La mucoviscidose a de grands impacts sur les mécanismes de défense de l'individu malade. En effet, la protéine CFTR, une protéine membranaire responsable du flux d'ions chlorure des cellules épithéliales, devient alors déficiente provoquant une concentration plus importante en chlorure dans les sécrétions respiratoires. Cela a pour effet d'inhiber les globules blancs présents dans les tissus, les neutrophiles, mais également les peptides capables d'activité antimicrobienne. Ainsi, la persistance bactérienne est naturellement plus importante que chez un individu sain.^{14,16} De plus, les cellules épithéliales des individus atteints de mucoviscidose possèdent plus de glycolipides membranaires, permettant un ancrage plus important de PA. Ainsi, les bactéries qui étaient auparavant dans un état planctonique, *i.e.* isolées les unes des autres et libres en milieu aqueux, se fixent sur ces points d'ancrage et se regroupent en colonies.^{14,16} C'est alors qu'intervient le « quorum sensing » (ou détection du quorum, en français). PA possède de nombreux facteurs de virulence immunogènes, capables de déclencher une réponse immunitaire importante. Le « quorum sensing » est un système de communication intra-bactérien, dont le rôle est d'inhiber ces facteurs de virulence tant que la concentration locale de bactérie n'a pas atteint une valeur critique. Cette communication est possible grâce la libération de molécules dans le milieu extracellulaire, les N-acyl-homosérine lactones. Les bactéries peuvent ainsi se regrouper en colonies et provoquer une infection chronique.^{11,14,17} Des capteurs de N-acyl-homosérine lactone sont présents sur la membrane des bactéries et provoquent, lorsqu'ils sont saturés de cette molécule (*i.e.* la densité de population de PA a atteint sa valeur critique), une libération de toxines stockées dans la bactérie. Ainsi, PA s'adapte très facilement à son environnement en attendant que la colonie soit suffisamment développée.^{11,14,17}

ii. Les facteurs de virulence

Les facteurs de virulence sont les différentes molécules pathogènes produites par PA, comme les exotoxines. De nombreuses exotoxines sont ainsi stockées dans le périplasme de la bactérie (*i.e.* dans l'espace compris entre les deux bicouches lipidiques de la membrane). La bicouche extérieure

comprend des lipopolysaccharides (LPS), qui sont des endotoxines très immunogènes. Enfin, les composés permettant l'adhésion de la bactérie sont aussi des facteurs de virulence, comme les adhésines qui représentent une famille de protéines incluant notamment les lectines.^{14,18} Ces toxines sont sécrétées dans le milieu extracellulaire lorsque le biofilm est suffisamment développé. Les exotoxines ont alors pour fonction de pénétrer dans les cellules épithéliales et de moduler certaines fonctions cellulaires. Les *pili* et le flagelle, qui sont impliqués dans l'adhésion cellulaire, déclenchent également une réaction immunitaire.^{2,14,19} Une concentration massive de ces toxines peut mener à une bactériémie qui, en stimulant le système immunitaire de façon excessive, peut provoquer un choc septique pouvant être mortel.¹⁴ Notons toutefois que ces facteurs de virulence, ou toxines, sont inhibés si la bactérie est isolée ou si la colonie n'est pas assez développée.

iii. Le biofilm

Le biofilm est défini par Carpentier²⁰ comme une communauté bactérienne contenue dans une matrice composée de polymères et d'eau. Il s'agit de bactéries enrobées dans un hydrogel de polymères, adhérant les unes aux autres, et également à une surface. Ces polymères sont principalement des polysaccharides, accompagnés de glycoprotéines et d'acides nucléiques.²¹ Ces polysaccharides sont nommés « exopolysaccharides » (EPS) car ils ne sont pas liés de manière covalente aux bactéries. Ils peuvent être des homopolymères, comme de la cellulose ou du dextrane, ou des hétéropolymères, comme l'alginate.²⁰ D'ailleurs, ce dernier est le principal polymère synthétisé par PA.

La structure du biofilm est très étudiée, en raison de leur capacité à provoquer des infections chroniques difficiles à traiter.²² En effet, il permet : i) de protéger la bactérie des agressions extérieures et ainsi permettre sa multiplication, ii) de grandement favoriser l'attachement des bactéries entre elles et sur un support, mais également iii) de conserver un taux suffisant d'eau autour de celles-ci. Costerton²³ a montré que l'eau représentait de 50 à 98% de la masse totale des biofilms.

L'existence de canaux à eau dans la matrice d'EPS a été mise en évidence, permettant l'évacuation des déchets, mais aussi un acheminement de nutriments et d'oxygène vers l'intérieur du biofilm.²² Cependant, un gradient de concentration en nutriments et en oxygène existe dans le biofilm, entraînant un état de dormance des bactéries au cœur du celui-ci en raison de carences en nutriments à cet endroit. Cet état de dormance conduit alors à une perte de volume des bactéries, par exemple cette perte est de l'ordre de 70% volumique pour les cellules de PA.²⁴

Le mécanisme de création et de maturation d'un biofilm s'effectue en 4 étapes majeures, schématisées dans la Figure 6 :

- I. Initialement sous état planctonique, *i.e.* isolée et soumise à un mouvement pseudo-brownien en milieu aqueux,²² la bactérie adhère tout d'abord de manière réversible à une surface. Ce contact est principalement de nature électrostatique, aidé par les adhésines de surface de la bactérie. Ces dernières peuvent être situées sur le flagelle ou sur les *pili*, comme les lectines LecA et LecB.¹³
- II. Cette première adhésion agit sur les gènes *algC* et *algD* de PA,^{11,22} stimulant alors la production d'alginate et d'autres EPS.²¹ Ces derniers vont alors créer des points de contact supplémentaires entre les adhésines de la membrane bactérienne et le support, rendant la liaison bactérie-surface irréversible.
- III. La matrice d'EPS et d'eau va conférer une protection supplémentaire aux bactéries, qui va faciliter leur multiplication. Le biofilm est en maturation. Parallèlement, une autolyse des bactéries intérieures va dégrader le biofilm et créer une cavité centrale, où des bactéries vont pouvoir évoluer dans un état planctonique, protégées des agressions extérieures par le biofilm.²¹
- IV. Une fois la maturation terminée, les bactéries intérieures vont être libérées et dispersées dans un état planctonique pour aller coloniser d'autres surfaces et former d'autres biofilms.^{13,22}

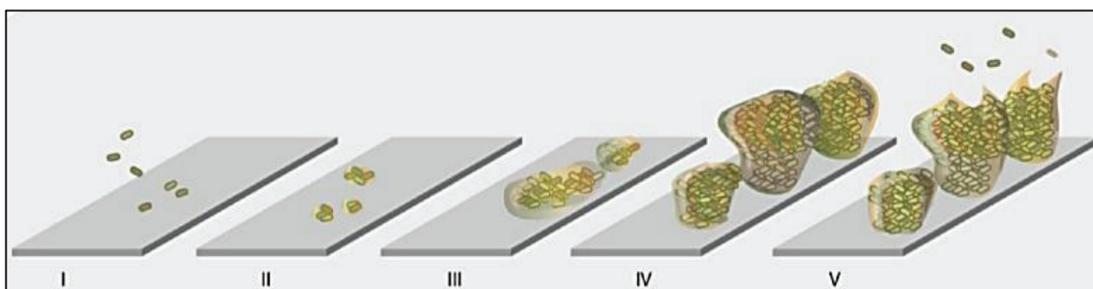


Figure 6 - Étapes de la formation d'un biofilm. I – Liaison réversible. II – Liaison irréversible, passage de l'état planctonique à l'état sessile. III – Début de la maturation. IV – Fin de la maturation. V – Dispersion. Tiré de Wagner *et al.*¹³

Les biofilms sont ainsi une réserve de bactéries et de facteurs de virulence.¹³ Il est possible que plusieurs espèces de bactéries coexistent au sein d'un même biofilm, certaines pouvant même mettre en place une coopération métabolique, améliorant leurs chances de survie.²⁵ De plus, il a été montré que les biofilms augmentaient la résistance des bactéries aux antibiotiques et aux mécanismes de défense immunitaire de l'hôte, en ralentissant leur diffusion.¹³ Ainsi, les bactéries dans un biofilm peuvent se révéler être de 2 à 100 fois plus résistantes que celles libres, en état planctonique.²⁶ Les

travaux de Ma²¹ ont montré qu'il était possible d'effectuer un parallèle entre un organisme pluricellulaire et le comportement des bactéries lors de la création d'un biofilm.

c. Traitements actuels et en cours de développement

La capacité de PA à provoquer des infections graves a suscité de nombreux travaux visant à pouvoir lutter contre ces infections. Il existe en effet des molécules capables d'éradiquer les bactéries, appelées antibiotiques, mais d'autres méthodes sont considérées, notamment des vaccins. Dans cette partie, les traitements disponibles contre PA seront détaillés, ainsi que les causes connues de résistance que cette bactérie a pu développer contre ces traitements.

i. Les antibiotiques

Depuis leur mise en circulation à grande échelle à partir des années 1940, les antibiotiques ont permis une diminution globale des infections.³ Cependant, leur mode d'action consistant à tuer les bactéries a conduit à un phénomène de pression de sélection de celles-ci, avec comme conséquence l'apparition de mutations permettant à un grand nombre de bactéries de survivre aux traitements. Ceci est particulièrement le cas pour PA, dont la résistance a été généralisée à toutes les classes d'antibiotiques.³ Les antibiotiques les plus utilisés contre PA peuvent être regroupés en 3 classes :

1. **Les β -lactamines** comprennent entre autres les pénicillines et les céphalosporines. Ces deux types de β -lactamines vont bloquer la synthèse des peptidoglycanes de la paroi bactérienne en se liant à des protéines membranaires. Ces antibiotiques sont surtout utilisés dans le cas de maladies nosocomiales et d'infections graves, car PA est capable de produire beaucoup d'enzymes appelées β -lactamase, dont le rôle est d'hydrolyser les β -lactamines et ainsi neutraliser leur activité antibactérienne.^{14,27}
2. **Les aminoglycosides** sont des molécules antibactériennes dont le mode d'action est de se lier aux ribosomes de la bactérie, et perturber la lecture du code génétique. Ainsi, des protéines défectueuses sont synthétisées, provoquant la mort de la bactérie. Cet antibiotique présente de plusieurs défauts, notamment une toxicité à haute dose. De plus, PA a développé plusieurs techniques de résistance. La production accélérée d'enzymes, capables d'empêcher les molécules de se fixer sur le ribosome et un système de pompes à efflux très efficace, font partie des principaux mécanismes de résistance.^{14,27}

3. **Les quinolones**, et plus particulièrement les fluoroquinolones, visent à entraver la réplication de la bactérie en inhibant l'élongation de son ADN. Notons que les effets indésirables peuvent être graves à haute dose, comme de provoquer des effets neuropsychiques ou des hépatites. La résistance de PA aux quinolones fait suite à ses substitutions d'acides aminés aux points de fixation de la molécule, empêchant l'inhibition de la réplication. De plus, les pompes à efflux jouent, là aussi, un rôle important dans le phénomène de résistance à ce type d'antibiotique.¹⁴

C'est pour ces raisons que tous ces antibiotiques ne sont jamais utilisés seuls pour éviter l'apparition et la généralisation des souches résistantes. De nombreuses thérapies alternatives sont également à l'étude afin de diminuer la résistance globale de PA.

ii. Autres traitements

L'augmentation de la multirésistance de PA explique la multiplicité et la diversité des recherches pour trouver un traitement qui puisse être efficace, engendrer le moins de résistance possible, et être administrable à tous les types de patients.

En 2017, il n'y avait pas de vaccin contre PA au stade des essais cliniques. Cependant, des pistes ont été explorées pour des vaccins basés sur certains antigènes libérés par la bactérie, à l'instar du vaccin antitétanique, ou basé sur les bactéries elles-mêmes.²⁸ Des études ont ainsi été menées sur les LPS, le flagelle, les protéines membranaires (comme les adhésines), les *pili*, les systèmes de sécrétion des exotoxines, ou encore sur des cellules de PA mortes ou atténuées.^{14,28,29} Toutefois, les vaccins ne pourront pas être proposés à tous les patients susceptibles de subir une infection sévère par PA, car bien souvent ces patients sont dans un état ne permettant plus une vaccination, en raison de défenses immunitaires trop faibles par exemple.¹⁴

Différentes familles de traitements affectant l'intégrité de PA ou la croissance du biofilm sont également à l'étude, telles que les peptides antimicrobiens, les polyphénols, le traitement photodynamique, l'emploi de nanoparticules, la phagothérapie, ou encore l'immunothérapie.^{14,30}

Toutes ces techniques ne peuvent pas être utilisées seules, car elles ne sont pas assez efficaces ou pas encore assez développées. Ainsi, le traitement majeur contre PA reste le traitement par antibiotiques, malgré l'augmentation croissante de la multirésistance de cette bactérie.

3. Les lectines de *Pseudomonas aeruginosa*

Il est également possible de cibler les lectines de PA pour lutter contre l'infection. Cette partie présente d'abord les lectines, puis les différentes stratégies utilisées pour inhiber celles-ci à l'aide de glycoclusters.

a. Présentation des lectines de *Pseudomonas aeruginosa*

Les lectines sont des protéines d'origine non immunitaire, sans activité catalytique, et capables de se lier à des sucres de façon réversible. Il en existe chez les plantes, mais celles qui nous intéressent sont présentes à la surface de PA. Elles lui permettent de se fixer aux cellules épithéliales en se liant aux oligosaccharides présents sur l'épithélium. Elles sont donc des facteurs de virulence qui jouent un rôle majeur dans les infections par PA. Il existe deux types de lectines.³¹⁻³⁴

La première à avoir été découverte est **LecA** (aussi appelée PA-IL), qui est un tétramère de 51 000 g/mol comprenant un contre-cation Ca^{2+} par monomère. Cette lectine a une affinité et une sélectivité importante pour le D-Galactose. Il a été montré qu'elle était cytotoxique. La seconde lectine est **LecB** (ou PA-III), qui est, elle aussi, un tétramère de 47 000 g/mol, mais comprenant deux ions Ca^{2+} par monomère. Les sucres ayant le plus d'affinité avec elle sont le D-Mannose et le L-Fucose. Elle a été montrée comme ayant un effet sur la fréquence de battement ciliaire de cellules épithéliales, en le ralentissant fortement. Les structures de LecA et de LecB sont représentées sur la Figure 7.³⁵⁻³⁷ Ainsi, il apparaît pertinent de lutter contre PA en inhibant ses deux lectines, en les mettant en compétition avec des ligands composés de galactose et de fucose.³⁸

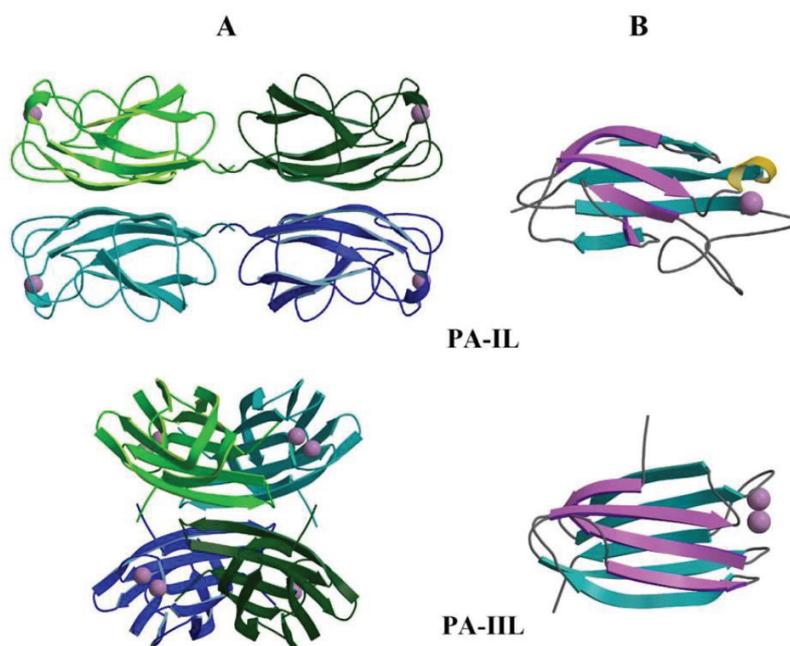


Figure 7 - Structures cristallines de PA-IL (LecA) et de PA-III (LecB). A) Tétramères, B) Monomères. Les sphères roses correspondent aux ions Ca^{2+} . Tirée de Imberty *et al.*³⁵

b. Les stratégies d'inhibition des lectines

Étant donné que l'ajout de sucres permet l'inhibition des lectines, cette stratégie rend possible la réduction de leur cytotoxicité, une diminution de la quantité de bactéries et de leur dissémination, et ainsi, une augmentation du taux de survie à une infection à PA.³⁴ Hauber *et al.*³³ ont montré que l'inhalation de solutions de fucose ou de galactose à des patients atteints de mucoviscidose permettait de réduire le nombre de PA, et avait un effet synergique avec des antibiotiques, tout en restant sans danger.

Par ailleurs, un effet, nommé « cluster de glycoside », révèle que l'affinité des lectines pour ces sucres est supérieure si les ligands proposés sont multivalents.^{31,36} La valence optimale de ces clusters de sucres, ainsi que leur structure, ont été largement étudiées par les groupes de Imberty³⁹ et de Vidal.^{39,40} Concernant la valence optimale, les clusters tétravalents sont certes ceux ayant le plus d'affinité avec les lectines, mais des résultats satisfaisants ont été également obtenus avec des clusters divalents ou trivalents. Concernant la structure optimale, de nombreuses études ont également été menées (Figure 8),⁴¹ menant à des glycoclusters (pouvant présenter un noyau de micro-réseau d'ADN⁴² ou de calixarène,^{40,43} des bras « espaceurs » de flexibilité et d'hydrophilie variables,⁴⁴ différents sucres en épitopes,^{39,45} ou encore des propriétés de fluorescence⁴⁶), mais également les glycodendrimères,^{47,48} les glycopolymères,³¹ et les glyconanoparticules,³¹ ont été considérés. Il en

ressort que les meilleurs ligands sont les dendrimères et les calixarènes, avec des bras « espaceurs » plutôt rigides permettant une bonne affinité avec les lectines. Notons d'ailleurs que certains ligands permettent de se lier simultanément à LecA et à LecB.⁴⁵

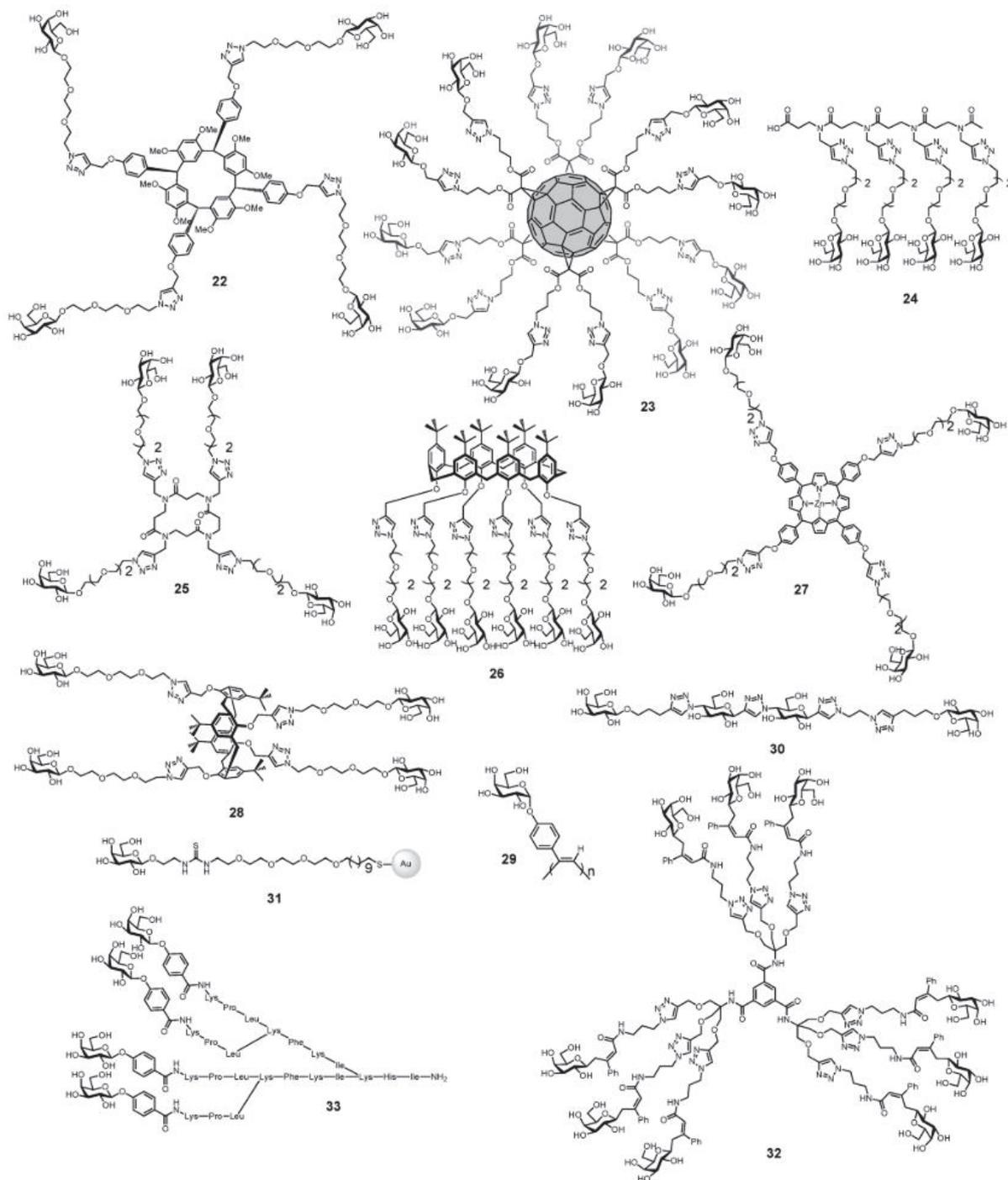


Figure 8 - Exemples de molécules glycoconjuguées ayant une forte affinité pour la lectine LecA. Tirée de Bernardi *et al.*⁴¹

4. Conclusion

Cette partie axée sur le contexte biologique et les enjeux sanitaires liés à PA a permis de montrer l'importance de la recherche de nouvelles solutions thérapeutiques contre des bactéries hautement multirésistantes, comme la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Sa résistance contre les antibiotiques provient de son génome mais également de son mécanisme d'infection avec, par exemple, la création d'un biofilm sur la surface des poumons. L'adhésion de PA aux cellules épithéliales et à la matrice d'oligosaccharides du biofilm est possible grâce à ses protéines de surface, les lectines (LecA et LecB). Celles-ci ont une affinité importante pour le galactose et le fucose/mannose, respectivement. Ainsi, il est possible de synthétiser des glycoclusters portant ces sucres en épitopes et présentant une bien meilleure affinité pour les lectines, causant l'inhibition de celles-ci. Des glycoclusters de structure et de valence variées ont été rapportés dans la littérature et ont montré des constantes d'association élevées pour les lectines.

II. La chimie combinatoire dynamique

La chimie combinatoire dynamique (CCD) est un procédé chimique permettant de synthétiser un grand nombre de molécules en peu d'étapes. Dans les paragraphes qui suivent, cette forme de synthèse sera d'abord présentée d'un point de vue historique, en opposition avec sa « cousine » statique, puis son principe, son utilisation, et ses limites seront abordés plus en détail. Enfin, les principaux polymères impliquant ce type de chimie seront mentionnés, ainsi que leurs principales applications.

1. Introduction

a. La chimie combinatoire « statique »

La chimie combinatoire « statique », instaurée au début des années 1990, est une forme de synthèse chimique permettant d'obtenir un grand nombre de molécules différentes en un seul procédé, à travers par exemple une synthèse divergente. L'idée est de partir d'un précurseur et de lui faire subir plusieurs réactions chimiques successives avec des briques moléculaires différentes, à l'instar de la synthèse d'acides nucléiques à partir de nucléotides, mais en remélangeant les molécules obtenues (Figure 9). L'objectif est ainsi de créer la plus grande diversité moléculaire possible avec peu de réactions, ce qui est particulièrement pertinent pour des tests de criblage. Ainsi, une protéine dont on chercherait une molécule inhibitrice serait introduite dans une solution contenant toutes ces populations, et si une espèce présente propose une combinaison permettant une affinité suffisante envers cette protéine, alors il suffirait de l'identifier et d'affiner le criblage à partir de sa structure.⁴⁹

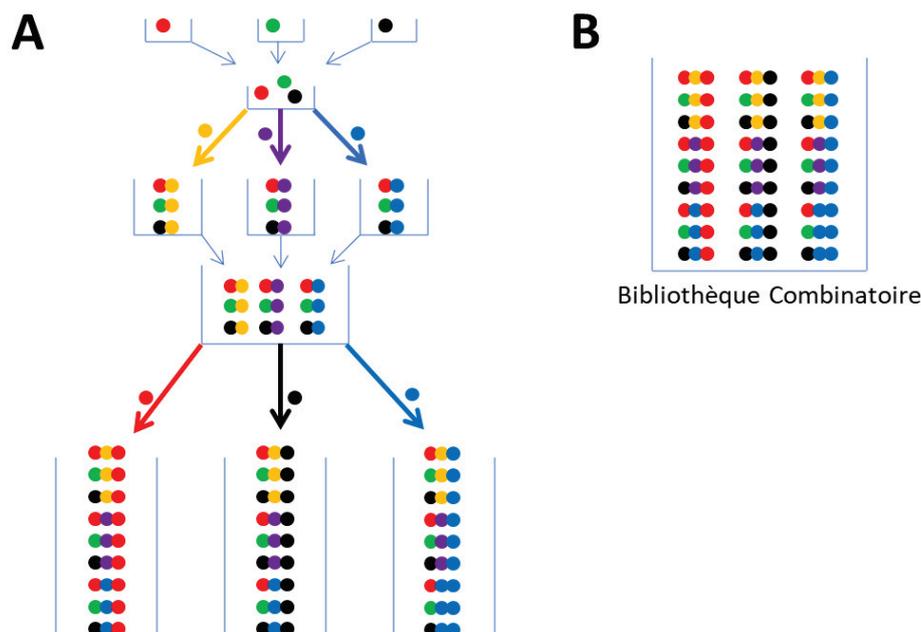


Figure 9 - Représentation schématique de la préparation d'une bibliothèque moléculaire avec le procédé de chimie combinatoire « statique ». À partir de deux séries de réactions (A), le nombre d'espèces obtenues, la taille de la bibliothèque combinatoire statique est déjà conséquente (B).

Cependant, ces larges populations obtenues sont aussi ce qui limite la chimie combinatoire, notamment en raison de la difficulté à identifier ou isoler toutes les molécules synthétisées. En effet, la concentration de chaque espèce diminue à mesure que la diversité de populations augmente, et peut ainsi atteindre la limite de détection. De plus, les structures des composés étant souvent très similaires, la séparation peut être ardue.^{49,50}

b. La chimie combinatoire dynamique

C'est dans cette optique que Lehn et Sanders⁵¹⁻⁵³ ont cherché à développer la **chimie combinatoire dynamique** (CCD) dans le milieu des années 1990. Celle-ci diffère de la chimie combinatoire « statique » par ses populations qui sont soumises à un équilibre thermodynamique à partir de l'introduction des briques moléculaires qui les composent. Cet équilibre thermodynamique peut être déplacé en faveur d'une ou plusieurs espèces à l'aide de *stimuli* chimiques ou physiques qui créeront un puits thermodynamique, poussant les constituants à se réorganiser pour minimiser l'enthalpie libre totale du système. Ainsi, certains problèmes qui limitent la chimie combinatoire « statique » sont ici en partie résolus. En effet, les espèces les plus stables seront amplifiées après l'ajout d'un *stimulus*, et l'identification de celles-ci sera plus aisée car ce sont celles qui sont,

théoriquement, les plus concentrées. Cela résout aussi le problème de la séparation, puisqu'ici cette étape n'est plus nécessaire.^{50,54-56}

La CCD peut être utilisée dans des applications très variées, pouvant ainsi servir à créer des architectures moléculaires complexes, à effectuer un screening de ligands, à trouver des catalyseurs pertinents, à préparer des matériaux avec des propriétés adaptatives, à déterminer des espèces aptes à vectoriser des médicaments, à modifier la structure ternaire de protéines, ou encore à créer des sondes moléculaires pour la détection d'espèces organiques ou inorganiques.⁵⁵⁻⁵⁸

2. Principe de la chimie combinatoire dynamique

a. Description du mécanisme

Comme énoncé précédemment, la CCD est une chimie combinatoire sous contrôle thermodynamique. Dans ce procédé de synthèse, la réaction n'est pas contrôlée cinétiquement comme au cours de la chimie classique, et les réactions sont toutes réversibles, menant ainsi à un équilibre permanent entre les différents produits.

En prenant comme exemple une réaction $A \rightleftharpoons B + C$, comme illustrée sur la Figure 10, les proportions finales de B et C diffèrent selon le contrôle utilisé (cinétique ou thermodynamique). Une réaction contrôlée cinétiquement donnerait C en produit majoritaire, car les paramètres déterminants sont les énergies d'activation E_A (B) et E_A (C). Dans le cas de la CCD, les réactions sont sujettes à la stabilité thermodynamique des produits, toutes les réactions utilisées étant réversibles. Ainsi, les paramètres définissant le produit majoritaire seront les variations d'enthalpie ΔG (B) et ΔG (C). Le produit majoritaire serait donc B.⁵⁰

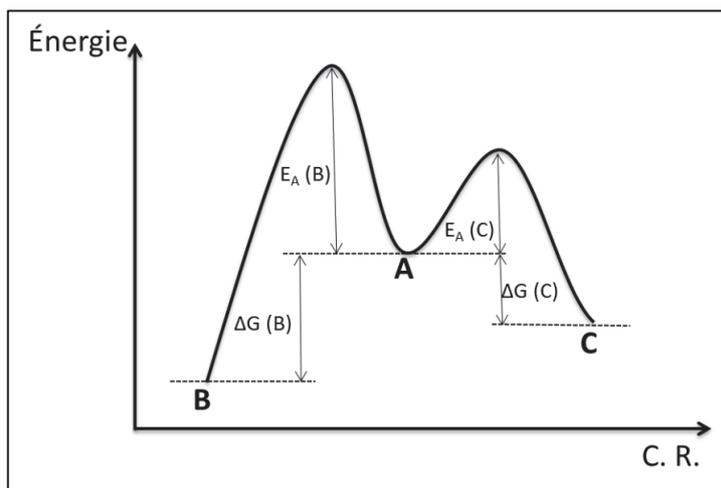


Figure 10 - Coordonnées réactionnelles d'une réaction $A \rightleftharpoons B + C$, adaptée de Rowan *et al.*⁵⁰

En s'inspirant de ce principe basique, le procédé de CCD s'utilise en mélangeant toutes les briques moléculaires, les composants de base, en solution, et en laissant l'équilibre thermodynamique être atteint. L'ensemble de ces composés est appelé **bibliothèque combinatoire dynamiques** (BCD, ou DCL en anglais pour *dynamic combinatorial library*). Un *stimulus* (ou « template ») physique (*e.g.*, changement de température, contrainte mécanique, champ électrique, irradiation) ou chimique (*e.g.*, changement de pH ou du potentiel redox de la solution, de solvant, introduction d'ions, de métaux, d'espèces organiques, de biomolécules) va ensuite déplacer l'équilibre de la BCD vers les composés les plus stables dans ces conditions. Il faut ensuite « geler » l'équilibre pour conserver les proportions relatives de chaque espèce, et comparer la BCD avant et après l'application du *stimulus* (Figure 11). Ce « gel » de l'échange des briques moléculaires peut-être un changement de conditions sortant du domaine de réversibilité (*e.g.*, changement de pH, de température, de solvant) ou une réaction irréversible (par exemple le passage d'imines à des amines).^{49,56,57,59}

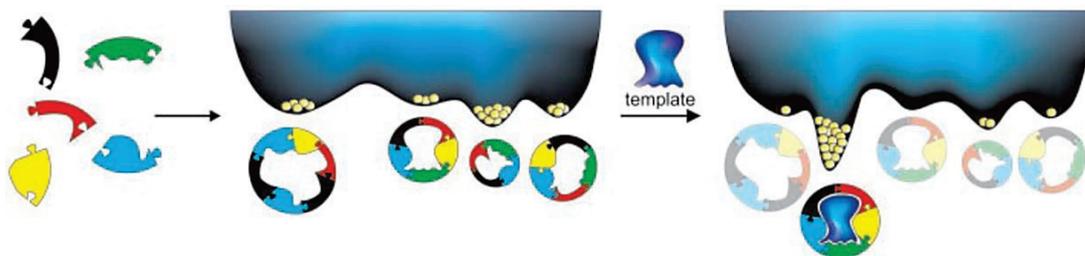


Figure 11 - Représentation schématique du principe de la chimie combinatoire dynamique, avec (de gauche à droite) l'ajout de briques moléculaires comportant des fonctions capables de former des liaisons réversibles, qui vont se combiner en de nombreuses molécules stables (de préférences isoénergétiques) par équilibre thermodynamique, puis un « template » (= *stimulus*) va être introduit et déplacer l'équilibre de la bibliothèque vers la combinaison la plus stable (qui peut ne pas être détectable avant l'introduction du « template »). D'après Otto *et al.*⁵⁹

Les espèces qui ont vu une augmentation de leur concentration ont ainsi été amplifiées, et il est ainsi possible de calculer un facteur d'amplification AF à partir des concentrations relatives d'une molécule A avant et après le *stimulus* (**Équation 1**). Dans le cas où la molécule A formerait un complexe avec un « template » moléculaire externe T, il faudrait aussi prendre en compte la concentration de celui-ci, ce qui correspond à l'**Équation 2**, qui est une forme plus générale de l'Équation 1.⁵⁷

Équation 1

$$AF = \frac{[A]_{BCD \text{ perturbée}}}{[A]_{BCD \text{ originale}}}$$

Équation 2

$$AF = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=0}^m [A_i T_j]_{BCD \text{ perturbée}}}{[A]_{BCD \text{ originale}}}$$

b. Bibliothèques combinatoires dynamiques

i. Description

On appelle « bibliothèque combinatoire dynamique » ou BCD l'ensemble des possibilités de combinaison des composés introduit dans la solution en CCD. En d'autres termes, il s'agit de toutes les molécules pouvant résulter de combinaisons entre les réactifs initiaux. Elle peut également être décrite sous le nom de « bibliothèque combinatoire virtuelle », où le terme « virtuel » (BCV), introduit par Jean-Marie Lehn, implique que des combinaisons peuvent ne pas exister (ou ne pas être détectables) dans certaines conditions réactionnelles, et apparaître dans d'autres.⁴⁹ Le terme « virtuel » correspond donc à une possibilité d'apparition rendue possible grâce à la réversibilité du système. Une analogie avec la théorie de l'évolution peut être établie, où la BCV serait l'ensemble des espèces actuelles et des espèces futures, comprenant également les espèces qui ne verront jamais le jour, car les pressions de sélection n'étaient pas adaptées à leur apparition.⁴⁹

Le nombre de molécules dans la BCD dépend du nombre de liaisons différentes et de briques moléculaires pouvant s'y combiner. Par exemple, Sarma *et al.*⁶⁰ ont développé une réaction de CCD où la diversité était créée à partir de trois liaisons différentes et orthogonales : disulfide, imine, et de coordination sur un métal. Ainsi, le nombre de molécules finales correspond à la multiplication des combinaisons possibles sur chaque type de liaison.

ii. Diversité à travers la réversibilité de la formation de liaisons

Les réactions réversibles sont à la base de l'aspect dynamique de la CCD. Les liaisons éligibles doivent remplir plusieurs critères. Elles doivent être réversibles dans des conditions douces, entre autres pour ne pas risquer de détériorer le « template ». De plus, elles doivent posséder un domaine de stabilité en solution afin de pouvoir effectuer le verrouillage des molécules, et ainsi réduire l'échange de fonction de manière significative.⁴⁹ Ces liaisons peuvent être soit covalentes, on parlera alors de liaison moléculaire, soit non covalentes, elles sont aussi nommées liaisons supramoléculaires.

Parmi les nombreuses liaisons covalentes réversibles pouvant convenir pour la CCD, nous pouvons citer les fonctions dérivées d'un carbonyle (comme les esters, amides, acétals, hémiacétals), d'une imine (imines, oximes, hydrazones, acylhydrazones, nitrones), de liaisons carbone-soufre ou soufre-soufre (thioesters, thioacétals, disulfides). D'autres fonctions peuvent également servir de liaisons réversibles covalentes, telles les liaisons carbone-carbone simples, doubles ou triples à travers les réactions de métathèse, de Diels-Alder, de photodimérisation [2+2] ou de condensation de Michael, mais aussi les liaisons carbone-hydrogène à travers les réactions de tautomérie. Les esters de borate sont également réversibles et utilisables dans le cadre de la CCD. Les liaisons réversibles covalentes ont l'avantage d'être plus fortes, menant à des molécules finales plus robustes, mais sont également moins labiles.^{49,57,61-66}

Les liaisons non covalentes peuvent également être utilisées en CCD, car elles sont naturellement réversibles. Ces liaisons sont plus fragiles que les liaisons covalentes, mais également plus labiles et donc plus susceptibles de s'échanger des composés. Elles peuvent être des liaisons faibles, comme les liaisons hydrogène ou les interactions de Van der Waals, ou d'une autre nature, comme les liaisons de coordination métal-ligands, les liaisons donneur-accepteur ou le π -stacking.^{49,57,66,67}

Ces différentes liaisons peuvent être combinées pour apporter plus de diversité. Il est ainsi possible de multiplier les interactions et les possibilités de combinaisons en introduisant plusieurs types de liaisons réversibles, avec des domaines de réversibilité et de stabilité différents.

iii. Diversité conformationnelle

La diversité des molécules finales peut également provenir d'un aspect conformationnel. Les changements de conformation entre des états suffisamment proches en énergie, comme des rotations internes ou des inversions de cycle, peuvent donner spontanément des molécules différentes qui

peuvent être plus adaptées thermodynamiquement au « template ». Des exemples peuvent être des inter-conversions cis-trans, ou encore un changement de structure tertiaire des protéines.⁴⁹ Par exemple, Ten Cate *et al.*⁶⁸ observent la formation préférentielle du composé méso autour d'une liaison disulfide. Il a également récemment été montré que des composés diastéréoisomères pouvaient apparaître à partir de mélanges racémiques, à travers la synthèse divergente de [2]-catenanes.⁶⁹

iv. Biais dans les BCD

La chimie combinatoire dynamique apparaît donc comme un outil de choix pour l'identification de ligands ou la formation d'architecture complexe. Il existe cependant un certain nombre de paramètres à maîtriser afin d'éviter la présence de biais dans la BCD, qui peuvent fausser les résultats.

Un paramètre important à prendre en compte est que les molécules finales de la BCD doivent être *a priori* isoénergétiques. Cela a pour principal intérêt de ne pas biaiser les proportions des produits en raison de quelques molécules favorisées pour d'autres raisons que le *stimulus* introduit, mais également pour ne pas fausser le calcul du facteur d'amplification AF, dont la valeur est fiable si les composés sont quasi-isoénergétiques. Il paraît également évident que la différence d'enthalpie entre l'état de initial et l'état final souhaité doit être négative, pour que les changements de composition aient lieu.^{50,57}

L'effet agoniste fait également partie de ces biais. Celui-ci indique que, dans une BCD, si une combinaison particulière de briques moléculaires est amplifiée, alors la combinaison des briques moléculaires « opposées », *i.e.* celles qui ne font pas partie de la combinaison privilégiée, est également favorisée, par simple effet de concentration relative des composés. Ainsi, une BCD composée de 5 briques A_1 , A_2 , A_3 , B_1 et B_2 , et dont l'introduction d'une protéine favoriserait la formation du composé A_1 - B_2 , verrait également l'augmentation de la concentration des combinaisons A_2 - B_1 et A_3 - B_1 .^{57,70}

Il est important de s'assurer d'autres aspects essentiels de la CCD. La confirmation que l'équilibre est bien atteint est primordiale, et la méthode la plus commune pour cela est de partir de deux points de départ différents et de s'assurer que les BCD obtenues soient les mêmes. La concentration des briques moléculaire est également importante, car dans le cas où celles-ci seraient utilisées pour former des polymères, la formation de petits macrocycles serait favorisée presque exclusivement à faible concentration (*i.e.* théorie de Jacobson-Stockmayer⁷¹), tandis qu'au-dessus d'une concentration critique, la quantité de petits macrocycles reste constante. De plus, il est également possible que certains membres de la BCD servent de « template » à la même BCD,

provoquant une auto-amplification de combinaisons. Enfin, si le nombre de briques moléculaires est trop élevé, et par pure probabilité, les espèces hétéromériques seront privilégiées par rapport aux homomériques.⁵⁵⁻⁵⁷

Une manière commune de contrer ces biais est de déconvoluer la BCD en préparant des sous-bibliothèques avec une brique moléculaire manquante, et en comparant les facteurs d'amplification AF de chaque espèces dans chaque bibliothèque.⁵⁶

3. Les dynamères

a. Description, avantages et limites des dynamères par rapport aux polymères non dynamiques

Les dynamères (pour *DYNAMIC polyMERS*) sont des polymères contenant des liaisons réversibles, et sont ainsi capables de s'adapter ou d'évoluer par des *stimuli* chimiques ou physiques. Jean-Marie Lehn fait la distinction entre les **dynamères moléculaires** (avec des liaisons covalentes réversibles) et les **dynamères supramoléculaires** (avec des liaisons non-covalentes), tout en précisant qu'il existe des dynamères utilisant ces deux types de liaisons pour former des polymères doublement dynamiques.⁷²⁻⁷⁹

Le principal atout de ces dynamères par rapport aux polymères « statiques » est qu'ils peuvent changer de constitution en fonction des *stimuli* reçus. Ainsi, leur composition, leur degré de polymérisation, et leur masse molaire moyenne sont tous dynamiques. Ils peuvent aussi présenter plusieurs types d'architecture (Figure 12), qui leur confèrent des propriétés différentes.^{57,72,80}

La principale limite de ces dynamères par rapport aux polymères non dynamiques est la difficulté de les isoler car, étant dynamiques par nature, la synthèse, la caractérisation et les applications doivent être bien pensées en amont.^{72,76}

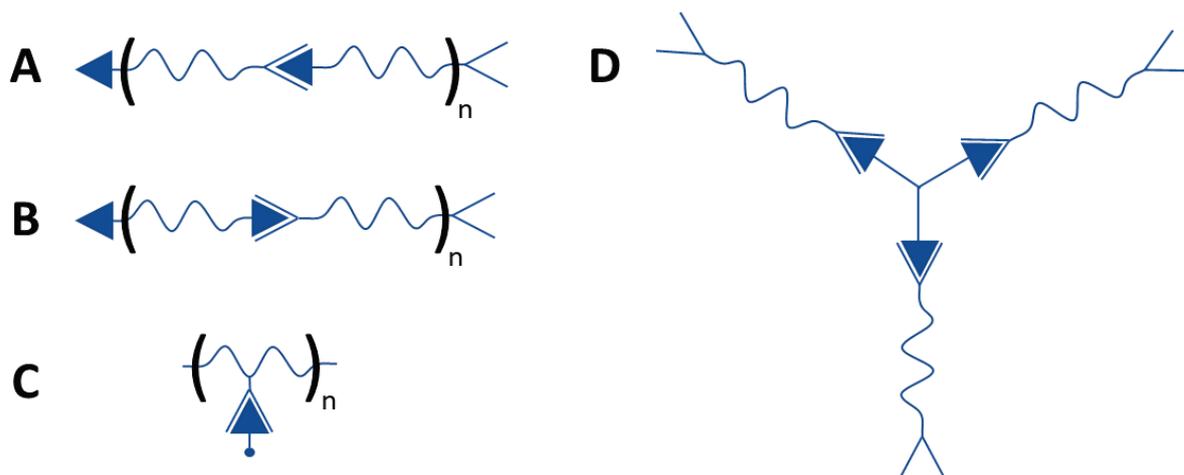


Figure 12 - Différentes structures de dynamères : A) homomérique, B) hétéromérique, C) avec des chaînes pendantes, qui peuvent porter une fonction d'intérêt ou servir à la réticulation du réseau polymère, D) dendrimérique. D'après Zhang *et al.* et Lehn.^{72,80}

b. Propriétés et applications des dynamères

Les dynamères peuvent ainsi réagir à des *stimuli*, et cette propriété peut être établie en jouant sur i) la structure même du dynamère (linéaire, branché, hyperbranché) et de l'état de l'assemblage polymérique (gel, film, solution), et ii) la nature des liaisons dynamiques (les plus couramment utilisées pour les dynamères sont les alcoxyamines, l'interconversion par Diels-Alder, les esters, les disulfides, les esters de borate, les imines, les oximes, les hydrazones, et les acylhydrazones).^{57,73,81}

Ainsi, il existe des dynamères thermoréactifs, qui possèdent des températures critiques de solution ou des liaisons thermolabiles (telles des alcoxyamines ou des liaisons basées sur la réaction de Diels-Alder). Ainsi, astucieusement, ceux-ci peuvent permettre une auto-cicatrisation de films par simple changement de température, ou une recyclabilité en passant facilement d'un film à un liquide visqueux.^{57,62,76} Les propriétés mécaniques de ces films de dynamères pouvant également être dépendantes des conditions extérieures, ce comportement auto-cicatrisant peut se produire simplement en mettant en contact des parties déchirées d'un film. Cela a été montré comme permettant ainsi de revenir aux propriétés mécaniques initiales (Figure 13), ou encore en combinant plusieurs types de monomères pour obtenir des films résistants ou flexibles en fonction de leur incorporation.^{74,76,82}

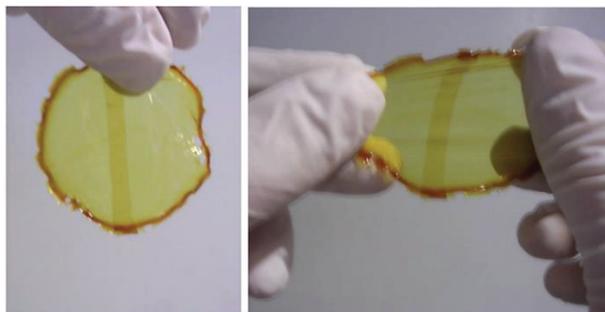


Figure 13 - Film auto-cicatrisant à partir de dynamères, faisant intervenir des réactions de Diels-Alder réversibles. D'après ces images, les propriétés mécaniques sont restaurées après superposition des deux moitiés du film coupées.⁷⁶

Il est également possible de synthétiser des dynamères pH- et chimio-réactifs, en utilisant des fonctions chimiques sensibles au pH comme les liaisons acylhydrazone, imine, oxime, ou disulfide. Cette catégorie comprend des polymères capables de vectoriser des principes actifs, de s'auto-assembler en ligands pour des protéines ou des métaux, mais également des polymères réticulés capables de se transformer réversiblement d'un sol à un gel, ou de libérer des molécules bioactives en modifiant le pH.^{57,72,89,80,82-88} D'une manière semblable, des dynamères photo-réactifs à travers des réactions de photo-dimérisation [2+2], ou capables de changer de propriétés optiques, ont également été étudiés (Figure 14).^{57,72,90,91}

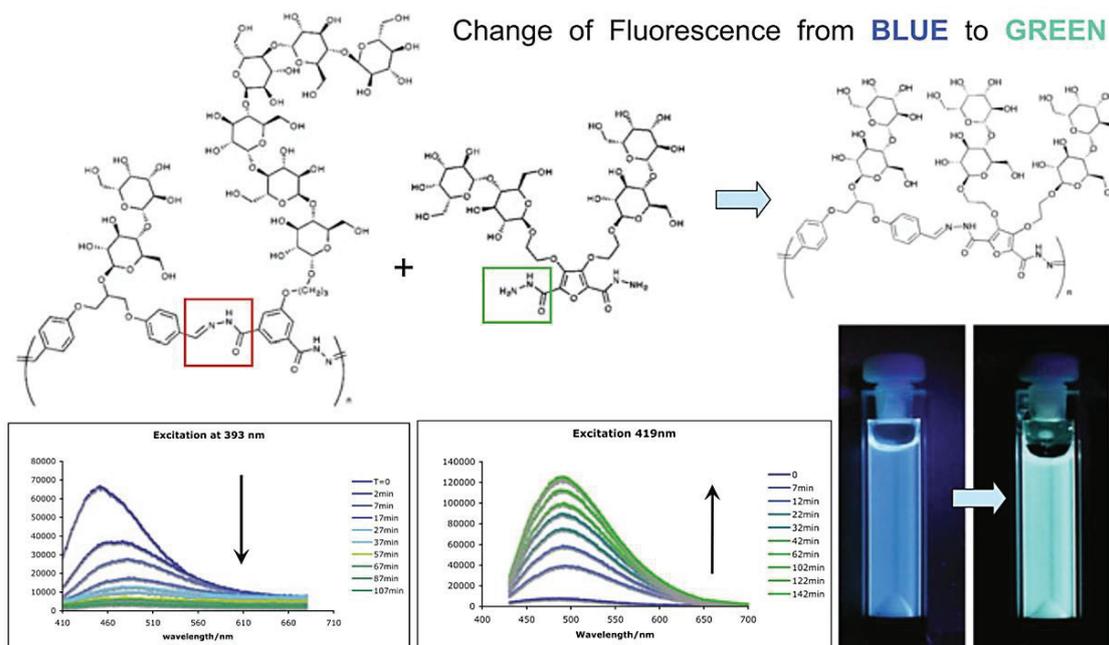


Figure 14 - Changements optiques suite à un échange de dihydrazide dans le dynamère (en haut), caractérisés par l'évolution des spectres d'émission en fonction du temps et de la longueur d'onde d'excitation (en bas).⁷⁴

Les fonctions dynamiques des dynamères peuvent également être utilisées dans des conditions moins stables, permettant leur hydrolyse. Ce genre de dynamères « verts » a notamment été étudié par le groupe de Lehn en utilisant l'instabilité hydrolytique des imines pour en faire des polymères biodégradables.^{72,76,81,92}

c. Méthodes de caractérisation des bibliothèques combinatoires dynamiques

Les méthodes de caractérisation des BCD de dynamères sont sélectionnées en fonction des propriétés dynamiques visées.^{56,57,59,63,84,93,94} Néanmoins, les plus utilisées sont la spectroscopie RMN (1D ou 2D, avec la possibilité d'utiliser la séquence nommée « *Saturation-Transfer-Difference NMR* » pour la recherche de ligands de protéines), la spectrométrie de masse (avec comme source d'ions l'ESI ou la MALDI, couplée ou non à une technique de séparation préalable telle que la chromatographie liquide), la spectroscopie UV-Visible, et enfin, la chromatographie (HPLC, UHPLC, SEC, GC) couplée à différents détecteurs (LS, UV, RI, MS). Dans certains cas d'assemblages de dynamères, il est même possible d'utiliser différentes microscopies (MET, AFM, ou METB), des techniques de diffraction et de diffusion (XRD, SAXS, SANS, DLS), des techniques de caractérisation de la solubilité, et enfin des mesures de viscosité.

4. Conclusion

Développée il y a moins de vingt ans par Jean-Marie Lehn et Jeremy Sanders comme une alternative à la chimie combinatoire « statique », la chimie combinatoire dynamique offre de nombreuses promesses, notamment sur l'optimisation du criblage de molécules bioactives comme des ligands pour des protéines (nommée dans ce cas : « *target-directed-dynamic-combinatorial chemistry* »). Cependant, son application dans ce domaine n'est pas si triviale.

Le champ d'application de la CCD comprend également la recherche de ligands pour des métaux (qui peuvent aussi être valorisés en tant que molécules bioactives), la confection de films auto-cicatrisants, le stockage d'information, ou encore la recherche de nouveaux catalyseurs.

Pour fonctionner correctement, la CCD fait appel à des liaisons réversibles, qui peuvent être non-covalentes (*e.g.* métalliques, liaisons hydrogènes, van der Waals) ou covalentes (dans ce cas, ces liaisons doivent présenter un domaine de réversibilité et de stabilité). Au sein de toutes les fonctions

covalentes disponibles, une des plus étudiées, pour son domaine de réversibilité et sa biocompatibilité, est la fonction acylhydrazone. La partie suivante, correspondant à une revue récemment publiée dans *Macromolecular Chemistry and Physics*, se concentre sur les (poly)acylhydrazones solubles dans l'eau.

III. Water-soluble (poly)acylhydrazones: Syntheses and Applications (published review in *Macromolecular Chemistry and Physics*)

Pour aller encore plus loin dans la description de la chimie combinatoire et de la fonction acylhydrazone, les paragraphes suivants concernent la synthèse et les applications de (poly)acylhydrazones hydrosolubles, présentés sous la forme d'une revue, récemment publiée dans *Macromolecular Chemistry and Physics*, et intitulée « (Poly)acylhydrazones hydrosolubles : Synthèses et Applications » en français (DOI : 10.1002/macp.202200064).

1. Abstract

Acylhydrazone-based (macro)molecules display an increasingly broad spectrum of applications, from small therapeutic molecules and metal-ions probes to self-healing films and biorelevant dynamic polymers. The acylhydrazone function is indeed of prime interest since its unique design combines hydrogen bonds, pH-dependent reversibility, ability to undergo molecular exchanges, and a possible polyvalency. However, a key parameter of its use in aqueous media is the associated water-solubility of the resulting (macro)molecule. This property can indeed become a limitation for applications requiring high concentrations or no organic cosolvent. This review firstly focuses on describing the acylhydrazone function, its properties, and its relevancy in dynamic combinatorial chemistry (DCC). Then it details the synthesis strategies (molecular design, cosolvent, reaction conditions) reported in literature to ensure a sufficient solubilization of both single-bond and multiple-bond acylhydrazone (macro)molecules, together with their various applications.

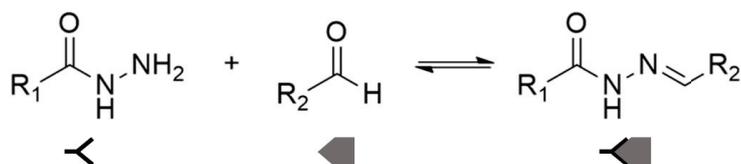
Keywords: Acylhydrazone; polyacylhydrazone; dynamic combinatorial chemistry; dynamer; water-soluble polymers

2. Introduction

In the past three decades, the increasing development of dynamic combinatorial chemistry (DCC) has led to new synthetic methodologies, to create even more diverse molecules in a minimum of steps.^{49,50,55,56} Among the eligible covalent bonds required for DCC, the hydrazone ones (and by extension the acylhydrazone ones) attracted attention thanks to their reversibility and their

biocompatibility^{72,84} More, polymers made of acylhydrazone bonds have been found to have very interesting properties, by being able to undergo monomer exchanges through adaptation to the medium according to DCC. These properties can lead to relevant therapeutic molecules, ion probes, self-healing films, or dynamic polymers.^{84,95,96}

However, one of the major limitations for the elaboration of acylhydrazone-based (macro)molecules is their poor water-solubility. To circumvent this limitation, many synthesis strategies have been developed. They are different whether the (macro)molecule bears a single acylhydrazone bond or multiple bonds (Figure 15). This distinction will be explained in further parts, in which synthesis strategies of single-bond and multiple-bond acylhydrazone (also named polyacylhydrazones) will be discussed, as well as their associated applications. But before exploring this, an introduction about this particular acylhydrazone function appears to us as pertinent. To this end, a description about its formation, its dynamic behavior, the catalysis of its formation, and a portfolio of (macro)molecular structures implying acylhydrazone bonds from organic solvent will be presented.

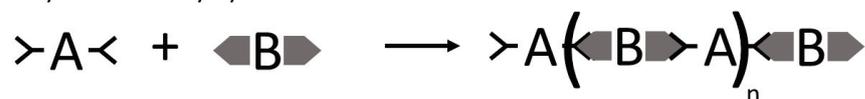


1) Single-bond acylhydrazone



2) Multiple-bond acylhydrazone (polyacylhydrazones)

Polymers with acylhydrazone functions in the main chain



Polymers with acylhydrazone functions in the side chains

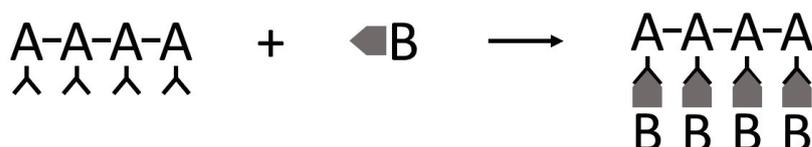


Figure 15 - Schematic representation of the acylhydrazone function synthesis from hydrazide and aldehyde building blocks, leading to 1) single-bond or 2) multiple-bond acylhydrazones.

3. Acylhydrazone function

a. Description of the acylhydrazone function

Dynamic bonds (covalent or non-covalent) are known to continuously form and break, depending on the conditions of the medium. Perpetrated by reversible bonds, a dynamic library of molecules can be created by a thermodynamic equilibrium between building blocks, where the most stable constituents are in larger quantities. This equilibrium can then be shifted through the addition of external *stimuli* (e.g. pH, temperature, external molecule). Hence, the amplification of some species informs about the products having the higher affinity toward the stimuli (Figure 16). The use of these reversible-bond building blocks to create polymers has also been exploited. The resulting dynamic polymers, whose length, constitution, and supramolecular arrangement strongly depend on the medium, are called *dynamers*. DCC of molecular or macromolecular species is of prime interest in many fields such as the drug discovery area.^{50,63,66,72,97}

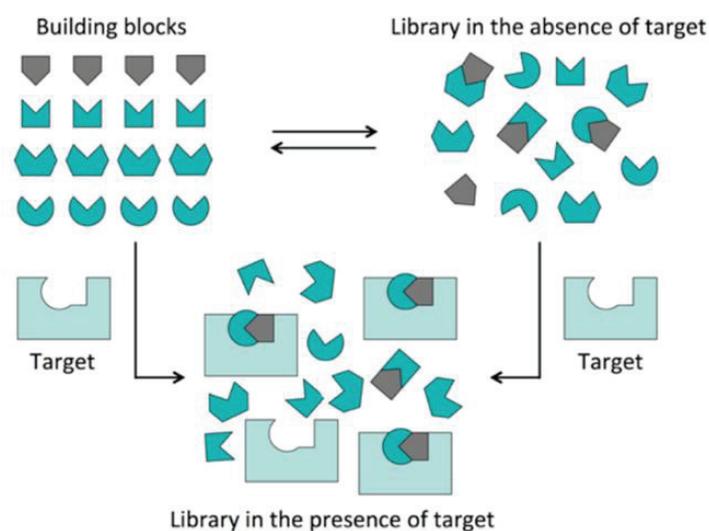


Figure 16 - Schematic representation of a DCC process and the reversible equilibrations of a building block library, depending on the presence of the target. From Frei et al.⁶³

Among the eligible dynamic functions to be used in DCC (which can be turned into supramolecular or covalent bonds), the aim of this review is to focus on the very interesting and well-known acylhydrazone family. Acylhydrazones can be synthesized through condensation between hydrazide and aldehyde moieties, displaying reversibility under mild conditions with acid catalysis. The condensation reaction to get acylhydrazones is presented on Figure 17, together with other imine bond types.^{50,59,74,81,97,98}

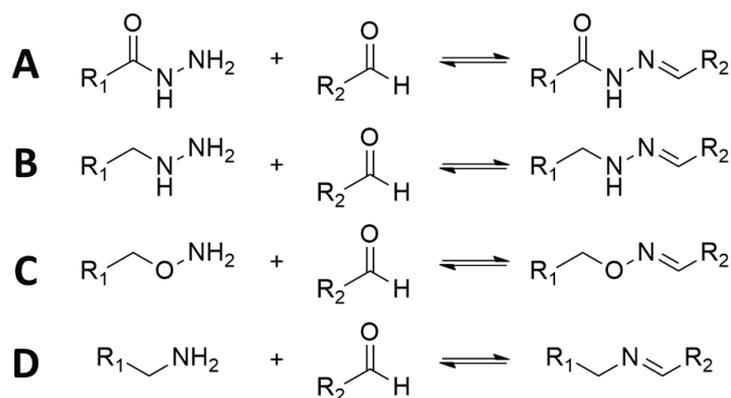


Figure 17 - Condensation leading to different imine-type bonds. A) Hydrazide and aldehyde giving acylhydrazone. B) Hydrazine and aldehyde giving hydrazone. C) Aminooxy and aldehyde giving oxime. D) Amine and aldehyde giving imine.

Compared to other C=N imine-type dynamic bonds, such as imines, oximes or hydrazones, acylhydrazone functionality displays many attractive features, having the advantages of both imine and amide groups.^{72,84} Indeed, hydrogen bonds can be performed thanks to C=O and NH groups, while C=N group provides reversibility. Furthermore, contrary to other types of imines, hydrazones are stable enough thanks to an enhanced electronic density on the carbon to analyze the resulting products.^{63,99} Hydrazones are also less affected by hydrolysis due to their extra nitrogen (enhancing the stability in water by making the “imine” nitrogen less able to be protonized).¹⁰⁰ Finally, an additional electron-withdrawing group such as an acyl group (compared to oximes and hydrazones) makes the resulting acylhydrazones not too stable to be interestingly used in dynamic libraries. It also increases the possibility of hydrolysis, which can be an asset in some situations.^{56,81,101}

The understanding of acylhydrazone hydrolysis is very important since it leads to the reversibility of the reaction. The mechanism of hydrazone hydrolysis was thoroughly studied by Yildiz¹⁰² through DFT calculations. The resulting conclusions are that the hydrazone (and by extension acylhydrazone) undergoes a water nucleophilic addition to give carbinolamine as intermediate species. Then, this carbinolamine is decomposed into hydrazide and carbonyl without any intermolecular proton transfer (Figure 18). The rate-determining step is the dissociation of the intermediate, but it was also demonstrated that the rate of hydrolysis depends on the ease of protonation of the “imine” nitrogen.⁹⁹

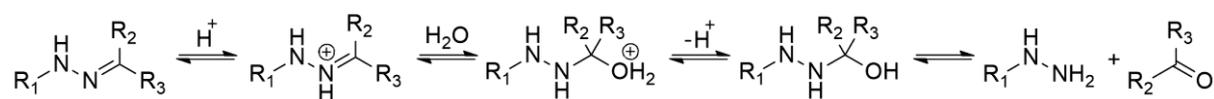


Figure 18 - Hydrolysis mechanism of hydrazone, proposed by Yildiz.¹⁰²

Note that another synthetic pathway was explored by Haugen *et al.*¹⁰³, which implies a ketone linked to an electron-withdrawing group, and diazene compounds, catalyzed by a phosphine (Figure 19). The yields were found to be correct to excellent, depending on the reactants. Because the reaction conditions are harsh (THF, -78 °C to rt in 1h), this way of synthesis will not be explored in this review.

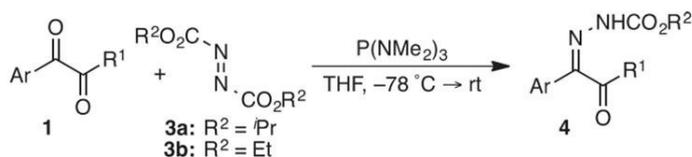


Figure 19 - Alternative acylhydrazone synthesis pathway, from Haugen *et al.*¹⁰³

Another remarkable property of the hydrazone bond (and by extension acylhydrazone) is its photosensitivity. Indeed, the configuration of its C=N double bond can be reversibly switched from (*E*)-isomer to (*Z*)-isomer upon UV irradiation (365 nm).^{57,104–106} More, it was showed that UV irradiation can also cleave the acylhydrazone bond, leading to photodegradable polymers.¹⁰⁷

The “classic” synthesis of acylhydrazones, from aldehyde and hydrazide, is well known to be very slow in neutral medium. Therefore, many works have been focused on the ways to increase this reaction rate and will be presented in the next part.

b. Catalysis of the acylhydrazone formation

Acylhydrazone function displays a reversibility property under acid catalysis, at mild conditions.^{56,84} This reversibility (also reachable by heating^{84,90}), allows hydrazide or aldehyde exchange (Figure 20B). Depending on the chemical nature of the molecule, the pH range of this reversibility state can vary from 3 to 7.⁸⁸ The rate of this exchange is indeed significantly decreased at pH > 7,⁸⁸ making the acylhydrazone a convenient and easily switchable bond through pH. This acid-sensitive property includes the possibility of developing pH-sensitive systems, usable for drug or fragrance delivery through the breaking of this acylhydrazone bond and the release of the drug under specific conditions.^{58,107–109} The mechanism of the hydrazone formation explaining this pH-catalysis is shown on Figure 20A. Fulton’s group focused on the mechanistic difference between the acylhydrazone formation (from aldehyde and hydrazide) and the exchange (between two different acylhydrazones), because the rate-determining step is, respectively, the β -elimination of the water and the nucleophilic attack on the protonated hydrazone.^{110–114}

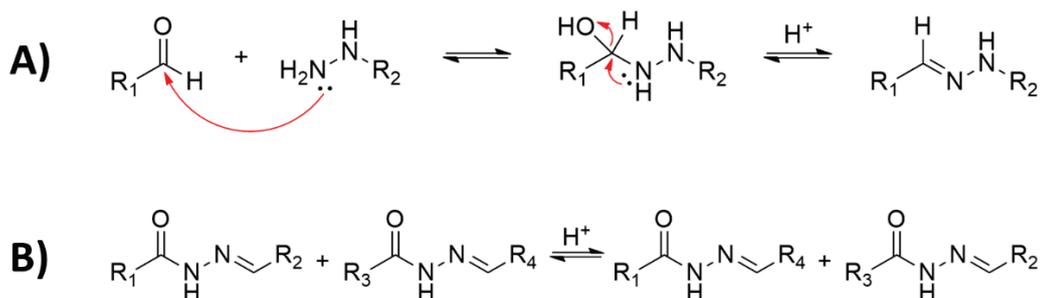


Figure 20 - A) Mechanism of the hydrazone formation, according to Jencks and Kool.^{110,111}
 B) Exchange properties of acylhydrazone in acidic medium.

Consequently, for dynamic biomedical applications that imply building blocks exchange, acylhydrazones are hardly usable in neutral biological buffers (pH=7.4) without catalysts, because of their low reversibility at this pH value. To enhance the acylhydrazone exchange velocity, the use of a trans-amination catalyst was developed, by using aniline (Figure 21).^{64,115,116} The observed second-order rate constant at biological pH (7.4) was found to be around 14-fold higher for aniline than for uncatalyzed reaction.¹¹⁷

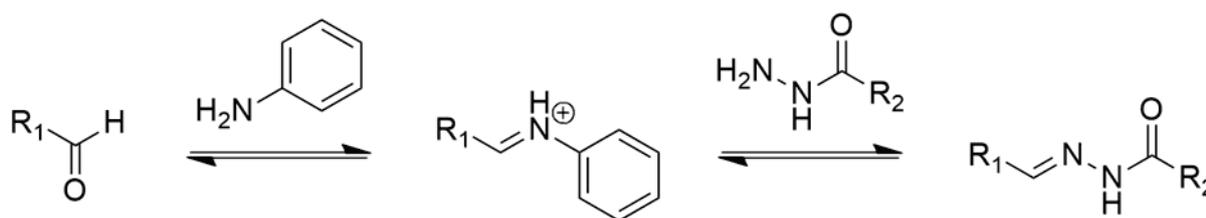


Figure 21 – Mechanism of the formation of acylhydrazone using aniline as a catalyst.¹¹⁵

Domaille and Cha used DNA-anchored aniline to catalyze a DNA-templated acylhydrazone reaction hydrazide and aldehyde, in physiological conditions (Figure 22).¹¹⁸

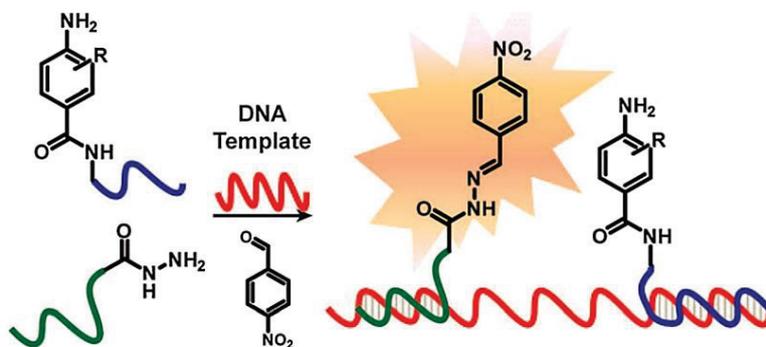


Figure 22 - DNA-anchored aniline for the catalysis of the condensation between DNA-termination hydrazide and aldehyde.¹¹⁸

Nevertheless, the use of aniline leads to many problems. Firstly, accelerating the reaction to reasonable time periods requires large amounts of catalyst (up to 10 000 eq). Secondly, aniline is toxic towards cells, which can be a problem if the targeted system is living.^{115,117} Finally, it was shown that the catalytic activity of aniline depends on the reactants, and therefore can become a bias for isoenergetic dynamic libraries.¹¹⁹

Based on these observations, Blanden *et al.*¹²⁰ found that 4-aminophenylalanine (Figure 23B) was almost as effective as aniline, but with a superior compatibility with biological systems. Moreover, the reaction temperature can be at 0°C, which can be an asset in some biological experiments. Kool's group^{117,121} then tried to improve the catalyst design based on aniline, for hydrazone formation and exchange instead of acylhydrazone, and have demonstrated that anthranilic acids can be a new class of catalysts for these functions. Particularly, 5-methoxyanthranilic acid (Figure 23C) and 5-methyl-2-aminobenzenephosphonic acid (Figure 23D) showed a second-order rate constant over 6-fold and 8-fold, respectively, higher than the aniline's one. This new class of catalysts is likely to be less toxic than aniline.

Other types of catalysts have been studied at neutral pH, such as an artificial enzyme featuring an aniline residue.¹²² More, an indoline-based catalyst, instead of an aniline-based one, has shown encouraging results, and the most performant one showed a 15-fold rate increase *versus* aniline (Figure 23E).¹²³ Morales *et al.*¹²⁴ used pyrrolidine (10 mol%) as a catalyst in water, obtaining a high yield, and therefore paving the way for more green-chemistry-compatible catalysts (Figure 23F).

Larsen *et al.*¹²⁵ developed a series of aqueous buffers that can also play the role of catalysts. The most performant molecules bear several amine groups, and reaction rates more than 200-fold rates of phosphate buffer alone were demonstrated. Furthermore, these catalyzing buffers showed a low toxicity, and therefore can be used for biological reactions of acylhydrazones.

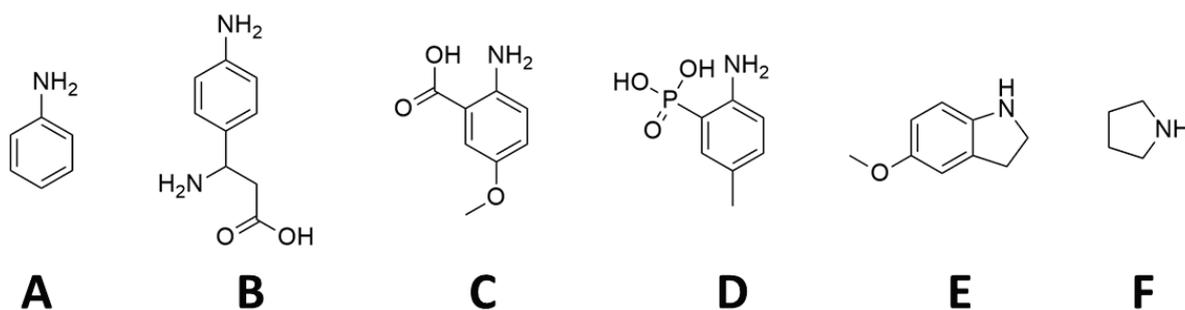


Figure 23 - Different generations of catalysts to increase the reaction rate in neutral conditions. A) Aniline¹¹⁵, B) 4-aminophenylalanine¹²⁰, C) 5-methoxyanthranilic acid¹¹⁷, D) 5-methyl-2-aminobenzenephosphonic acid¹²¹, E) 5-methoxyindoline¹²³, F) Pyrrolidine¹²⁴.

Since the use of an additional molecule as a catalyst can add complexity to the acylhydrazone reaction, Kool's group has developed a system of autocatalysis. Indeed, in order to accelerate the reaction rate at neutral pH, the design of hydrazines and aldehydes was tuned. It was shown that when these molecules bear a neighboring acid/base group, the formation of hydrazones is significantly accelerated at biological pH, if the molecule's pK_A is close to the solution's pH. Furthermore, electron-deficient hydrazines, such as hydrazides, react more slowly than electron-rich ones, explaining their enhanced reversibility.^{100,110,126} Beside, Higgs *et al.*¹¹⁴ concluded that the judicious position of hydrogen bond acceptors near the carbonyl-derived moiety also increases the reaction-rate of the acylhydrazone formation. This was also demonstrated by both Gois' and Gao's groups¹²⁷⁻¹³⁰, who showed that 2-formylphenylboronic acid (2-FPBA, Figure 24) promptly reacts with hydrazides, and allows a rapid exchange of hydrazones at pH 7.0 which can be reversibly paused by raising the pH up to 12.

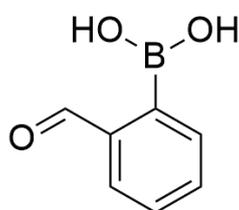


Figure 24 - Chemical formula of 2-formylphenylboronic acid, reacting with hydrazides with a high rate (thanks to its ortho boronic acid moiety).

c. Portfolio of (supra)molecular structures implying acylhydrazone bonds, from organic-solvent syntheses

Using acylhydrazone bindings' reversibility and supramolecular properties, the elaboration and valorization of various innovative structures were described in literature. These different structures can be either single- or multiple- acylhydrazone molecule. In this part, the (supra)molecular structures prepared in organic solvent and insoluble in water will be described, in order to show a portfolio of the applications of acylhydrazone bonds outside aqueous environment.

A common valorization of acylhydrazone puts forward its ability to bind with metal ions, as a Schiff base. These ligands are synthesized in organic solvents, and usable in aqueous solvents. Acylhydrazone derivatives have been firstly used as iron-chelating compounds.¹³¹ Later, the same group synthesized acylhydrazones from three aldehydes and fourteen hydrazides in order to find the most suitable ligands to eliminate iron from the body, a consequence of long-term transfusion therapy. The structures of the complexes $[Fe(L)_2 \cdot 2H_2O]$ were determined, and it was shown that the acylhydrazone plays a key role in the complexation (Figure 25).¹³²

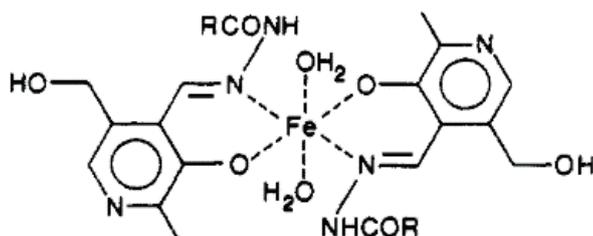


Figure 25 - Example of an iron complex structure reached with acylhydrazone ligands, from Edward et al.¹³²

Ligands able to complex with Al(III)^{133,134}, Cu(II)^{135–137}, Fe(II)¹³², Zn(II)^{138–140}, Cd(II)¹³⁸, Co(III)⁷⁷ or Ag(I)¹⁴¹ have been developed by several groups, for metal ions extraction or the formation of therapeutic complexes. Probes for the detection of anions have also been explored through acylhydrazone derivatives. For instance, a highly sensitive and highly specific probe have been developed to detect cyanide ions in water (Figure 26),¹⁴² or to hypochlorite ions in water.¹⁴³ These molecular probes were synthesized in ethanol or DMSO medium and used in an aqueous solvent (with non negligible amount of organic co-solvent to ensure good solubility).

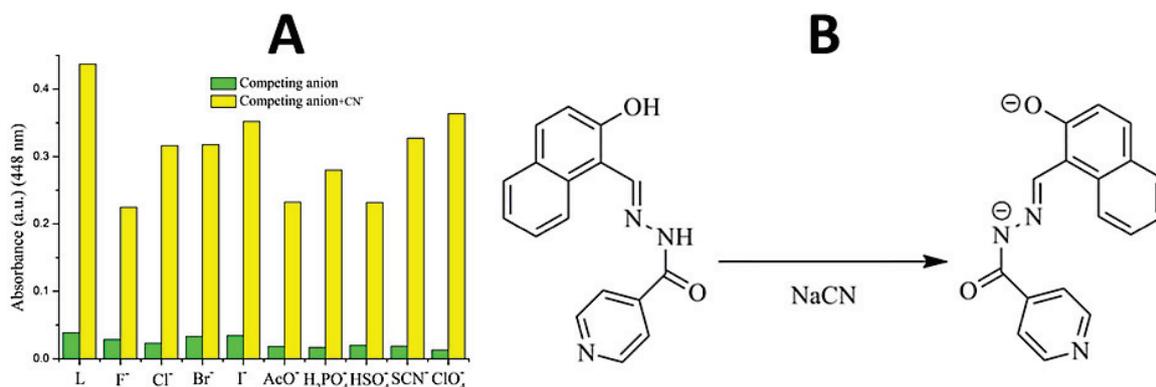


Figure 26 - (A) Absorbance in presence of CN⁻ and competing anions (L being the probe alone), and (B) the possible mechanism of the CN⁻ sensing. Adapted from Hu et al.¹⁴²

An original application of acylhydrazones was proposed by Qi *et al.*¹⁴⁴, by tuning the fluorescent properties of a naphthyl-based acylhydrazone through fumigation by TFA or NEt₃. Such a property could have a possible outcome as a security ink.

As stated in the first part, one of the most common uses of acylhydrazone is in the field of polymers, and particularly in dynamic polymers, but other structures were obtained by employing the acylhydrazone function, such as dendrimers¹⁴⁵, [2]-catenanes¹⁴⁶, organogels¹⁴⁷, and hydrogels¹⁴⁸.

Finally, acylhydrazone polymers can also be valorized as films, with self-healing properties (Figure 27),¹⁴⁹ or tunable Young modulus and T_g .¹⁵⁰

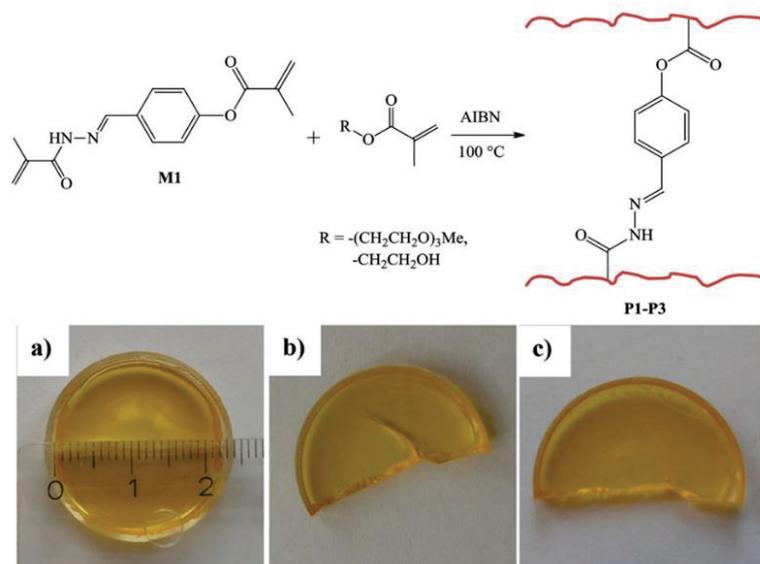


Figure 27 – Cross-linked film with self-healing properties. a) Polymer film, b) Film after scratch, c) Healed scratch after heating at 100°C for 64h. Adapted from Kuhl et al.¹⁴⁹

Copolymers adaptable to their environment thanks to their reversibility properties,^{54,90,97} or “optodynamers”, which are films displaying color and fluorescence by stacking with another one (Figure 28), were elaborated too.⁹¹

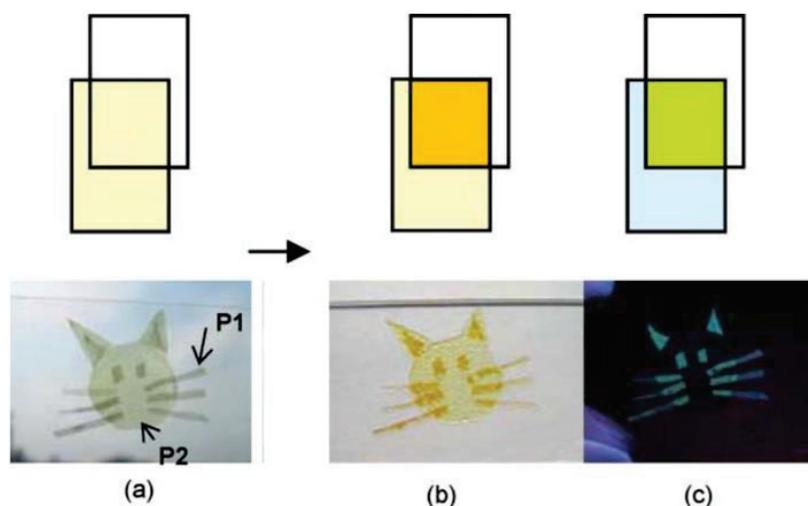


Figure 28 - Visual color and fluorescence change after heating superimposed polymer films (P1 and P2). a) color before heating, b) color after heating, c) fluorescence after heating (at 365 nm).⁹¹

In the next two parts of this paper, different strategies to design i) water-soluble single-bond acylhydrazone dimers/oligomers, or ii) polyacylhydrazones will be presented, such as using appended

moieties to help their solubilization, synthesizing the targeted molecules in organic solvents (but with a water-solubility application), or using a mixed water/organic solvent.

4. Single bond acylhydrazone synthesis strategies

As previously written, dimers of acylhydrazone (and by extension small oligomers) are different from polymers not only because of their molar mass, but also their number of acylhydrazone bonds per species. Throughout the multiple syntheses and uses of water-soluble single acylhydrazone bonds, two approaches stand out. The first one is the synthesis in organic solvents, most often in ethanol or DMF, with a water-soluble purpose for the resulting species, such as metal complexation or therapeutic action. The second one is the synthesis directly in water, or an organic/water solvent mixture, with the same goals.

a. Synthesis strategies in organic solvents with a water-soluble purpose

Despite being much less popular than other imines bonds (such as oximes) for bioconjugation, acylhydrazone have been used in this area in multiple ways by several groups.¹⁰⁰ Combining 1H-indole-2,3-dione (isatin) derivative and Girard's reagent, Bogdanov *et al.*^{151,152} successfully obtained water-soluble acylhydrazone from a reaction in refluxed ethanol. Later, they combined two isatin derivatives and performed the same reaction (Figure 29). Antimicrobial activity tests were carried out, and some compounds showed a high activity toward *S. aureus* and *B. cereus*, compared to a control drug. Hemolytic activity experiments were also performed, and the same compounds were found to be less toxic than control drugs.

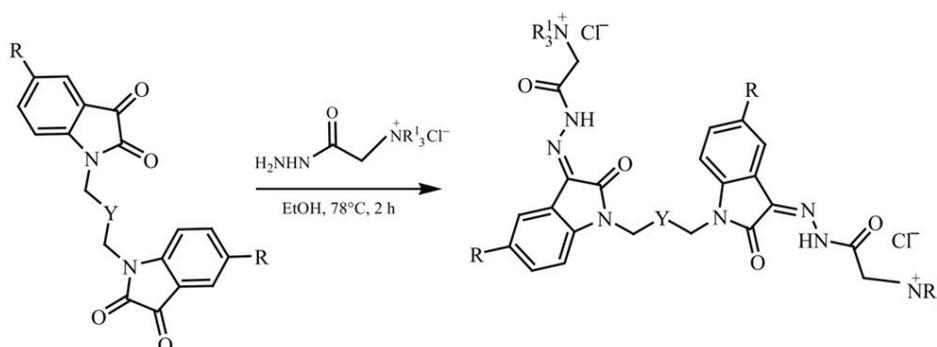


Figure 29 - Reaction conditions of the acylhydrazone synthesis by the combination of two isatin derivatives. Y = alkyl chains of different lengths. R = H or Br. NR₃⁺ = NMe₃ or Py. From Bogdanov *et al.*¹⁵²

A good strategy to make biologically active acylhydrazone compounds is to dilute a DMSO solution of acylhydrazone compounds in water. It allows an easy synthesis in ethanol, while being then able to be active in water. Dos Santos Filho's group¹⁵³ synthesized an acylhydrazone by this way, having activity against the malaria parasite which is resistant to chloroquine, but with a logP > 2. They studied the mechanism of action of the most active compounds. Similarly, some acylhydrazone derived from N-(arylsulfonyl)methionine showed a strong activity against Gram (+) bacteria, and some compounds particularly on *S. aureus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, and *B. cereus*.¹⁵⁴ Furthermore, an antifungal potential drug candidate was found against *C. neoformans* by tuning BHBM ((E)-N'-(3-bromo-6-hydroxybenzylidene)-2-methylbenzohydrazide), a previously-reported active acylhydrazone.¹⁵⁵ Finally, some acylhydrazones also led to antiviral compounds, as demonstrated by Hu *et al.*¹⁵⁶ against tobacco mosaic virus, which led to more efficient compounds than the classic ribavirin. It is clear to say that the molecular structure (with the acylhydrazone in the central position) and the antimicrobial activity of all these compounds are more or less similar. Based on these results, another series of acylhydrazones (Figure 30) was synthesized in ethanol. It showed activity against many bacteria, virus and fungi, while having a moderate to low cytotoxicity.

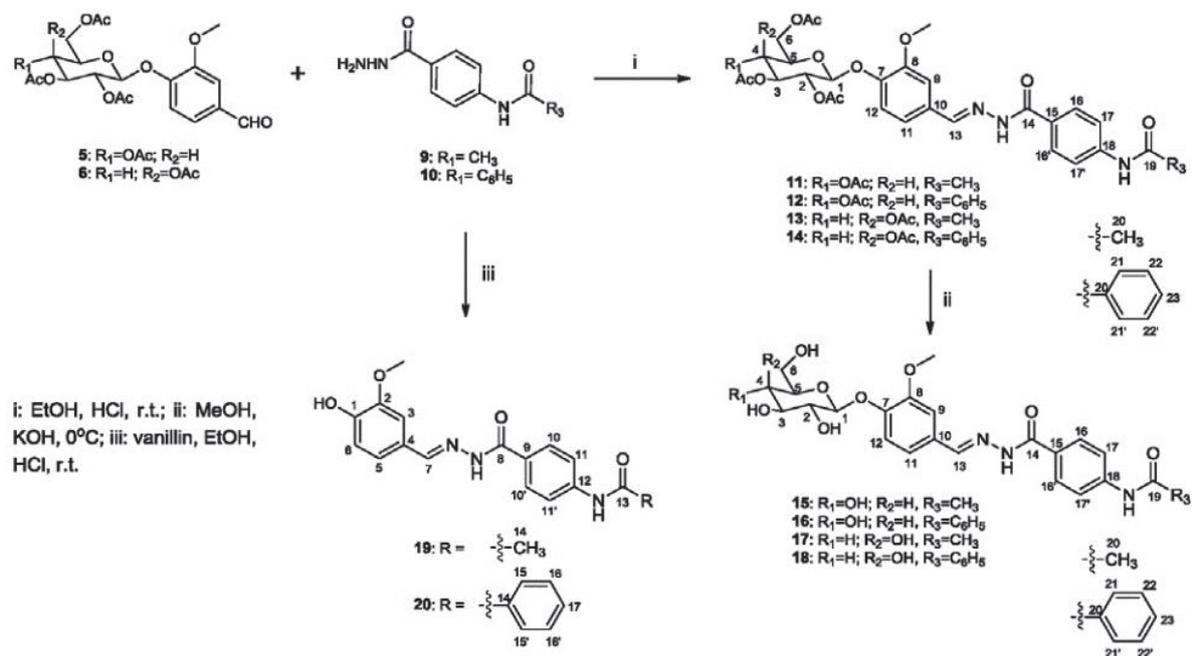


Figure 30 - Synthesis procedure of the biologically active acylhydrazone, from Guilherme *et al.*¹⁵⁷

Fraga's group^{158,159} designed active acylhydrazone based on the structure of preexisting drugs, giving birth to new active compounds, such as analgesics, or more recently, water-soluble potential inhibitors for cancer (based on trichostatin A). Similarly, Congiu and Onnis¹⁶⁰ designed an

acylhydrazone derivative from two existing active compounds (Figure 31). The obtained molecule showed cytotoxicity against several cancer cells, while some compounds showed no sign of acute toxicity in mice. Interestingly, by tuning aryl decoration, a correlation was found between log P and the average activity parameter. Gupta *et al.*¹⁶¹ also contributed to the rationalization of the acylhydrazone activity relation to the molecule design, by showing that by tuning the imine aryl decoration, the authors could increase the antimicrobial activity toward the considered bacteria. Indeed, if the substituted groups are electron-releasing, the activity increases towards *B. subtilis*, *E. coli*, and *A. niger*, whereas if they are electron-withdrawing, the activity increases against *S. aureus*.

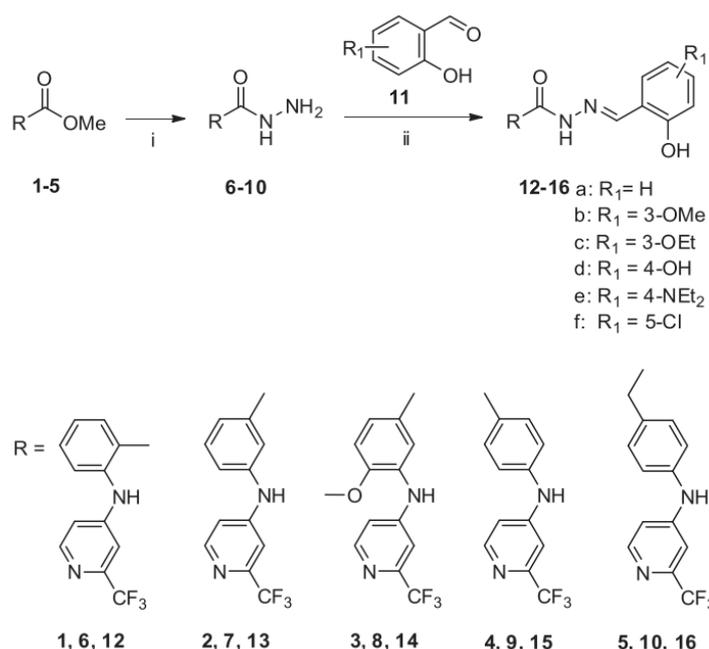


Figure 31 - Synthesis procedure of the tested compounds against several cancer cells, from Congiu & Onnis. Reaction conditions : (i) hydrazine hydrate, EtOH, reflux, 6 h ; (ii) EtOH, AcOH (cat), reflux, 2 h.¹⁶⁰

b. Synthesis strategies in aqueous medium

As for the syntheses in organic solvents, water-based syntheses can be used for the preparation of metallic complexes, leading to original DCLs. Goral *et al.*⁷⁷ elaborated compounds being “doubly-dynamic” due to their metal-ligand interactions and their acylhydrazone bonds. Exchange kinetic parameters (ligand or acylhydrazone) were measured at different conditions (pH, temperature, oxidation) in 30 % acetonitrile in 0.01 M aqueous NH₄OAc, at pH = 7. Later, a triple-DCL was created from guanine-based components, through metal-ion binding, hydrogen bonds, and acylhydrazone bonds (Figure 32). The latter was used as a gelation factor, allowing the formation of a quartet assembly of guanines complexed by the metal ion, and consecutively, a gel. Thus, the gelation had

interestingly the ability to redirect the acylhydrazone distribution, and macroscopic properties depending on the cation and the acylhydrazone structure. These reactions were performed in sodium acetate buffer.^{162–164}

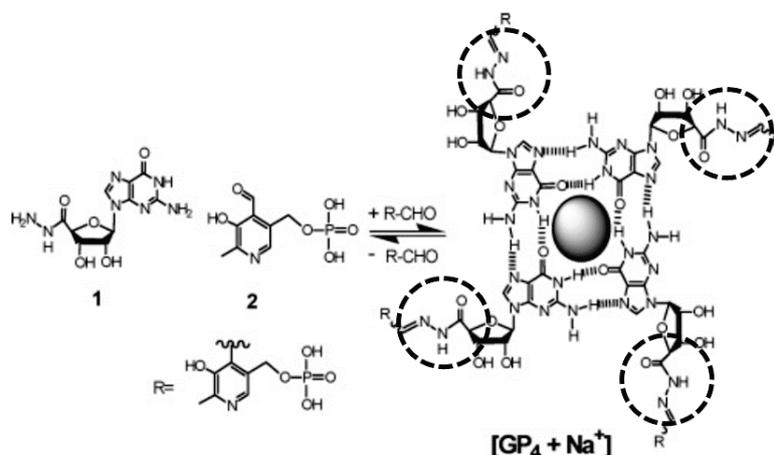


Figure 32 - Reversible synthesis of acylhydrazone bonds (highlighted in dashed circles), allowing a quartet assembly of the guanosine hydrazides thanks to the addition of a metal ion (represented by the gray sphere). Adapted from Bulher *et al.*¹⁶⁴

The synthesis of acylhydrazone bonds in water can also lead to biologically active compounds. Recently, Dascalu *et al.*¹⁶⁵ prepared hydrazone- and acylhydrazone-based species using only water as a solvent, from aldehydes, hydrazines, and hydrazides (Figure 33). Many of all the hydrazone compounds showed an antifungal activity against a lot of the tested strains. Interestingly, switching to acylhydrazone compounds enhanced the activity of some of them, comparably to marked drugs, but also narrowed the spectrum of activity to the tested strains, while showing no cytotoxicity.

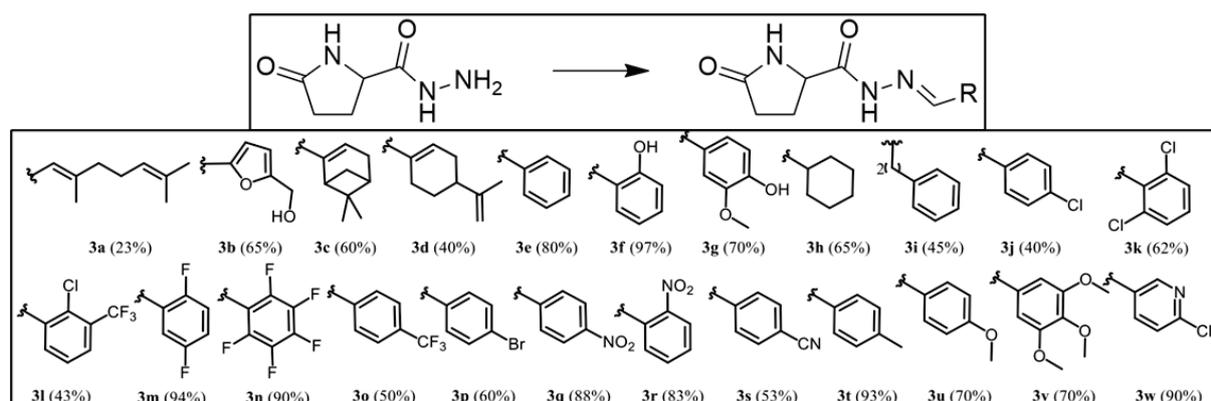


Figure 33 - Top: Synthesis of the acylhydrazone-based molecules, reaction steps and conditions: i) $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$, $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$, reflux, ii) hydrazine monohydrate, iii) aldehyde 1 equiv., H_2O , rt, 1h. Bottom: R groups with reaction yields. Adapted from Dascalu *et al.*¹⁶⁵

Using the same components (aldehydes, hydrazines, and hydrazides) to create a DCL (Figure 34), Fu *et al.*¹⁶⁶ screened the resulting acylhydrazones to inhibit the UDP-galactopyranose mutase (UGM), an enzyme involved in mycobacterial cell wall biosynthesis. The reaction was carried out in an aqueous buffer (pH = 6.2), with aniline as a catalyst.

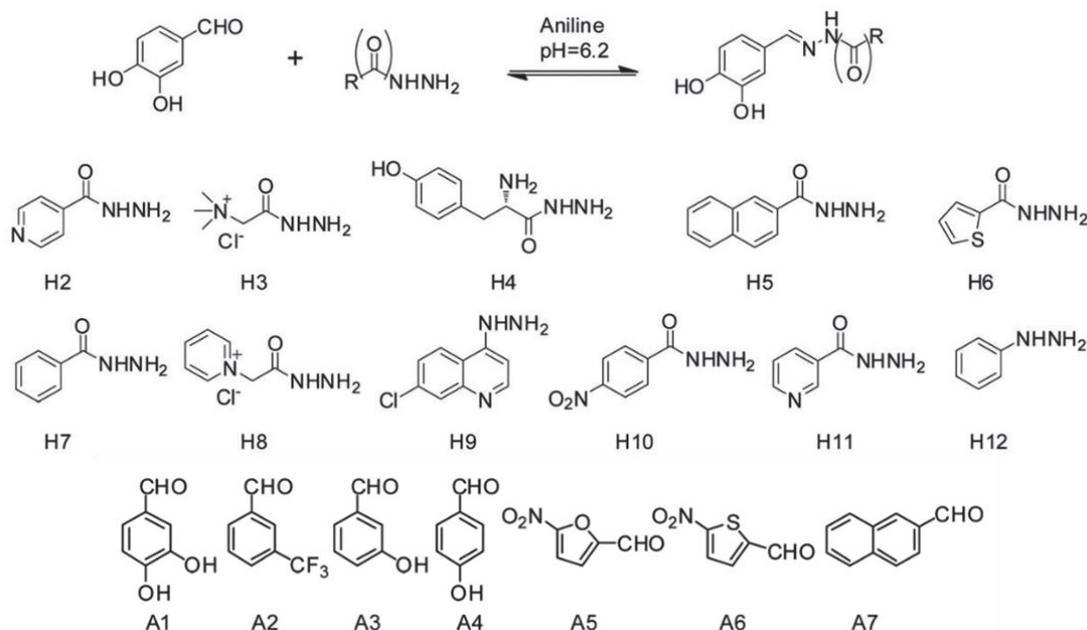


Figure 34 - Dynamic combinatorial library components for the identification of UDP-galactopyranose mutase inhibitors. The generation of the library was performed in an aqueous buffer, with aniline as a catalyst. Adapted from Fu *et al.*¹⁶⁶

Using DCC, Hirsch's group^{167,168} synthesized libraries from five hydrazides and five aldehydes to determine an inhibitor of the endo-thiapsin enzyme, in ammonium acetate buffer (pH = 4.6). Some potent molecules were identified, also showing that the protease selectively binds to the E isomers of acylhydrazone-based compounds.

Using water as the major solvent in their syntheses, Vicini *et al.*¹⁶⁹ prepared bioactive acylhydrazone molecules, with an anti-HIV-1 activity. The molecules were synthesized from hydrophobic aldehydes and water-soluble hydrazides in a water/ethanol (7:3 v:v) solvent, precipitated, filtered and washed with water. However, note that for the bioactivity studies, they were finally dissolved in DMSO and diluted in water.

Lehn's group^{170,171} prepared DCLs of building blocks (hydrazides, monoaldehydes, and dialdehydes), obtaining water-soluble species. The synthesis solvent was a sodium acetate buffer (pH = 4) with the addition of CH_3CN or DMSO to increase the solubility of some compounds. They were prepared from bioactive building blocks, and led to potent enzyme inhibitors, after the templating of the dynamic equilibrium (for acetylcholinesterase and HPr kinase enzymes). They later used the same approach, with DCLs prepared from sugar-based aldehydes, hydrazides, dihydrazides, and

trihydrazides for the screening and the identification of active compounds able to bind to a carbohydrate-binding protein, Concanavalin A (Figure 35). Because of the sugar-based structure of the aldehydes, the building blocks and the resulting acylhydrazone species could easily be solubilized in an ammonium formate buffer solution (pH = 4.0) at the millimolar level, without the addition of a miscible organic solvent.^{88,172}

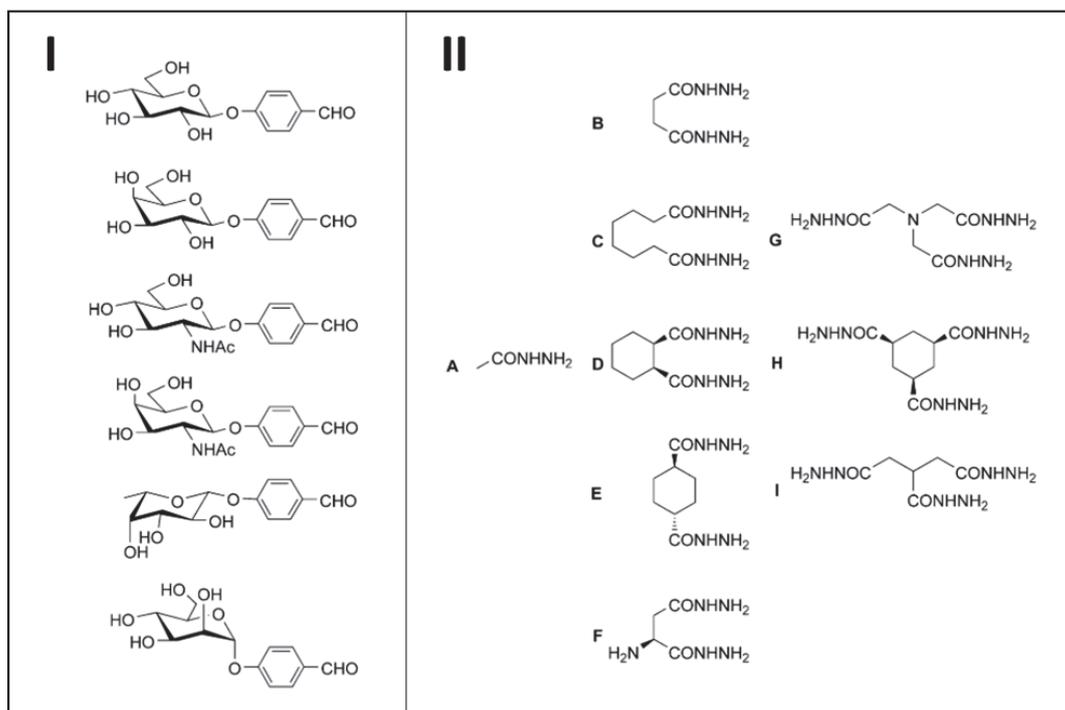


Figure 35 - Building blocks of the DCL generated in an ammonium formate buffer (pH = 4) without the use of an organic solvent. I - Sugar-based aldehydes. II - Mono-, di- and trihydrazides. Adapted from Ramström et al.⁸⁸

Greaney *et al.*^{173,174} prepared a DCL of acylhydrazones thanks to aldehydes and dihydrazides, in order to identify a novel enzyme inhibitor. The synthesis was performed in a mixture of DMSO/ammonium acetate buffer (pH = 6.4, 15/85 v/v), and a potent species was amplified after the introduction of the enzyme in the dynamic equilibrium. Similarly, Poulsen⁹³ generated a DCL from different aldehydes and hydrazides compounds, either *in situ* with the enzyme as a template in NH₄OAc buffer and 1 v% DMSO, or from a preformed equilibrium established in pure DMSO with acidic resin, and diluted to reach the same final conditions as the *in situ* DCL with the protein. The analysis tool used to characterize the DCL was the mass spectrometry (LC-MS) coupled to NMR, providing a faster screening time.

Through their studies on the catalysis of the acylhydrazone formation, Kool and Crisalli^{100,110,117,121,126} explored their synthesis from aldehydes and hydrazides. The main motivation of

their work was to successfully prepare acylhydrazones in a neutral aqueous medium. So, they used a phosphate buffer saline (PBS, pH = 7.4) in all their experiments, with the addition of 10 v% of DMF to ensure a good solubilization of reactants and products.

Similarly, the other groups working on improving the catalysis of the acylhydrazone formation in water used water-soluble building blocks, and syntheses were made at room temperature in aqueous buffers. The pH of these buffers (phosphate or acetate) varies from 4.5 to 7.4. The addition of 10 and 20 v% DMF was necessary for Zhou *et al.* and Trausel *et al.*, respectively, to improve the solubilization of both building blocks, and resulting compounds.^{114,115,119,123,124}

The use of acylhydrazone as a tool for time-controlled release of fragrance was explored by Levrant *et al.*^{97,109} by binding a water-soluble hydrazide to a highly volatile aldehyde (Figure 36). The synthesis was carried out in a water/ethanol mixture (2/1, v/v), the aqueous phase being phosphate (pH = 2.47) or citrate (pH = 4.48) buffers.

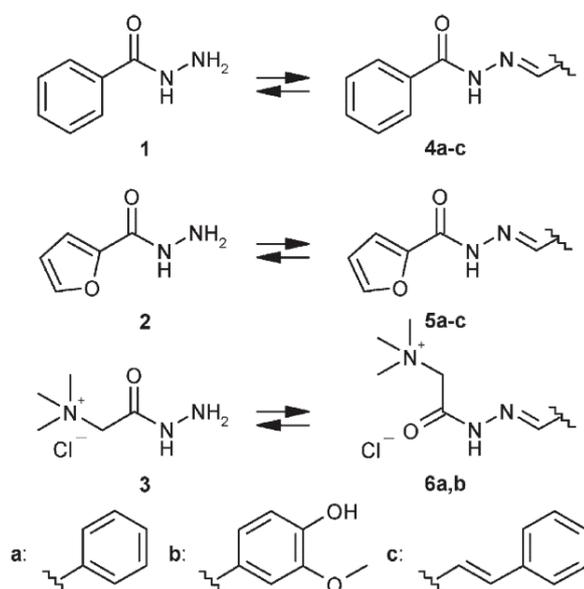


Figure 36 - Structure of acylhydrazones obtained by the reaction of hydrazides 1-3 with volatile aldehydes a-c. The reactions were carried out in a water/ethanol mixture (2/1, v/v) at acidic pH. Adapted from Levrant *et al.*¹⁰⁹

5. Multiple bond acylhydrazones synthesis strategies

Similarly to single-acylhydrazone molecules, polymers constituted of several acylhydrazone bonds display reversibility in their initial reactants in acidic conditions, and kinetical freeze under basic conditions. This property allows these kinds of polymers to be dynamic, giving “dynamers”. The features of polyacylhydrazones are i) high yields in mild conditions, ii) dynamic covalent polymers, and iii) many hydrogen bond interactions. Lehn^{56,82} describes such polymers as “reversible polyamides”,

because of the similarity between the functions, but also because of their poor solubility in classic organic solvents and water, which complicates their synthesis and characterization.

According to literature, polyacylhydrazones can be classified in three categories. The first one is based on synthetic polymers with acylhydrazone functions in the main chain, obtained from either dihydrazides and dialdehydes, or monomers carrying both hydrazide and aldehyde moieties. Focusing on this kind of water-soluble polymers, a differentiation of their synthesis solvent (in organic or aqueous solvents) seems to be relevant in this review. Indeed, because of the intrinsic poor water-solubility of such polymers, the employed strategies will be different in those cases.^{80,175}

The second category corresponds to synthetic polymers with acylhydrazone functions in their side-chains. They are basically (water-soluble or not) polymers bearing multiple pending aldehydes or hydrazides moieties, and able to undergo exchange with building blocks decorated with the complementary function, thermodynamically reaching an equilibrium.^{80,175}

A third category might as well be considered, not by its polymeric structure (*i.e.*, the location of acylhydrazone function in the polymer), but by its composition. Indeed, this polymer family can bear the acylhydrazone functions in the main or side chains, but they are composed of water-soluble bio-based components, such as carbohydrates, amino acids, or nuclei acids. Thus, they can have interesting properties and many advantages compared to “classic” synthetic dynamers or biopolymers.^{145,176} These three categories will be successively detailed in the next paragraphs.

a. Synthetic polymers with acylhydrazone functions in the main chain

Synthetic polyacylhydrazone with the functions in the main chain have several advantageous intrinsic structural properties compared to polymers whose acylhydrazone functions are located in the side chains. Beyond its dynamic behavior that was described above, it can be a homopolymer with a repeating unit bearing aldehyde and hydrazide functions, but also a copolymer with different repeating units bearing aldehyde or/and hydrazide functions. An interesting feature can be found when the repeating units are either dialdehydes or dihydrazides, because the resulting polymer is strictly alternating.⁸²

These water-soluble polyacylhydrazones can be prepared in an organic solvent for more convenient synthesis and purification, then diluted or dissolved in water (with the aim of using them in bioactivity applications). They can also be directly synthesized in water when the solubilities of both the monomers and the resulting polymer are high enough. Note that some syntheses, as described below, use organic co-solvents to enhance the solubility.^{82,84}

i. Synthesis strategies in organic solvents

The first polyacylhydrazone from dihydrazides and dialdehydes to our knowledge was synthesized by Michel and Murphey in 1963.¹⁷⁷ They reported many successful polymerizations in HMPA, DMF or DMSO, but struggled to re-dissolve the polymers once isolated from the solvent.

More recently, Cousins *et al.*¹⁷⁸ designed in 1999 one of the first DCLs based on these types of linkages, by mixing together four species in CH₂Cl₂ (Figure 37). Through ESI-MS characterization, they observed all the combinations possible (more than 130 species) up to undecamers, with mainly cyclic compounds. The catalysis was performed with drops of TFA (also used for *in situ* deprotection of the aldehydes), and NEt₃ was chosen to freeze the equilibrium. Interestingly, some species were found to be amplified by the addition of [18]crown-6, while the original distribution could be regenerated by adding KBr (3eq), which compete with the library components of the crown ether.^{50,179} Later, an equilibration of the same components with templates such as quinine, cinchonine, quinoline or quinuclidine led to surprising results. Indeed, diastereomeric templates such as quinine and quinidine led to a distribution of different oligomer macrocycles, amplifying the tetramer and the dimer respectively.¹⁸⁰ Lam *et al.*¹⁴⁶ prepared a DCL from the Pfm building block, and used acetylcholine as a template. Instead of giving a library made of macrocycles, as stated before, [2]-catenanes were obtained. As a matter of interest, only one diastereomer emerged. These results confirmed that chiral templates can differently modify DCL, and non-chiral templates can lead to chiral supramolecular structures.¹⁴⁶

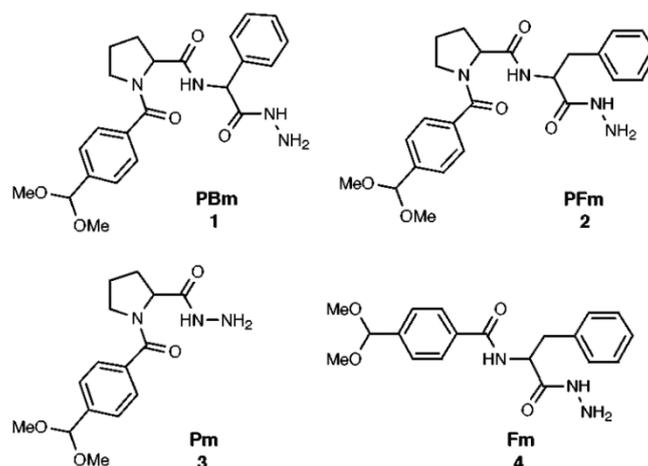


Figure 37 - Monomers used by Sanders' group for the generation of their DCL.¹⁷⁸

Similarly, Voshell *et al.*¹⁸¹ showed that a DCL made of two racemic compounds with the addition of a chiral template, (-)-adenosine, can result in the amplification of only one diastereoisomer species (Figure 38). In this study, the cyclic dimer (S,S) was amplified with an enantiomeric excess of

21% when templated by the (-)-adenosine, while no enantiomeric amplification was observed for the untemplated dynamic library.

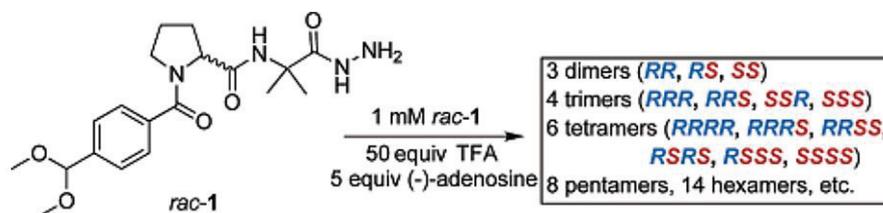


Figure 38 - Racemic DCL, yielding in a distribution of cyclic oligomers. The addition of (-)-adenosine amplified the dimers proportions over the untemplated distribution, and the SS dimer was found with an enantiomeric excess of 21%.¹⁸¹

Lehn's group⁸⁴ synthesized polyacylhydrazones from seven different monomers in DMSO or DMF, using drops of AcOH or TFA as catalyst. They studied the influence of temperature and time on the polymer formation or exchange rate. They also reported their high insolubility in commonly used organic solvents, because of the high number of hydrogen bonds occurring both intra- and intermolecularly. According to Lehn's group, only high-boiling-point solvents able to break these hydrogen bonds, such as DMSO or DMF, can solubilize them with help of heating.

Ulrich's group prepared polyacylhydrazones from dihydrazides and dialdehydes, carefully designed to be able to complex plasmids, and vectorize them up to cell nuclei (Figure 39). The polycondensation was performed in methanol. It was demonstrated that the smaller macrocycles are preferentially formed at low concentration, whereas the linear polymers can be found at high concentrations. These dynamers effectively complexed dsDNA in aqueous buffers at biological pH.¹⁸²

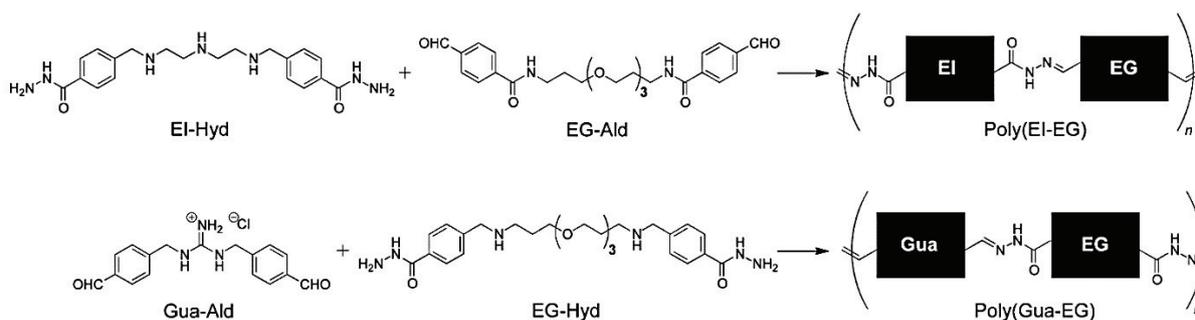


Figure 39 - Monomers synthesized by Ulrich et al¹⁸², resulting in dynamers able to complex plasmids and vectorize them up to cell nuclei.

ii. Synthesis strategies in aqueous solvents

Furthering Michel and Murphey's work, Roberts and Thomas¹⁸³ synthesized polyacylhydrazones in DMF/H₂O (1/1 v/v) at room temperature, from carbohydrate-based hydrazides and dicarbonyl compounds (Figure 40). The obtained polymer from compounds 1a and 2,3-butanedione was insoluble in common solvents (except DMSO, boiling DMF, or water), but the addition of adipic dihydrazide to form a random copolymer led to water-soluble polymers at room-temperature.

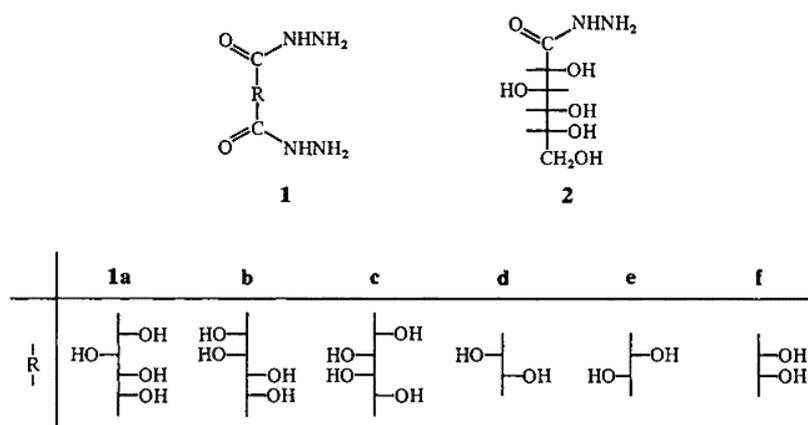


Figure 40 - Carbohydrate-based hydrazides and dihydrazides used for the synthesis of Roberts and Thomas' polyacylhydrazones.¹⁸³

Beeren *et al.*¹⁸⁴ performed polyacylhydrazone exchange reaction in aqueous buffer (carbonate, pH = 3). They studied the kinetical trap that macrocycles can create over linear species, making monomer exchange very slow when macrocycles are mixed together. Nevertheless, they also demonstrated that the addition of 4-hydroxybenzhydrazide can overcome these potential wells, and lead to an equilibrated final distribution.

By using amphiphilic dialdehydes and dihydrazides, Frantz Folmer-Andersen *et al.*¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ synthesized polyacylhydrazones in water, at pH = 2.0 (Figure 41A). These dynamers have the property to self-assemble into rods, because of hydrophobically-driven folding. The nucleation-growth effect can be observed, as hydrophobic interactions (and π -stacking) favor the addition of a monomer to the end of the polymer over the formation of smaller species. More, the addition of co-solvents such as DMF or ACN prevents the formation of these secondary helical rod-like conformations. Surprisingly, the increase in temperature leads to an increase of the molar mass of the polymers (Figure 41B), and if the temperature is below LCST, the rod-like conformation is conserved. If the temperature is above LCST, the aggregation of polymers becomes too rapid, and large aggregates made of intertwined rods are created.

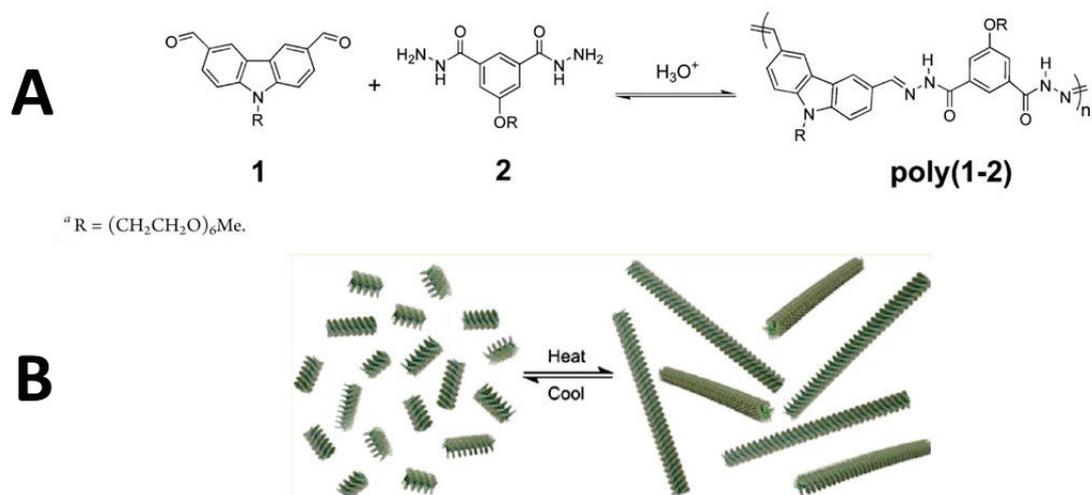


Figure 41 - A) Polymerization of dialdehyde **1** and dihydrazide **2**. B) The heating of the rod-like structures (below LCST) reversibly aggregates them bigger rods. Adapted from Folmer-Andersen *et al.*¹⁸⁷

Very recently, Psarrou *et al.*¹⁰⁷ made a water-soluble polyacylhydrazone from adipic dihydrazide and a dialdehyde containing poly(ethylene glycol) segment between phenyl groups (Figure 42A). The synthesis was interestingly performed only in MilliQ water (with drops of HCl) at 25 °C, yielding in a 28,000 g.mol⁻¹ copolymer. Then, doxorubicin was added and attached to the hydrazide end-group thanks to its carbonyl moiety. These polymers were found to have a self-assembling behavior into spherical nanoparticles, which can be disrupted through the addition of acid (pH = 2.0) or light irradiation (254 nm, 0.1 mW.cm⁻¹). These two *stimuli* can be combined in a synergistic manner to accelerate the disruption even more (Figure 42B). These experiments demonstrated that a hydrophobic drug, such as doxorubicin, can be covalently linked to a water-soluble polymer, and can be released under particular conditions at a useful location, showing the vector role potential of polyacylhydrazones.

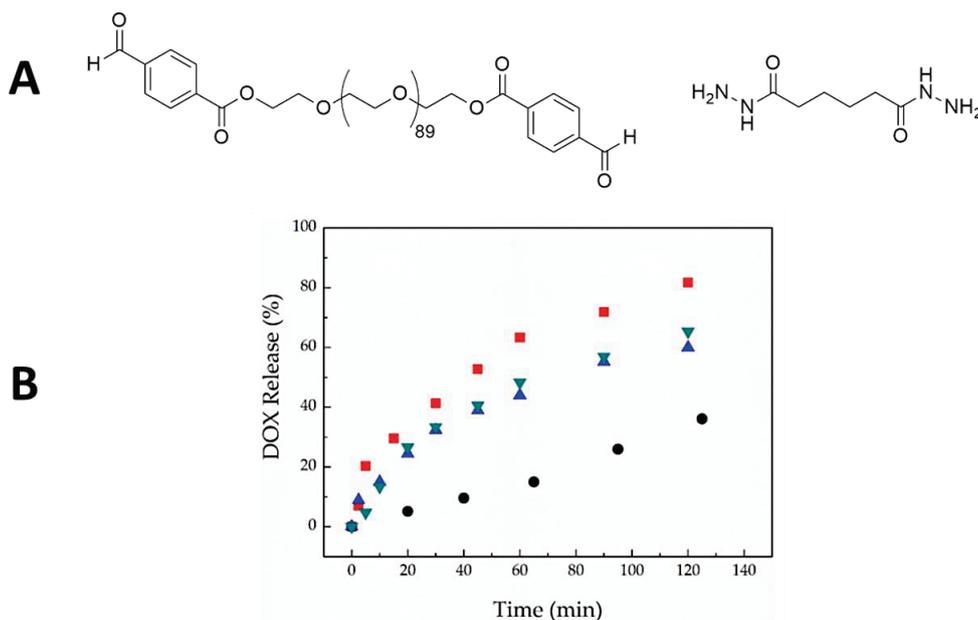


Figure 42 - A) Water-soluble monomers for the synthesis of the polyacylhydrazones by Psarrou *et al.* B) Synergistic effect of the doxorubicin (DOX) release upon irradiation and medium pH (7.4 = blue triangles, 5.2 = green triangles, 2.0 = red squares). The black circles are the samples without irradiation at pH 2.0. Adapted from Psarrou *et al.*¹⁰⁷

Hydrogen bonds can also be an asset for these polymers, as Daines *et al.*⁹⁵ demonstrated by using polyacylhydrazones in coatings. The synthesis was performed in water, from bis-functional levulinoyl esters and small water-soluble dihydrazides, yielding in a 50 % (w/v) final concentration, and a clear viscous solution for the case of adipic dihydrazide. Solutions showed linear and macrocycles species with degrees of polymerization around 6.

Water-soluble hyperbranched polymers were also developed. Indeed, Zhang *et al.*¹⁸⁸ synthesized them in an aqueous buffer at pH 4.0, then lyophilized. These dendritic hyperbranched polymers demonstrated precipitation upon heating, and re-solubilization upon cooling. Their cloud point depends on the solution pH. The authors also turned these dendrimers into hydrogels *via* cross-linking with dialdehydes at low pH (Figure 43). These hydrogels showed self-healing properties, no cytotoxicity, and good mechanical properties, making them good candidates for biomedical applications. Montenegro's group^{145,189} also worked on amphiphilic dendrimers made of acylhydrazone linkages, by screening DCLs. They developed dendrons able to transfect into cells thanks to their cationic charges, together with their hydrophobic tails which are able to complex functional DNA or siRNA, self-assembling into polyplexes as a means of vectorization.

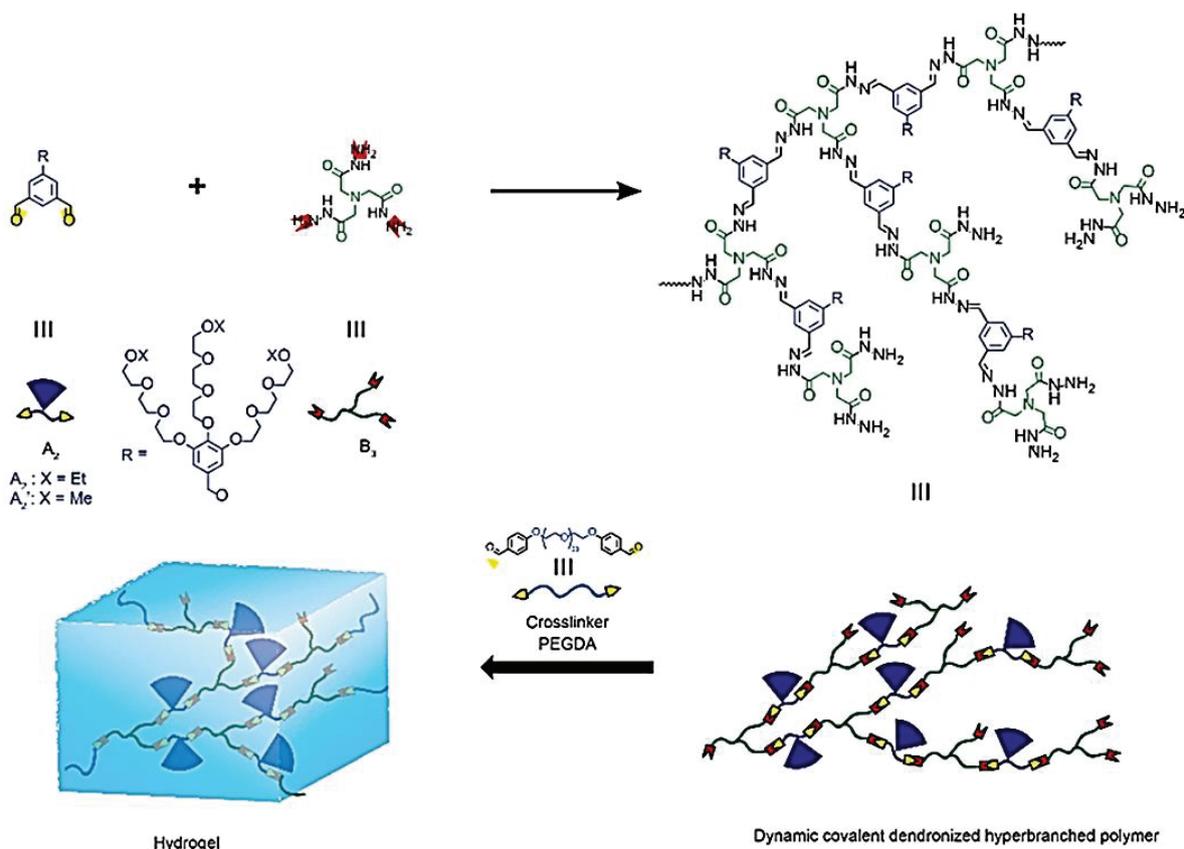


Figure 43 - Dendritic hyperbranched polymers developed by Zhang et al., that can be turned into hydrogels upon addition of dialdehyde cross-linkers. ¹⁸⁸

b. Synthetic polymers with acylhydrazone functions in side chains

The introduction of acylhydrazone bonds on the side chain of polymeric structures can lead to complex dynamic polymers, by branching the pending aldehyde or hydrazide to the complementary function borne by grafting entities (Figure 44). A high variety of side-chain species can lead to multifunctional “brush-like” polymeric structures, providing many kinds of interactions, particularly useful for bioactive applications. Furthermore, this type of polymer can easily be converted into hydrogels by binding cross-linkers instead of functional species.^{80,175}

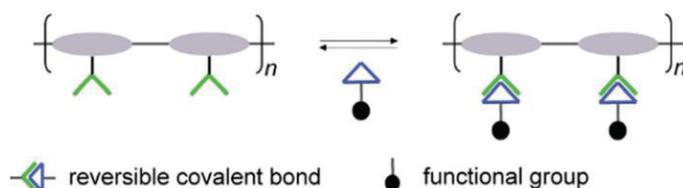


Figure 44 - Polymer-scaffolded dynamic bonds strategy, from Zhang et al.⁸⁰

Montenegro's group^{190,191} developed a polymer scaffold bearing hydrazide moieties, able to bind with either cationic or hydrophobic aldehydes. Once synthesized in DMSO/H₂O (1/1 v/v), the resulting amphiphilic polymer demonstrated self-assembling properties when combined with plasmid DNA or siRNA, forming polyplexes. These polyplexes demonstrated the ability to undergo transfection into human cells, hence releasing the plasmid in the cell (Figure 45). A higher-DP polymer was required to complex the plasmid DNA (> 4,500 bases) than siRNA (< 25 bases). The same strategy, with identical reaction conditions, was then applied to transfect mRNA.¹⁹² Another approach was to replace the polymer scaffold by a peptidic scaffold instead of a "polyhydrazide" one, with pendant cationic and hydrazone moieties, branching it to hydrophobic aldehydes, for a successful transfection of plasmid DNA in human cells.¹⁹³

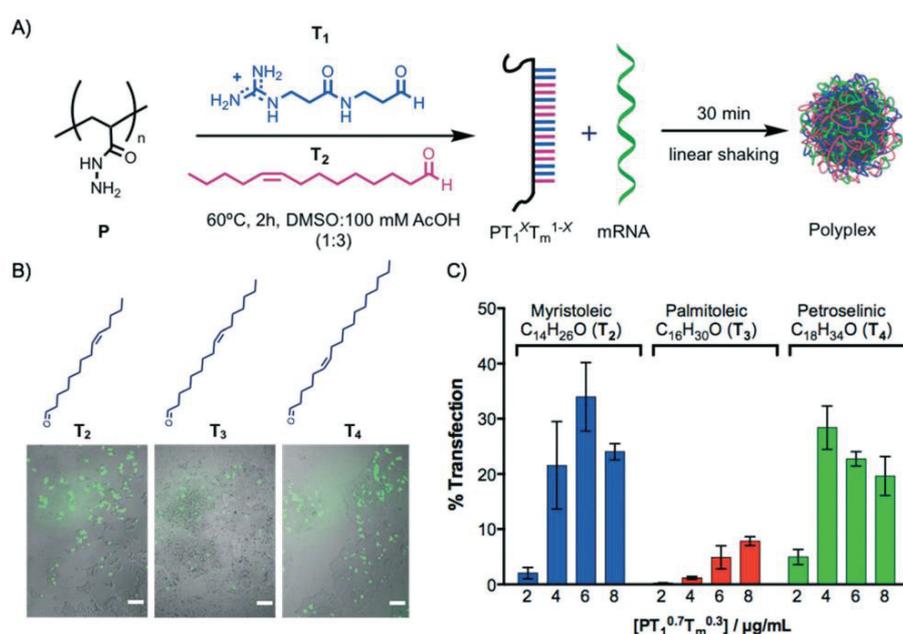


Figure 45 - A) Polyplex formation process, from "polyhydrazide", named P, branched with cationic and hydrophobic aldehydes to complex mRNA. B) Microscopy images of Hek293 cells depending on the hydrophobic aldehyde. C) Transfection percentage depending on the hydrophobic aldehyde type.¹⁹¹

Fulton's group^{86,87,194} also worked on polymer scaffolds, but with aldehyde moieties on pendant chains. Using different hydrazide residues, they developed a DCL in which the diversity point is the functionalization of the polymer scaffold (Figure 46). The resulting DCL demonstrated a high sensitivity to the surface potential of the templates (= biomacromolecules). The equilibrium condition being an aqueous buffer (pD = 4.5 in D₂O), albumins (BSA and HSA), with pI = 5.5 (so positively charged in this buffer), displayed amplifications of anionic components over neutral, cationic or zwitterionic ones. On the other hand, pepsin, a negatively charged protein (pI = 2.2), displayed preference for functionalization with cationic residues. Interestingly, when all components except the cationic one

are mixed with pepsin, the anionic one stand out, showing that the driving force of the amplification is more complex than the template surface potential alone.

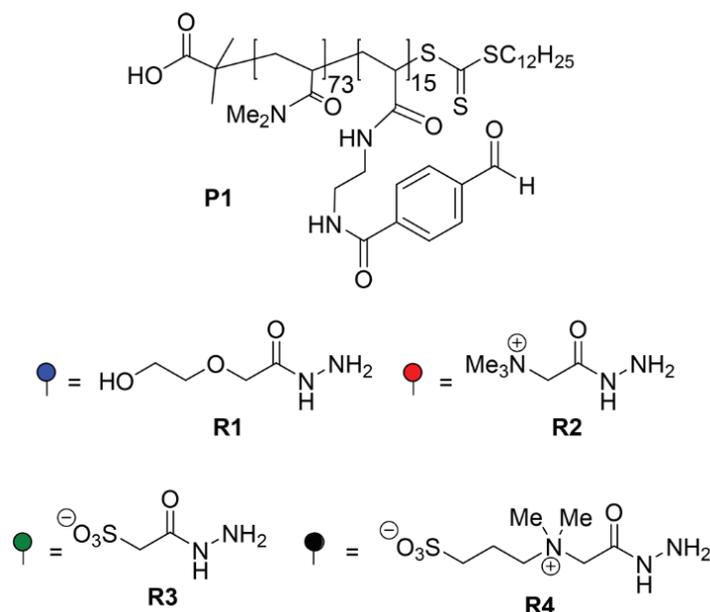


Figure 46 - Polymer scaffold (P1) with pending aldehyde moieties, and hydrazide residues (from R1 to R4) with various charges. ¹⁹⁴

Similarly, Xu *et al.* ¹⁹⁵ used poly(glycidol) functionalized with aldehydes, and generated a DCL through side-chain condensation with hydrazides. The reaction was performed in PBS buffer at pH 6.2, with 0.5 % DMSO. Using acetylcholinesterase as the template and five different hydrazides as building blocks, a resulting polymer-scaffolded side-chain distribution demonstrated inhibition of the enzyme, with cytotoxicity and bioactivity above the compared commercial drug. They also used LTB (protein from *E. coli*) as templates with another set of dihydrazides, containing galactose derivatives (Figure 47). The amplified ligand from this DCL was then branched alone on the polymer scaffold, and the polymer showed 60,000-fold inhibition potency than the ligand alone. More, it demonstrated more than 10 times less cytotoxicity than doxorubicin, the control drug. ¹⁹⁶

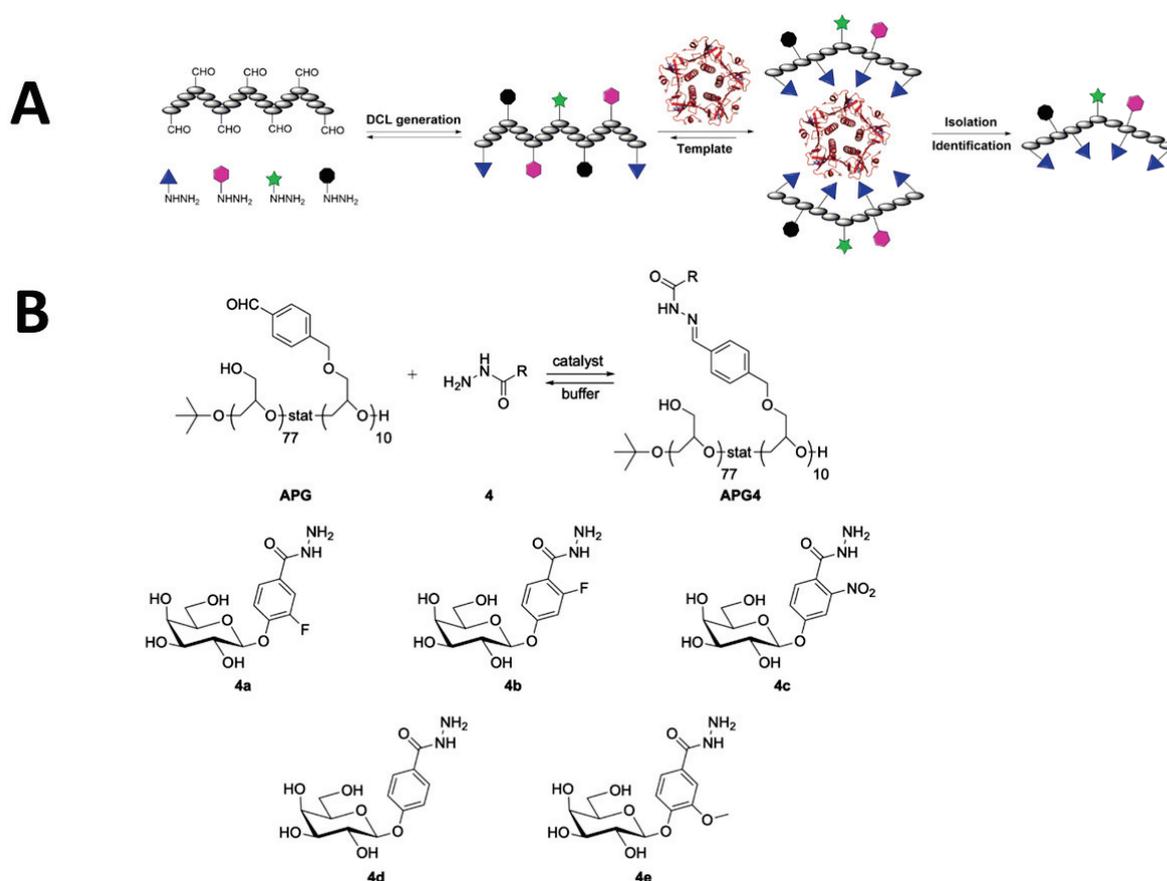


Figure 47 - A) DCC strategy to find an inhibitor to LTB protein through polymer-scaffolded library generation. B) Library components with the polymer scaffold (APG) and the hydrazide residues (4a-4e). Adapted from Xu et al.¹⁹⁵

Whitaker *et al.*⁶² used the same polymer scaffolds as previously described, and cross-linked the aldehyde moieties with succinic dihydrazide, leading to single-chain polymer nanoparticles (SCPNs), in an acetate buffer (pH 4.5) with 0.1 M NaCl. When heated above LCST, these SCPNs become hydrophobic and aggregated, therefore increase the local concentration and favor intermolecular cross-linking, forming hydrogels. Cooling to room temperature has the effect on slowly re-dissolving the gel into SCPNs, at day-level speed, depending on the aldehyde density of the polymers. Moreover, Deng *et al.*^{81,85} synthesized a hydrogel based on cross-linked polyacylhydrazones which showed a pH-responsive sol-gel behavior with self-healing properties.

c. Bio-based polymers with acylhydrazone functions in the main and side chains

As the previous polymers, bio-based polymers with acylhydrazone functions in the main and side chains (= biodynamers) can undergo a repeating unit exchange and continuous constitutional modifications. Thus, they have the particularity to be dynamic analogs of biopolymers. This statement implies that whereas the previously presented polymers must be based on synthetic repeating units with a hydrophilicity (and often bioactivity and biocompatibility) purpose, the biodynamers are made of biorelevant repeating units, most often with sufficient hydrophilicity. The challenges are therefore different, as it tends to find a synergistic manner to combine both the biorelevant characters of the monomers (and the biopolymer), and the dynamic bonds between them, to enhance the properties of the initial biomolecule. Due to their biocompatibility, acylhydrazone functions are one of the most used dynamic bonds for this kind of strategy. The applications for the three major families of biodynamers (glycopolymers, proteoids or analogs of proteins, and DyNA standing for dynamic DNA) will be described here.^{145,176,197}

The term “glycodynamers” can be applied to three different polymer designs.^{176,198} Firstly, they can be dynamers with modified carbohydrates, dynamically linked to the main chain. These types were studied by Ruff and Lehn¹⁹⁹ through polymerization with analogs of arabinofuranoside oligosaccharides, containing oxime bonds, but also by Roberts and Thomas¹⁸³, whose polyacylhydrazone was already described above. Secondly, glycodynamers can also be made of carbohydrate-pending repeating units with acylhydrazone dynamic bonds, as studied by Kirker *et al.*²⁰⁰ who cross-linked different types of aminopolysaccharides (hyaluronan and chondroitin) with poly(ethylene glycol) propionaldehyde, forming acylhydrazone bonds. They demonstrated that, once turned into films, these gels were able to accelerate the regeneration of wounded tissues. Ruff and Lehn¹⁹⁸ also worked on these types of glycodynamers, using dialdehydes and dihydrazides, both containing pendent carbohydrates (Figure 48), to obtain rod-like structures once the polymer was synthesized. They concluded that aromatic dialdehydes led to high molar mass polymers, but with a slow reversibility, while aliphatic dialdehydes led to low molar mass polymers with a reversibility property under mild conditions. Both polymers can have applications in different fields, depending on if the preference goes to slow degradation or high adaptation. Finally, the last type of glycodynamers is made of a polymer scaffold with post-polymerization grafting of acylhydrazone-linked carbohydrate, as already studied before through the work of Xu *et al.*¹⁹⁶ about the *E. coli* protein inhibition with galactose derivatives grafted on a polymer-scaffold.

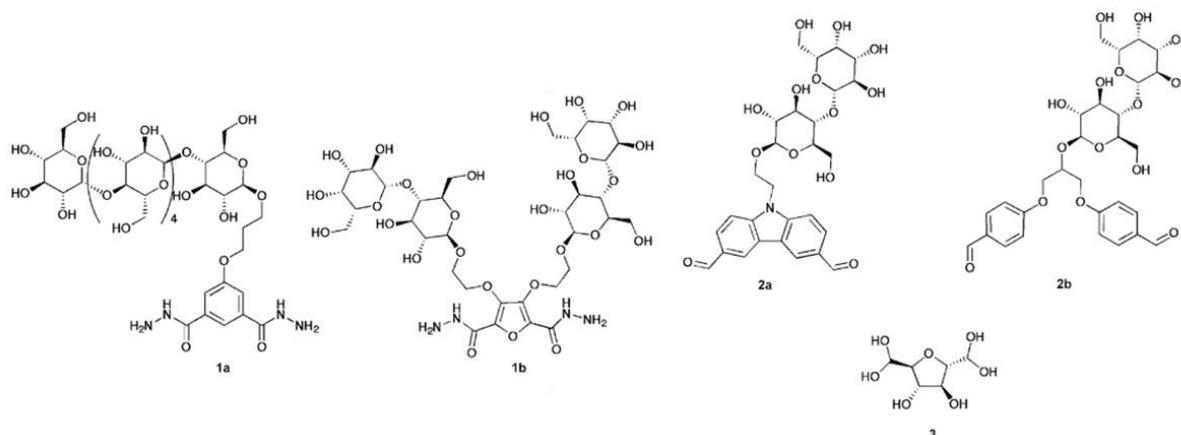


Figure 48 - Carbohydrate-based monomers used by Ruff and Lehn, with dihydrazide (1a, 1b) and dialdehydes (2a, 2b, 3).¹⁹⁹

Dynamic proteoids, or analogs of proteins, with acylhydrazone reversible bonds has been studied by several groups. The use of amphiphilic dialdehydes, with pendant hexaglyme, together with amino acid hydrazides, was explored by Lehn's group.^{96,176,197} These kinds of copolymers were qualified as "doubly" dynamic, because of the imine and acylhydrazone resulting bonds. In an acetate buffer (pD = 5 in D₂O), they found that the polymerization is driven by the folding of these polymers, into spherical or cylindrical structures, and that the reaction rate and the final structure depends on the side-chain moieties on the amino hydrazides. Similarly, amino acids (Arg, His, Gly) have been turned into aminoxy and hydrazides terminations by Bouillon *et al.*,^{201,202} and reacted with dialdehydes to form oxime and acylhydrazone bonds. The polymers were synthesized in DMSO but were then used in an aqueous buffer (pH = 7.0) with physiological saline conditions to effectively complex long DNA and siRNA, and to deliver siRNA in living cells (Figure 49).

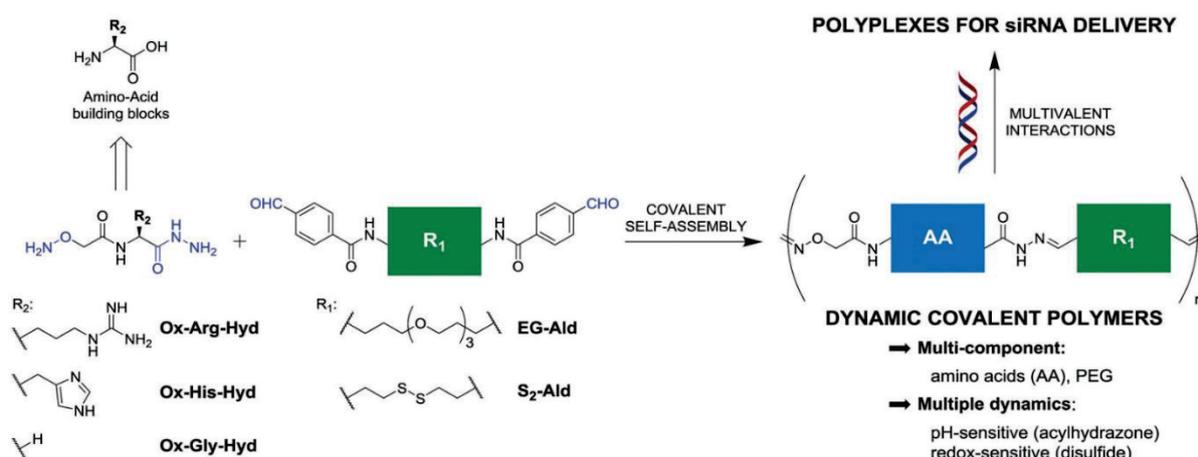


Figure 49 - Aminoxy-hydrazides monomers synthesized by Bouillon *et al.*²⁰¹ from amino acids and polymerized with dialdehydes to form a dynamer able to complex and deliver RNA in living cells.

Cyclic peptides, functionalized with aldehyde moieties, have been used as a scaffold for the reaction with cationic hydrazides. These clusters were reported by Bartolami *et al.*^{145,203,204} to be able to reversibly complex DNA and release it inside cells.

Reuther *et al.*^{205,206} cleverly prepared peptides including some modified amino acids, bearing an aldehyde or hydrazide moiety as a side chain (Figure 50). Depending on the number of modified amino acids in the peptide, it became possible to cross-link the moieties to form loops, with dihydrazides and dialdehydes as cross-linkers, in a PBS/ACN (1/1 v/v) medium. These loops are used to change the quaternary structure of the peptides and can display an enhanced antimicrobial activity.

<i>Peptide</i>	<i>Sequence</i>
<i>DiX₁</i>	N-RTRXFTXGRYF-C
<i>DiX₂</i>	N-RTXRFTGXRY-C
<i>DiX₃</i>	N-RXTRFTGRXY-C
<i>DiX₄</i>	N-XRTRFTGRYXG-C
<i>TetX₁</i>	N-RTXVXTXRXY-C
<i>TetX₂</i>	N-XGXTDHRDLSXGXE-C
<i>TetX₃</i>	N-XIHEXQNRXSARXVTW-C
<i>HexX</i>	N-XRLTXTFSXSFTXGTRXSGTXLRTXTRE-C

Figure 50 - Peptide sequence showing the modified amino acids bearing a hydrazide or aldehyde moiety (with the X). These pending moieties can then be cross-linked to create loops.²⁰⁶

Analogously to proteoids, polymers of amino acids analogs, the dynamic DNA (or DyNA) are polymers of nucleic acid analogs, with reversible covalent bonds such as acylhydrazone, while keeping a maximum of DNA properties. Lehn's group^{163,176,207} prepared a polymer-scaffold with pendant nucleobases, in physiological pH medium, and showed their capacity to undergo monomer exchange and adaptability to external biological templates (Figure 51). These DyNA can also be synthesized using regular DNA as a template to obtain its complementary, similarly to the RNA.

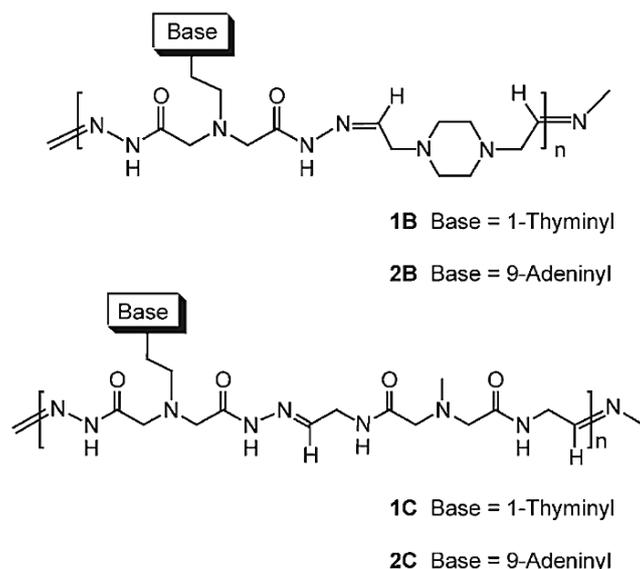


Figure 51 - Two different DyNAs prepared by Sreenivasachary et al., bearing pending nucleobases.¹⁶³

6. Conclusion and Discussion

To conclude this review about water-soluble acylhydrazone (macro)molecules, the literature shows that the water-solubility of such molecules, depending on their molecular structure, is not trivial. Concerning single bond acylhydrazone molecules, the solubility can be predicted with physicochemical parameters such as logP. A common strategy is to synthesize the molecules in polar organic solvents (such as ethanol, DMSO, or acetonitrile), and to dilute them in water for the aimed use. The drawbacks of this approach are the inevitable presence of organic solvent in the final medium, and a relatively low final concentration, which can be obstacles for some valorizations. Parallely, a direct synthesis in water can sometimes imply the requirement of organic co-solvents, as they can be used to ensure good solubilization of both the reactants and the products. However, if the goal is to have an organic-solvent-free solution, the structure of the reactants must be carefully designed, as the solubility of the final products mostly depends on them. As examples, carbohydrate-based molecules, or ionic ones, were found to be water-soluble without any organic solvent.

What is true for single acylhydrazone bond molecules becomes even more important for multiple acylhydrazone bond ones, or polyacylhydrazone, because the intra - and inter - hydrogen bonds become an obstacle when the number of acylhydrazone functions increases. For these polymeric acylhydrazones, with functions in the main chain or the side chains, there are various applications in water medium. From the fundamental fields of rod-like structures to more applied domains such as enzyme inhibition or drug delivery, the dynamic aspect of these bonds provides great potency. In order

to succeed in these applications, the polyacylhydrazones, whether synthesized in water or in organic solvents, need to be water-soluble enough despite the high number of hydrogen bonds.

Various strategies have been developed in the literature to ensure a satisfactory water-solubility such as: i) a solubilization in an organic solvent then a dilution in water, ii) a direct solubilization in a water-organic co-solvent, iii) a use of ionic monomers or pending moieties, iv) or the biopolymer development with the use of highly water-soluble monomers.

Despite being a major limitation for the development of polyacylhydrazones, the water-solubility is seldomly deeply analyzed in most of the papers cited in this review. In order to match the rapidly growing application field of these polymers, such studies would be welcome to help produce better-designed water-soluble polyacylhydrazones.

IV. Le projet DynaSWEET dans ce contexte

Les paragraphes suivants ont pour but de situer le sujet de cette thèse, d'en comprendre ses contours et ses stratégies dans son contexte scientifique. Dans ce but, il semble également important de présenter brièvement les sujets de thèse (préalables ou en réalisée en parallèle à celle-ci), qui ont eu un impact direct sur la création et le déroulement du projet DynaSWEET. Ce projet est financé par l'ANR (<https://anr.fr/Projet-ANR-17-CE07-0054>) et regroupe les laboratoires ICBMS UMR 5246, responsable projet : Sébastien Vidal, Écologie Microbienne UMR 5557, responsable projet : Benoit Cournoyer, et le laboratoire dans lequel cette thèse a été effectuée, IMP UMR 5223, responsable projet : Catherine Ladavière.

1. Présentation d'inhibiteurs de *Pseudomonas aeruginosa*

Comme énoncé précédemment, PA est une bactérie multirésistante aux antibiotiques et la source d'enjeux sanitaires publiques importants. Son mécanisme d'action comprend la formation d'un biofilm, qui lui permet de se multiplier en se protégeant physiquement de ce qui peut lui nuire. Pour se fixer aux cellules épithéliales et au biofilm, elle utilise plusieurs modes d'action, dont la liaison de certaines de ses protéines, les lectines, à des sucres. L'inhibition de ces lectines (notamment, LecA et LecB) est donc une stratégie pertinente pour lutter contre PA.

Plusieurs inhibiteurs ont ainsi présenté des constantes d'affinité satisfaisantes avec les lectines de PA, particulièrement ceux composés d'un cœur avec des sucres en épitope (*i.e.* glycoclusters), sucres pour lesquels les lectines ont une affinité et une sélectivité connue. Ainsi, les travaux de thèse de Samy Cecioni au LCO2 à l'ICBMS (soutenue devant l'UCBL en 2010)²⁰⁸ ont permis d'obtenir un portfolio de glycoclusters avec cette approche multivalente. Certaines structures (à base de calixarènes, de porphyrine, de résorcinarène, ou de fullerène) ont démontré avoir des constantes d'association très satisfaisantes avec les lectines LecA et LecB, ainsi qu'une activité biologique.

2. Des ligands dynamiques pour LecA et LecB...

Suite à cette thèse de Samy Cecioni, celle de Yoann Pascal, toujours au LCO2 (soutenue devant l'UCBL en 2018)²⁰⁹, a permis de développer un nouveau type de ligands : les glycodyn[n]arènes. Ceux-ci, préparés par chimie combinatoire dynamique, sont composés de briques dithiophénols avec des sucres en épitope (mannose comme ligand pour la lectine ConA, et fucose comme ligand inertes vis-à-

vis de ConA, Figure 52). La lectine ConA est une glycoprotéine tétramérique d'origine végétale non présente sur la surface de PA.

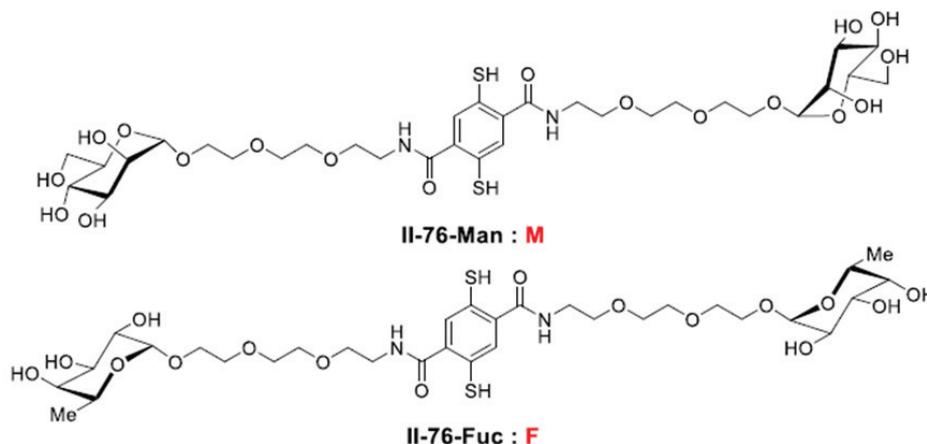


Figure 52 - Briques moléculaires dithiophénol utilisées pour la préparation des dynarènes par CCD. En haut, la brique porte des épitopes mannose (code : M). En bas, elle porte des épitopes fucose (code : F).²⁰⁹

La BCD établie et caractérisée dans cette thèse par chromatographie liquide à détection de spectrométrie de masse (LC-MS) montre une amplification des macrocycles homotopiques de 3 et 4 briques de mannose à la suite de l'introduction de la lectine ConA (Figure 53), mais également une augmentation des macrocycles de fucose par effet agoniste. Une fois isolés, ces homodynarènes de mannose en équilibre ont présenté une constante d'affinité mesurée, K_d , de l'ordre du nanomolaire, donc comparable aux espèces avec des cœurs statiques étudiées précédemment, notamment dans la thèse de Samy Cecioni.

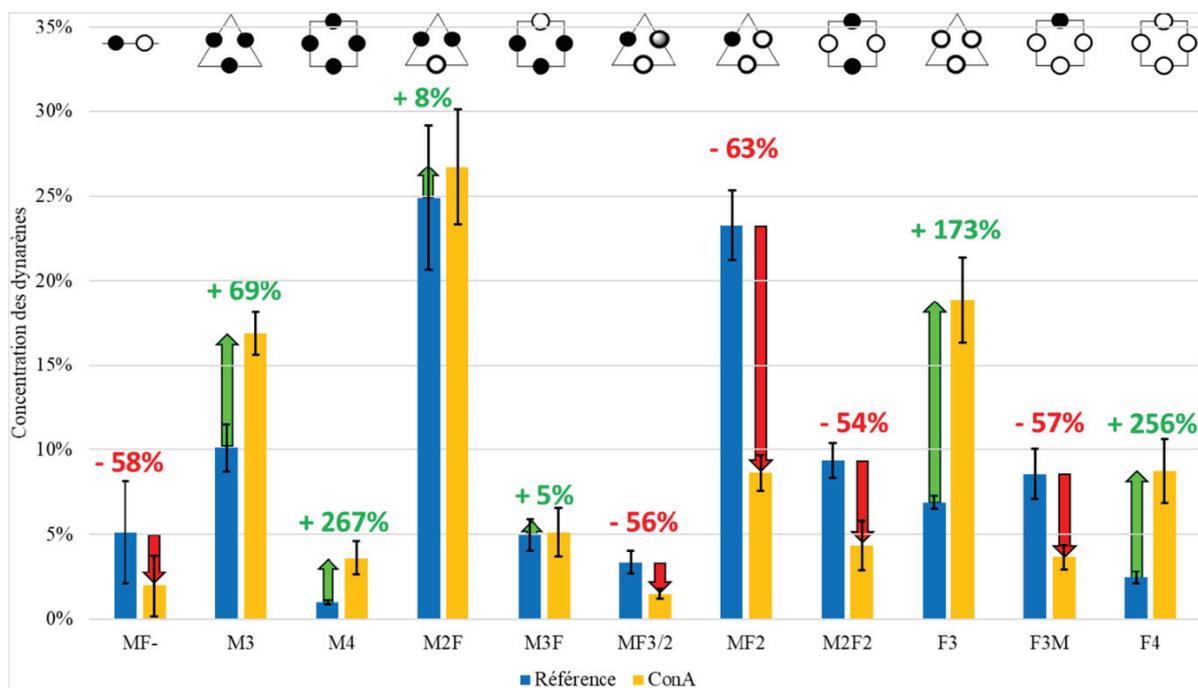


Figure 53 - Comparaison des BCD, déterminées par LC-MS, avant et après introduction de la lectine ConA (qui présente une affinité naturelle pour le mannose). « M » et « F » correspondent aux briques moléculaires portant des épitopes mannose et fucose, respectivement. Ainsi, « M2F » correspond à un macrocyle composé de deux briques M et d'une brique F.²⁰⁹

A la suite de cette thèse, celle de Fanny Demontrond au LCO2 (soutenue devant l'UCBL en décembre 2021)²¹⁰ avait pour principal objectif d'adapter ce genre de BCD aux lectines de PA, LecA et LecB. Ainsi, en reprenant la même structure élémentaire de brique moléculaire, mais en utilisant des épitopes galactose et fucose (les ligands naturels des lectines LecA et LecB, respectivement, donnant ainsi les briques « G » et « F »), il fut montré par LC-MS que les glycodyn[3]arènes et glycodyn[4]arènes macrocycliques homotopiques, comportant les ligands naturels, étaient amplifiés (Figure 54). Les autres espèces étaient amplifiées par effet agoniste. La séparation de chaque composé individuel ne pouvant être effectuée en raison d'une rééquilibration de la BCD, il a été montré par ITC que le couple homotopique à 3 et 4 briques avec les sucres naturels était celui ayant la meilleure affinité avec les lectines (G3/G4 pour LecA, et F3/F4 pour LecB). Ces composés furent ainsi réutilisés sous leur forme équilibrée pour des tests d'activité biologique dans le laboratoire Écologie Microbienne. Ainsi, ces résultats confirment l'effet pertinent de la multivalence des ligands sur leur adhésion à des protéines, mis en évidence dans les thèses de Cecioni et Pascal, d'autant plus que dans ce dernier travail de Fanny Demontrond, ce sont les lectines elles-mêmes qui sélectionnent les meilleurs ligands par CCD, et non une conception prédéfinies et statique des ligands.



Figure 54 - Comparaison des BCD, déterminées par LC-MS, avant et après introduction des lectines LecA et LecB. « G » et « F » correspondent aux briques moléculaires (Figure 52) portant des épitopes galactose et fucose, respectivement. Ainsi, « G1F2 » correspond à un macrocycle composé d'une brique G et de deux briques F.²¹⁰

3. ...aux polymères dynamiques pour la bactérie

Le projet DynaSWEET a ainsi pour objectif de combiner ces dynarènes de sucres, capable de s'auto-agencer à la valence des lectines de PA, mais également de relier ces dynarènes entre eux avec des bras « espaceurs » pour obtenir des polymères capables de se lier à plusieurs lectines d'une même bactérie. Dans ce projet, les liaisons entre les dynarènes et les bras « espaceurs » sont également prévues pour être dynamiques, afin d'obtenir un polymère dynamique (*i.e.* dynamère) capable d'ajuster sa masse molaire (grâce à l'insertion de plusieurs bras « espaceurs » de différentes longueurs), et sa valence aux lectines considérées. Ainsi, le dynamère visé est attendu comme étant capable de s'adapter aux lectines de surface des bactéries et les inhiber ainsi (Figure 55).

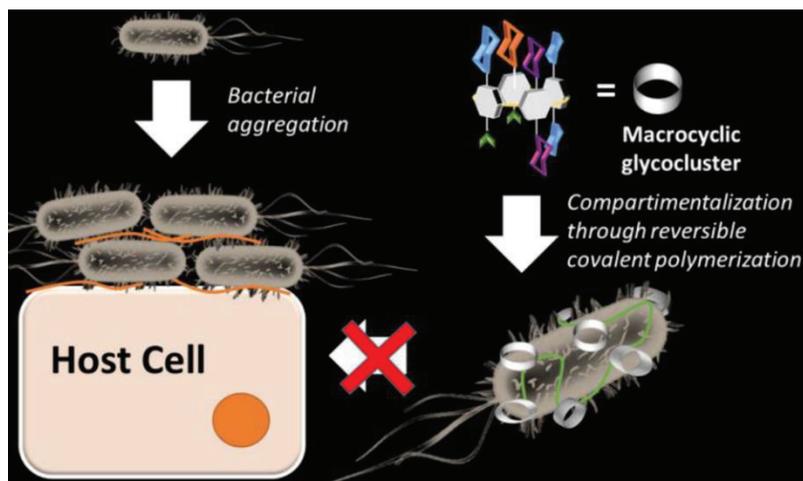


Figure 55 – Objectif schématisé du projet DynaSWEET, faisant appel à la synthèse de glycoclusters dynamiquement (glycodyn[n]arènes), reliés entre eux par des bras « espaceurs » ou « linkers » de manière dynamique. Tout ceci conduisant à l'isolation des bactéries PA, en les empêchant ainsi d'adhérer aux cellules et au biofilm.

Pour cela, la liaison choisie est la fonction acylhydrazone, qui est à la fois biocompatible et orthogonale aux liaisons disulfure utilisées pour la confection des dynarènes. Notons que le domaine de réversibilité de la fonction acylhydrazone est en milieu acide, contrairement au milieu basique pour les liaisons disulfures. Le design du dynamère final de DynaSWEET correspond donc à un poly(acylhydrazone) alterné composé de monomères dynarènes et de monomères « espaceurs » (ou « linkers » en anglais). Ces monomères présenteront deux fonctions aldéhyde (dialdéhydes) ou deux fonctions hydrazide (dihydrazides).

Ainsi, l'objectif de cette thèse s'inscrit dans le projet DynaSWEET en proposant de synthétiser des polyacylhydrazones en milieu aqueux, de les caractériser en fonction de divers *stimuli*, et d'étudier leur aspect dynamique. Cette stratégie s'inscrit donc pleinement dans la continuité des travaux visant à développer des solutions novatrices contre *Pseudomonas aeruginosa*. Par ailleurs, les recherches réalisées durant cette thèse sont également novatrices de par la chimie dynamique combinatoire examinée, impliquant des polyacylhydrazones solubles dans l'eau.

Chapitre II :

Synthèse et caractérisation de polyacylhydrazones à partir de monomères « modèles »

Sommaire du chapitre

I.	INTRODUCTION	82
II.	ÉTUDE DE LA SOLUBILITE DES MONOMERES « MODELES » ET DES POLYACYLHYDRAZONES	84
1.	<i>Limites de précipitation</i>	84
a.	Solubilité dans l'eau	84
b.	Solubilité dans un mélange eau/DMSO.....	85
c.	Solubilité dans le DMSO	86
2.	<i>Étude des précipités de la réaction</i>	86
a.	Essais de resolubilisation.....	86
b.	Caractérisation du précipité de la réaction DHS/GA	87
III.	MISE EN EVIDENCE DE LA POLYMERISATION	89
1.	<i>Caractérisation par spectroscopie UV-Visible</i>	89
2.	<i>Caractérisation par HPLC</i>	90
3.	<i>Caractérisation par SEC</i>	92
a.	SEC utilisant un éluant aqueux.....	92
b.	SEC utilisant le DMSO comme éluant.....	97
4.	<i>Caractérisation par RMN</i>	98
a.	Synthèse dans le D ₂ O	98
b.	Synthèse dans le DMSO-d ₆	99
i.	Étude cinétique	100
ii.	Interprétation mécanistique	103
5.	<i>Caractérisation par spectrométrie de masse</i>	107
a.	Monomères.....	107
b.	Réactions de polymérisation	108
6.	<i>Conclusion.....</i>	112
IV.	INFLUENCE DU PH SUR LA POLYMERISATION	114
1.	<i>Suivi cinétique par HPLC</i>	114
2.	<i>Caractérisation par SEC</i>	117
3.	<i>Caractérisation par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....</i>	119
4.	<i>Suivis cinétique par RMN</i>	120
a.	Suivi cinétique avec ajout d'acide	120
b.	Comparaison avec la réaction non catalysée	123
5.	<i>Conclusion.....</i>	125
V.	CONCLUSION SUR LES POLYACYLHYDRAZONES A BASE DE MONOMERES « MODELES »	126

I. Introduction

Dans un premier temps, afin d'optimiser les conditions de synthèse et de caractérisation de polyacylhydrazones (PACH), celles-ci ont été mises au point à partir de monomères disponibles commercialement, à des coûts raisonnables, et en grande quantité. Pour toutes ces raisons, ils sont nommés « modèles » dans ce manuscrit. Le choix de ces monomères s'est porté sur des dihydrazides et des dialdéhydes possédant une solubilité dans l'eau satisfaisante et une structure chimique simple (faible masse molaire et fonctions d'intérêt accessibles sans perturbation de fonctions réactives annexes). Le dihydrazide succinique (DHS, Figure 56A) a été sélectionné comme dihydrazide « modèle ». Quant au glutaraldéhyde (GA, Figure 56B) en solution aqueuse 25% ou 70% massique, au téréphthalaldéhyde (TPA, Figure 56C), et au 2,3-thiophènedicarboxaldéhyde (TDC, Figure 56D), ils ont été choisis comme dialdéhydes « modèles ». Par la suite, ces monomères seront mentionnés selon leur abréviation respective.

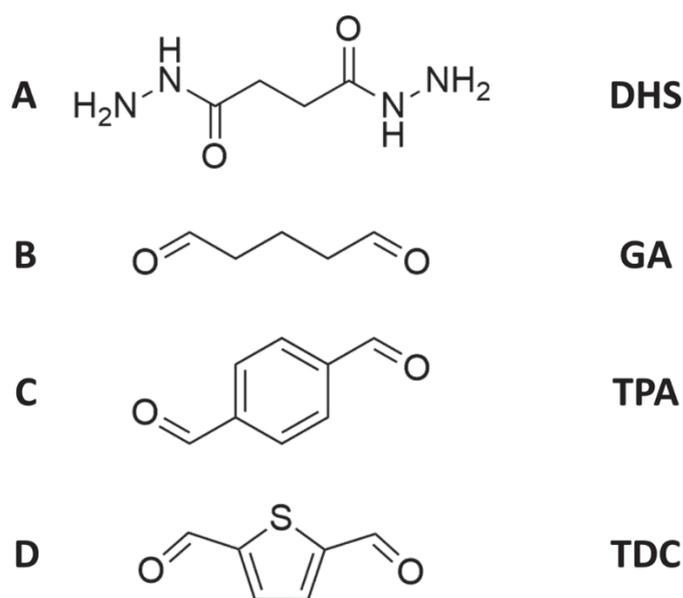


Figure 56 - Monomères « modèles » utilisés dans ce travail de thèse. A) dihydrazide succinique, B) glutaraldéhyde, C) téréphthalaldéhyde, D) 2,3-thiophènedicarboxaldéhyde.

La synthèse des PACH avec des monomères (dihydrazides et dialdéhydes) simples a été décrite dans de nombreux articles, par le groupe de Lehn^{84,185,186,211}, de Daines *et al.*⁹⁵ ou, plus récemment, de Psarrou *et al.*¹⁰⁷. Dans ces articles, les monomères sont introduits en proportions équimolaires, et la réaction est catalysée par un ajout d'acide (acétique, chlorhydrique, ou trifluoroacétique) ou de catalyseur dérivé de l'aniline. Ainsi, basé sur ces travaux, la synthèse de PACH mise au point dans cette

thèse à partir des monomères « modèles » a fait intervenir un ajout équimolaire de monomères. Cette réaction a été éventuellement catalysée par ajout d'acide.

Ce Chapitre II a pour but de présenter les recherches concernant cette synthèse de PACH à partir de ces monomères « modèles » et leur caractérisation. Dans un premier temps, la solubilité des monomères et des polymères sera étudiée dans l'eau, un mélange eau/DMSO, ou le DMSO, puis plusieurs techniques de caractérisation seront mises à profit pour démontrer la présence de PACH. Enfin, l'influence du pH sur ces polymères sera étudiée en utilisant plusieurs techniques de caractérisation.

II. Étude de la solubilité des monomères « modèles » et des polyacylhydrazones

Étant donné que la polymérisation de comonomères repose sur l'homogénéité de la solution initiale, l'étude de la solubilité (tant des monomères que des espèces formées après la réaction) s'est révélée indispensable, à travers la détermination des limites de concentration pour lesquelles on observe une précipitation.

1. Limites de précipitation

a. Solubilité dans l'eau

Comme mentionné précédemment, les monomères ont été choisis pour leur hydrosolubilité. Néanmoins, la mise en contact de deux solutions de monomères hydrosolubles (un dihydrazide et un dialdéhyde, en l'occurrence) peut mener, selon le couple utilisé, à une précipitation à ces échelles de concentration. Le Tableau 1 montre que la concentration totale la plus élevée atteignable sans précipitation est de 0,5 mg/mL, pour le couple DHS/GA. Notons que cette concentration est relativement faible (par exemple pour réaliser des caractérisations par RMN).

Tableau 1 - Concentration maximale pour chaque couple de monomères « modèles » dans l'eau sans précipitation visuelle.

Couple de monomères utilisé (1:1 mol./mol.)	Concentration maximale sans précipitation visuelle dans l'eau (mg/mL total)
DHS et GA	0,5
DHS et TPA	< 0,02
DHS et TDC	< 0,1

Afin d'augmenter cette concentration limite de solubilité dans l'eau, la réaction entre le DHS et la GA a été menée en fixant la concentration maximale totale déterminée à 0,5 mg/mL (soit environ 2 mM/monomère), et en ajoutant une quantité d'acide. Un ajout de 0 ou 40 équivalents molaires (par rapport à la totalité des monomères) d'acide acétique glacial AcOH ou d'acide chlorhydrique HCl (respectivement pH = 6, 4 ou 1) a été effectué. Dans tous les cas, la réaction n'a pas montré de signe de précipitation visuelle, instantanée ou après 7 jours de réaction. En revanche, après 6 jours de réaction catalysée par HCl puis une basification par de la triéthylamine (NEt₃), la réaction a conduit à

une légère précipitation des produits, mais celle-ci lancée directement dans des conditions basiques (40 équivalents de NEt_3 correspondant à un pH de 10) n'a pas montré de précipitation. Ainsi, la concentration définie au paragraphe précédent (0,5 mg/mL dans l'eau) permet de s'affranchir d'une précipitation pour des pH allant de 1 à 10 (sauf dans le cas d'une basification de la solution après une acidification, qui peut conduire à une précipitation partielle).

b. Solubilité dans un mélange eau/DMSO

Afin de pouvoir atteindre des concentrations encore plus élevées, la solubilité du couple DHS/GA a été évaluée dans un mélange eau/DMSO, à différentes proportions volumiques. Le DMSO a été choisi car il s'agit d'un des solvants permettant la meilleure solubilisation des polyacylhydrazones (comme le DMF mais, celui-ci étant plus toxique, il est donc moins pertinent pour des applications biomédicales à long terme). La Figure 57 représente le seuil de précipitation en fonction de la concentration totale des monomères (abscisse) et de la proportion d'eau dans le mélange eau/DMSO (ordonnée).

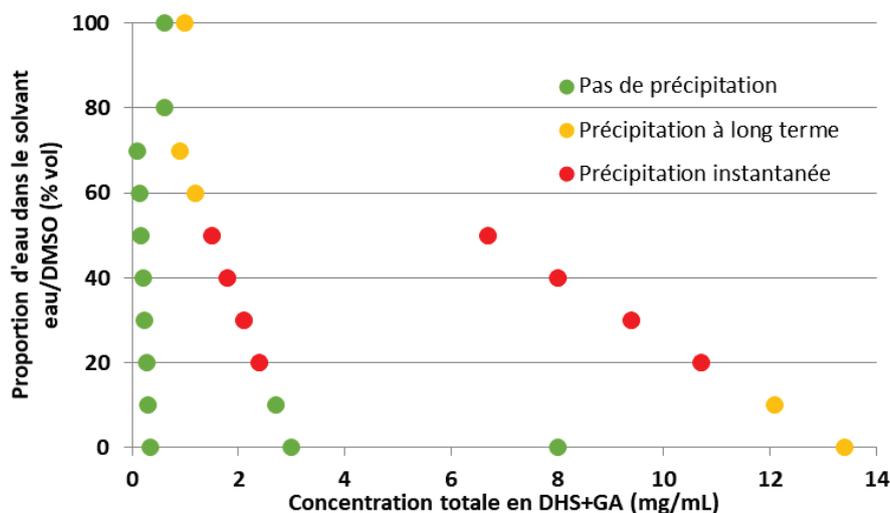


Figure 57 - Seuil de précipitation de la réaction de polymérisation du couple DHS/GA, en fonction de la concentration totale en DHS + GA, et de la proportion volumique d'eau dans un solvant eau/DMSO.

Cette figure montre, de manière étonnante, que l'ajout de DMSO ne semble pas aider à atteindre une concentration de solubilité plus élevée. Par ailleurs, il semble que seul un mélange eau/DMSO présentant une fraction en DMSO proche de 100% peut nettement améliorer la solubilité.

c. Solubilité dans le DMSO

Ainsi, la solubilité dans le DMSO pur a été évaluée, même si elle s'éloigne de l'intérêt du projet (*i.e.* un polyacylhydrazone formé *in situ* dans l'eau), car elle ouvre des possibilités de caractérisation qui ne sont pas atteignables dans l'eau avec ces monomères. Le Tableau 2 indique les concentrations maximales obtenues sans précipitation visuelle dans le DMSO. Il révèle que les couples DHS/TDC et DHS/GA permettent d'obtenir des solutions d'environ 10 mg/mL sans précipitation (concentration suffisante, en particulier pour une caractérisation par RMN).

Tableau 2 - Concentration maximale de la réaction sans précipitation visuelle pour chaque couple de monomères « modèles » dans le DMSO.

Couple de monomères utilisé (1:1 mol./mol.)	Concentration maximale sans précipitation visuelle dans le DMSO (mg/mL total)
DHS et GA	8,0
DHS et TPA	1,0
DHS et TDC	10,0

2. Étude des précipités de la réaction

Afin de comprendre la raison des précipitations observées dans certaines conditions de la réaction de polymérisation, certains précipités ont été isolés par centrifugation/lyophilisation et ont été analysés. Ces analyses sont l'objet de cette partie.

a. Essais de resolubilisation

Afin d'analyser ces précipités, des essais de resolubilisation des produits de la réaction DHS/GA ont été effectués dans différents solvants. Le Tableau 3 présente ainsi l'aspect visuel des solutions après 3 jours d'agitation magnétique, précédée de 20 min dans un bain à ultrasons. Les essais réalisés sur un autre précipité, celui issu de la réaction DHU/GA (le DHU étant un dihydrazide qui sera présenté plus tard dans le manuscrit, Chapitre IV), sont également présentés dans ce tableau.

Tableau 3 - Aspects visuels après resolubilisation des précipités dans différents solvants.

Solvant_Couple de monomères	Concentration (mg/mL)	Aspect de la solution après 3j d'agitation magnétique et de bain à ultrasons
DMSO_DHS/GA	1,0	Trouble, présence de particules en suspension
Eau permutée_DHS/GA	1,0	Non solubilisé
CDCl ₃ _DHS/GA	1,0	Non solubilisé
HFIP_DHS/GA	1,0	Non solubilisé
Solution d'urée 2M_DHS/GA	0,5	Non solubilisé
DMF_DHS/GA	1,0	Trouble, présence de particules en suspension
Ether diéthylique_DHU/GA	1,0	Non solubilisé
AcOH glacial_DHU/GA	1,0	Présence de particules en suspension

Ce tableau montre ainsi que les solvants organiques apolaires (chloroforme CHCl₃ et éther) ne solubilisent pas les précipités, de même que l'eau ou l'acide acétique. L'hexafluoro-2-propanol (HFIP), connu pour solubiliser les polyamides, n'a pas plus d'utilité. Une solution d'urée, agent chaotropique qui pourrait altérer les éventuelles liaisons hydrogène intermoléculaires, ne permet pas non plus une resolubilisation. Les meilleurs solvants, sans être idéaux (resolubilisation incomplète), semblent être le DMSO et le DMF, comme mentionné dans la littérature.^{72,84,177} La resolubilisation des précipités étant impossible, il a fallu faire appel à la spectroscopie infrarouge ATR pour analyser les précipités.

b. Caractérisation du précipité de la réaction DHS/GA

Une caractérisation du précipité DHS/GA a été effectuée par spectroscopie infrarouge ATR, en comparant le DHS au précipité issu du mélange DHS/GA (Figure 58). Les bandes vers 3200 cm⁻¹ du spectre sont attribués aux liaisons N-H, tandis que la fine bande vers 1660 cm⁻¹ est attribué à la liaison C=N, qui se superpose avec la bande à 1625 cm⁻¹, correspondant à la liaison C=O.

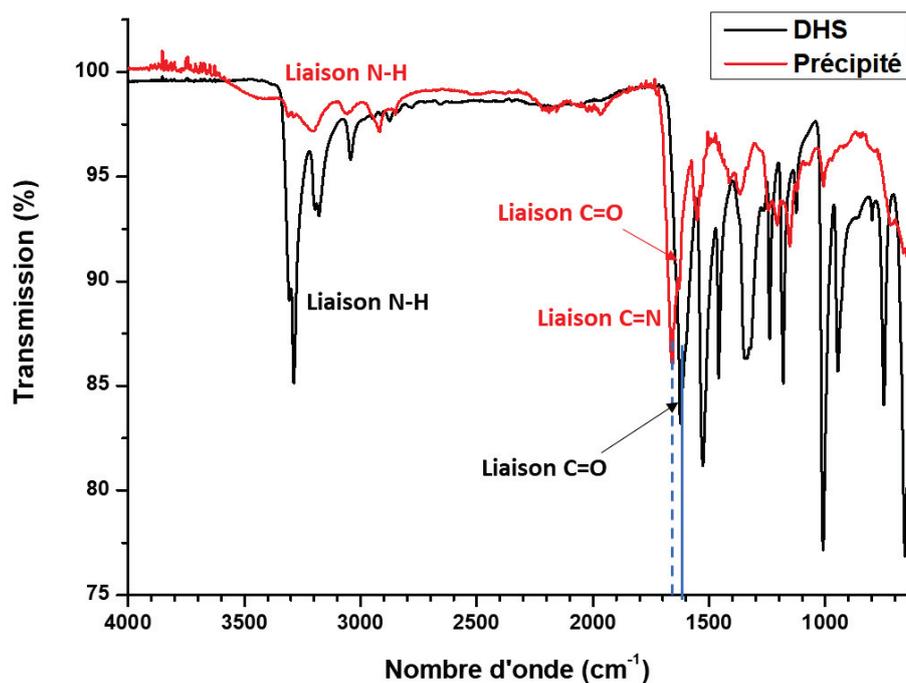


Figure 58 - Spectre de transmission infrarouge ATR (à température ambiante) comparant le dihydrazide succinique (DHS) au précipité issu du mélange DHS/GA.

À la lumière de ces éléments, il est possible que le précipité soit effectivement du PACH. Cependant, sans possibilité de resolubiliser celui-ci, il a semblé difficile d'en confirmer avec certitude sa nature. Ainsi, d'autres analyses ayant lieu en solution ont été réalisées, et seront présentées dans les parties suivantes.

III. Mise en évidence de la polymérisation

Afin de prouver la présence de PAcH résultant de la réaction entre les monomères « modèles » (lorsque la solution finale a été observée limpide), plusieurs techniques de caractérisation complémentaires ont été utilisées, à savoir les spectroscopies UV-Visible et RMN, les chromatographies HPLC et SEC, et la spectrométrie de masse.

1. Caractérisation par spectroscopie UV-Visible

Les fonctions hydrazide et acylhydrazone absorbent en UV. Ainsi, il apparaît pertinent de caractériser l'absorbance de la réaction, et de la comparer aux solutions de monomères. La Figure 59 représente donc les spectres UV-Visibles de toutes ces solutions (DHS, GA, et DHS/GA), dont l'absorbance est comparable, car la concentration de chaque monomère y est identique (1 mM). On y voit que la réaction (DHS/GA) conduit à une augmentation conséquente de l'absorbance entre 230 (limite basse de l'appareil) et 270 nm après 2 h de réaction.

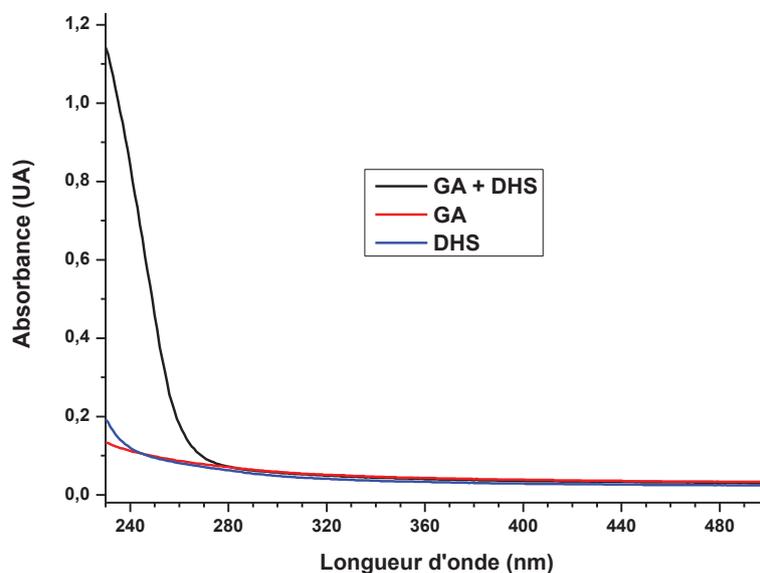


Figure 59 - Spectres UV-Visible des solutions de monomères (GA et DHS, 1 mM) et de la réaction de polymérisation DHS/GA (après 2h de réaction, 1 mM/monomère) dans l'eau. Le spectre de GA est totalement superposable au spectre UV du blanc, l'eau (non montré ici).

Cette augmentation d'absorbance vers 230 nm semble donc indiquer que la réaction entre le DHS et le GA a bien lieu, d'autant que la Figure 60 démontre que l'absorbance pour des longueurs d'onde comprises entre 230 et 270 nm ne fait qu'augmenter au cours du temps. Les monomères

utilisés étant aliphatiques, et ne comprenant que les fonctions hydrazide et aldéhyde comme fonctions réactives, ces évolutions sont encourageantes car elles peuvent indiquer, de façon indirecte, la polymérisation.

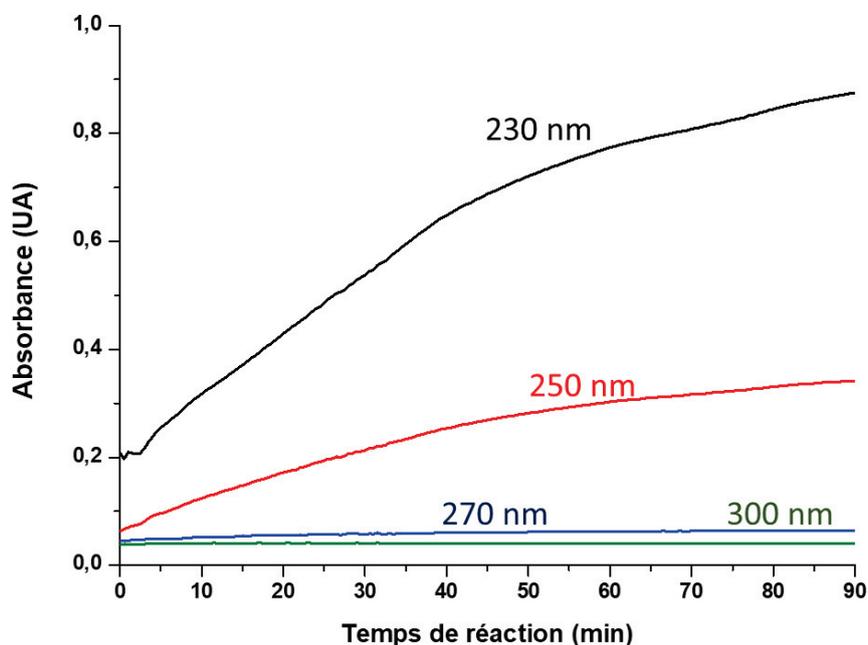


Figure 60 - Suivi cinétique de l'absorbance du milieu réactionnel de polymérisation (GA/DHS), en fonction de la longueur d'onde (mêmes conditions qu'en **Figure 59**).

2. Caractérisation par HPLC

En plus de la caractérisation du précipité de la réaction par spectroscopie infrarouge ATR déjà reportée, le surnageant a également été analysé par HPLC {Chaîne A, Colonne HPLC 1}. Son chromatogramme (détection UV à 250 nm, tracé vert) est comparé sur la Figure 61 à celui d'une solution de DHS (tracé bleu) et de GA (tracé rouge) de même concentration. On y voit ainsi, qu'après quelques jours, la réaction conduit à l'apparition d'un pic de forte absorbance vers 5,7 min, pouvant correspondre à des espèces formées comportant des fonctions acylhydrazone. Ceci corréle l'augmentation de l'absorbance observée sur les spectres UV-Vis dans la partie précédente. On peut également observer que la réaction n'est pas complète, car un pic ayant le même volume d'éluion que la solution de DHS existe vers 4,5 min. L'origine de la présence de deux pics (vers 3,5 et 4,5 min) pour la solution de DHS (tracé bleu) sera discutée dans le prochain chapitre du manuscrit.

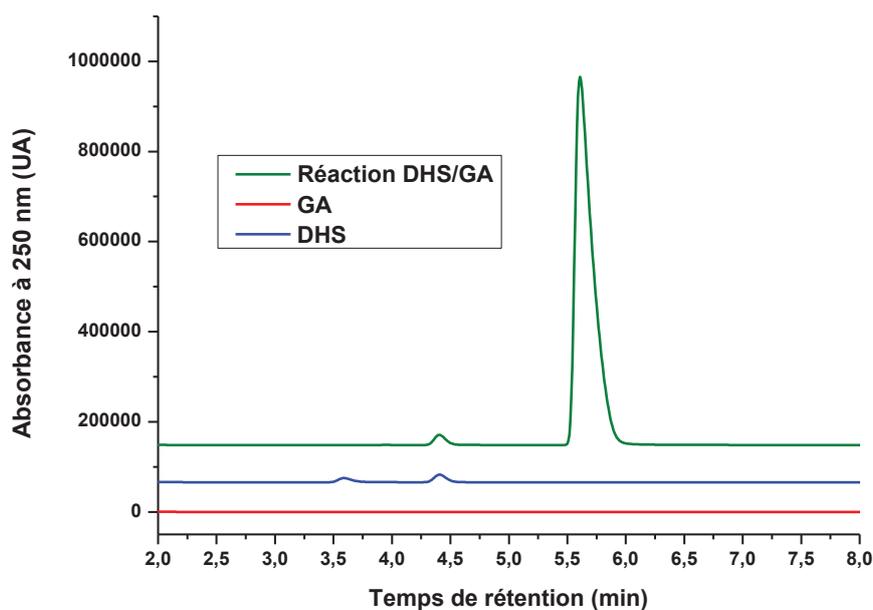


Figure 61 - Chromatogrammes du surnageant de la réaction DHS/GA (en vert) et des solutions de monomères DHS (en bleu) et GA (en rouge). Éluant = Eau, $\lambda = 250$ nm. {Chaîne A, Colonne HPLC 1}.

L'évolution de ce pic vers 5,7 min en fonction du temps (Figure 62) a donc été analysée par HPLC {Chaîne A, Colonne HPLC 1}, en utilisant une concentration initiale totale en monomères DHS et GA de 0,5 mg/mL dans l'eau (permettant de ne pas avoir de précipitation). L'apparition de ce pic et sa progression avec le temps, pouvant correspondre à l'apparition de PACH, apporte une nouvelle preuve indirecte de la polymérisation. Quant à la progression de l'aire de ce pic avec le temps, elle sera traitée plus tard dans ce Chapitre II, lors de l'étude cinétique de cette polymérisation.

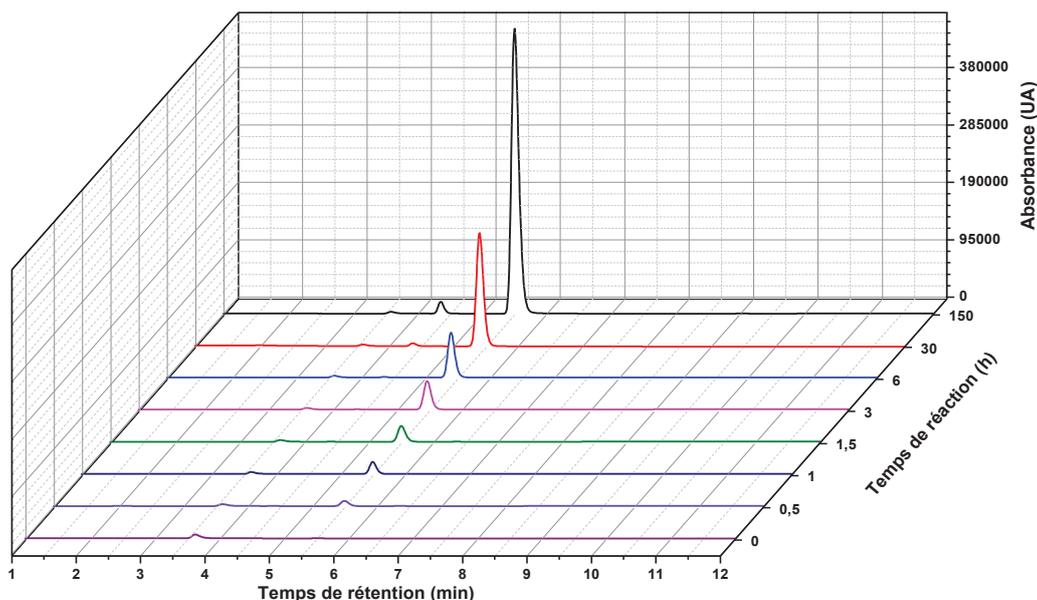


Figure 62 - Superposition de chromatogrammes à différents temps de réaction entre le DHS et le GA à 0,5 mg/mL dans l'eau. Éluant = Eau, $\lambda = 250$ nm. {Chaîne A, Colonne HPLC 1}.

3. Caractérisation par SEC

a. SEC utilisant un éluant aqueux

La réaction entre le DHS et le GA dans l'eau à 0,5 mg/mL, suite à 24h d'agitation à température ambiante, a été tout d'abord caractérisée par SEC {Chaîne A et Colonnes SEC 1, à savoir 2 colonnes : TSKGel PWG6000® + TSKGel PWG2500® de chez Tosoh, injection de 100 μ L de la solution sans dilution, filtrée sur 0,45 μ m}. L'éluant est un tampon carbonate à 0,1 M, pH = 9. Notons qu'en parallèle de l'utilisation de ces {Colonnes SEC 1}, une colonne TSKGel G-Oligo PW® de chez Tosoh a également été testée en série avec ces {Colonnes SEC 1}, représentant ainsi *in fine* 3 colonnes en série. Ceci avait pour objectif d'augmenter la résolution de la séparation des espèces vers les faibles masses molaires (Figure 63). En effet, cette colonne TSKGel G-Oligo PW® est attendue pour présenter une séparation de haute résolution pour des oligomères hydrosolubles et des oligosaccharides. D'après le fournisseur, sa phase stationnaire est constituée d'une matrice de « polyméthacrylate hydroxylée », et peut être utilisée avec un maximum de 20% volumique d'éluant organique.²¹² Cependant d'après la Figure 63B, le signal RI du chromatogramme, avec 2 ou 3 colonnes en série, se superpose avec celui d'un contrôle contenant seulement de l'eau. Ainsi, les monomères et l'éventuel polymère sont, étonnamment, indétectables en RI. Néanmoins, l'utilisation du détecteur RI va permettre de localiser le front d'élution

(à 18 min avec les 2 colonnes, et 27 min avec les 3 colonnes), qui était, comme attendu, indétectable avec le détecteur UV (à 250 nm). La combinaison de ces deux détecteurs (UV et RI) révèle ainsi que les espèces présentes dans l'échantillon sont éluées à un temps de rétention supérieur à celui du front d'éluion, que cela soit avec 2 ou 3 colonnes en série (Figure 63A). Ceci indique que la séparation des espèces ne se fait pas exclusivement par exclusion stérique, mais que des interactions entre les solutés et la phase stationnaire interviennent également. La phase stationnaire de ces 3 colonnes semble être similaire puisque, d'après Tosoh, les colonnes TSKGel PW sont composées de « billes sphériques à base de polyméthacrylate hydrophile ».²¹²

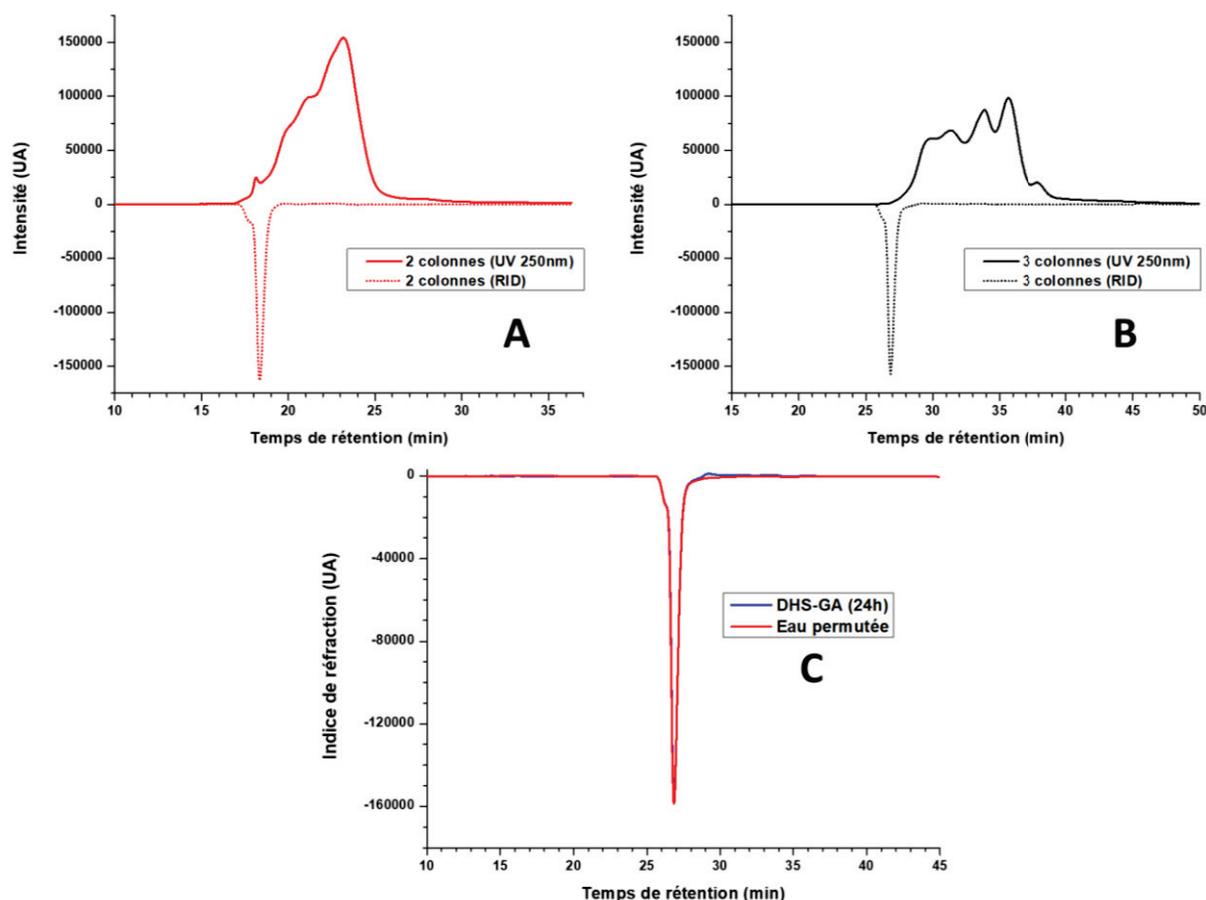


Figure 63 - (A) et (B). Comparaison des chromatogrammes {Chaîne A, Colonnes SEC 1, détection UV et RI} du milieu réactionnel DHS + GA dans l'eau à 0,5 mg/mL, agité 24h, r.t., en utilisant les colonnes TSKGel PWG6000® + PWG2500® (tracé rouge), ou en y incluant, en série, la colonne TSKGel G-Oligo PW® (tracé noir). **(C).** Chromatogrammes {Chaîne A, Colonnes SEC 1} comparant l'éluion du même milieu réactionnel DHS + GA avec celle de l'eau. Éluant = tampon carbonate, 0,1 M, pH = 9.

Des essais ont donc été réalisés afin de comprendre la nature de ces interactions « soluté/phase stationnaire » et ainsi optimiser la séparation des espèces, de façon à ce que cette dernière ne se produise exclusivement que par « exclusion stérique ». Ainsi, la Figure 64 compare les chromatogrammes obtenus avec des éluants de différents pH (tampon acétate pH = 4,5, tampon

phosphate pH = 7,0, tampon carbonate pH = 9,0), à la même concentration (0,1 M). Cette comparaison montre que la séparation entre les massifs de pics et l'aire totale du signal semblent être liées au pH de l'éluant : plus celui-ci est élevé, meilleure semble être la séparation. Quant à l'aire totale du signal UV, elle diffère également en fonction du pH de l'éluant ($A = 3,0 \times 10^7$ UA pour le tampon phosphate ; $A = 1,0 \times 10^7$ UA pour le tampon carbonate, $A = 1,9 \times 10^7$ UA pour le tampon acétate), sans que nous puissions corrélérer les valeurs à une hypothèse. Cependant, même si le pH de l'éluant semble donc jouer un rôle sur la séparation, toutes les éluions restent supérieures au front d'éluion (à 27 min, Figure 63A). Il n'y a donc malheureusement pas d'amélioration quant à l'élimination des interactions « soluté/phase stationnaire » d'ordre enthalpique. Néanmoins, l'éluant en tampon carbonate pH = 9,0 semblant être le meilleur (car un nombre de pics plus élevé, tracé rouge en Figure 64), il sera utilisé par la suite.

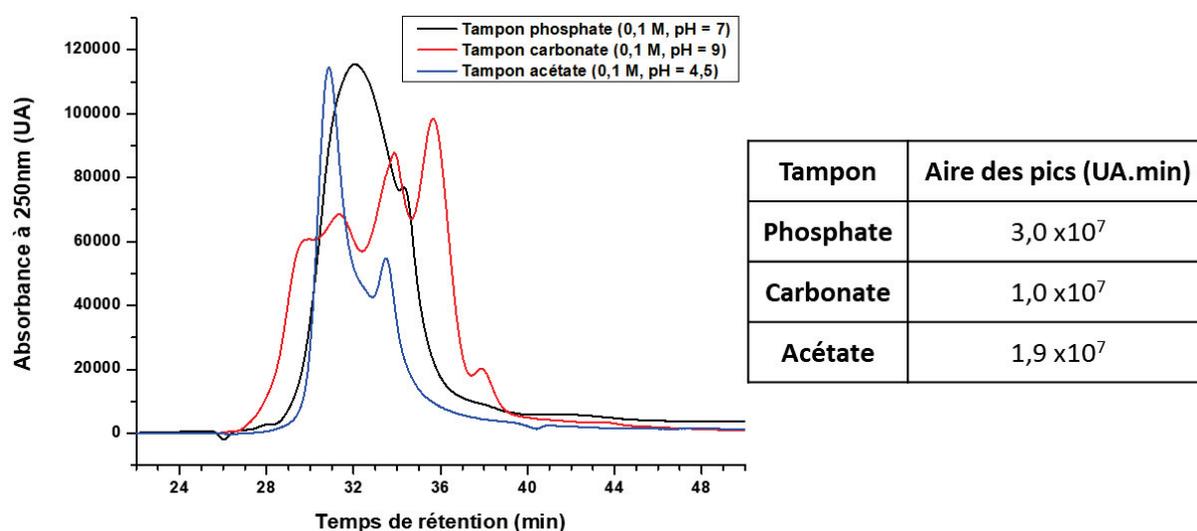


Figure 64 - Comparaison des chromatogrammes du milieu réactionnel DHS + GA (0,5 mg/mL dans eau, suite à 24h d'agitation, r.t.), selon l'éluant (tampon acétate, phosphate, ou carbonate, respectivement de pH 4,5, 7,0 et 9,0, tous à 0,1 M), {Chaîne A, Colonnes SEC 1, TSKGel PWG6000® + PWG2500® + TSKGel G-Oligo PW®}. Détection UV à 250 nm. L'aire de l'ensemble des pics compris entre 28 et 40 min est rapportée dans le tableau pour chaque tampon employé comme éluant.

L'influence de la concentration en sel de l'éluant a également été examinée (Figure 65). L'ajout de 0,3 M de NaCl dans l'éluant tampon carbonate (0,1M pH = 9,0) conduit à un léger déplacement du signal UV vers les temps de rétention plus élevés, tout en conservant l'allure du signal. Ceci pourrait s'expliquer par un accroissement des effets hydrophobes « soluté/phase stationnaire » (rétention supérieure alors sur la colonne) avec l'augmentation de sels dans l'éluant.

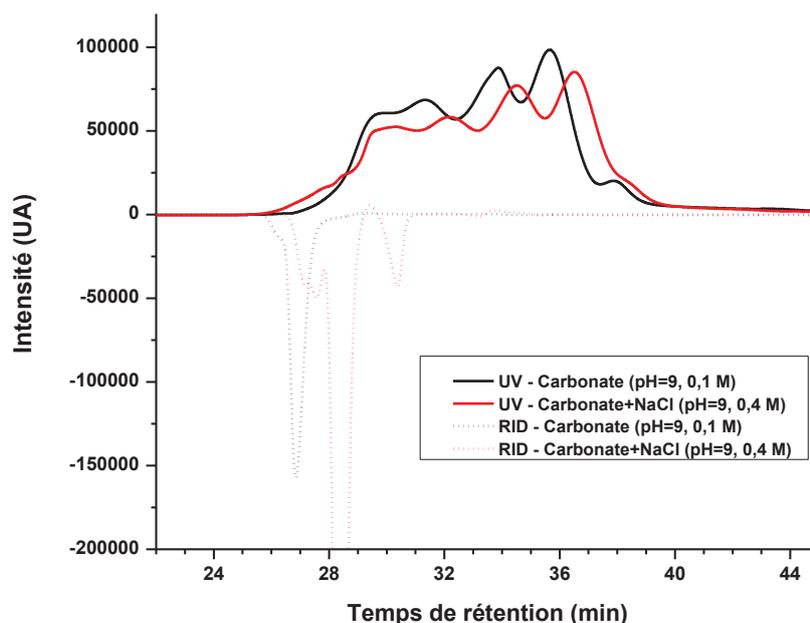


Figure 65 - Comparaison des chromatogrammes de la réaction DHS + GA (0,5 mg/mL dans eau, suite à 24h d'agitation, r.t.), selon la concentration en sel de l'éluant (0,1 M en carbonate = tracé noir, + 0,3 M en NaCl = tracé rouge), {Chaîne A, Colonnes SEC 1, TSKGel PWG6000® + PWG2500® + TSKGel G-Oligo PW®}. Détection UV (250 nm) en traits pleins, RI, en pointillés.

L'ajout d'un co-éluant organique pourrait limiter ces potentiels effets hydrophobes. Ainsi, de l'acétonitrile (ACN, à hauteur de 20 ou 50% volumique) ou de l'isopropanol (iPrOH, à hauteur de 20% volumique) ont été ajoutés dans le tampon carbonate (0,1 M, pH = 9,0). La Figure 66 montre que les temps de rétention des espèces sont effectivement décalés vers les plus faibles temps avec 20 % de co-éluant organique (courbes orange et bordeaux), mais un ajout de 50% d'acétonitrile n'induit pas de changement (courbe verte). De plus, il n'y a pas de différence significative entre l'utilisation d'acétonitrile (courbe bordeaux) et d'isopropanol (courbe orange). Par conséquent, le fait que le co-éluant soit protique ou non ne semble pas avoir d'influence sur les interactions « soluté/phase stationnaire ». Tous ces résultats semblent indiquer que les interactions présentes entre le soluté et la phase stationnaire de la colonne seraient potentiellement une combinaison d'interactions de nature hydrophobe (d'après l'influence de l'ajout d'un co-éluant organique), électrostatique (selon l'influence du pH de l'éluant), mais probablement pas de type liaisons hydrogène (selon l'absence de d'influence du caractère protique du co-éluant).

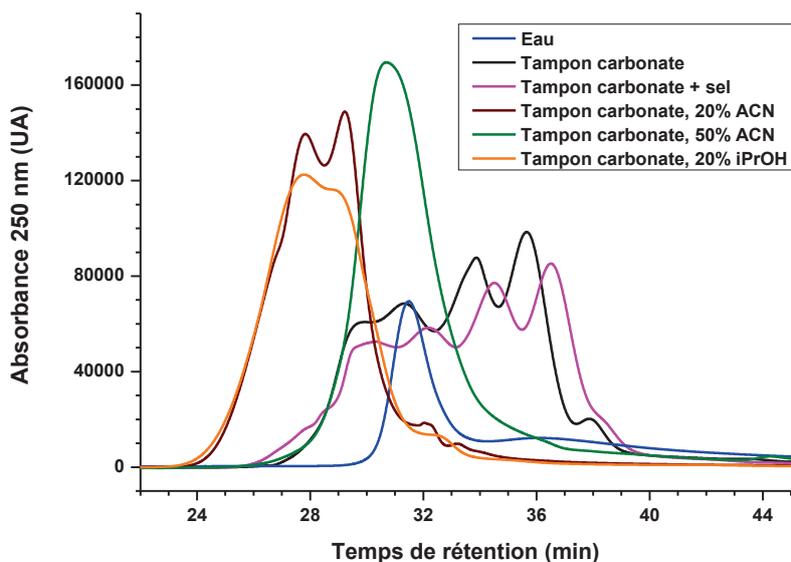


Figure 66 - Comparaison des chromatogrammes de la réaction DHS + GA (0,5 mg/mL dans eau, suite à 24h d'agitation, r.t.), selon la présence ou non d'un co-éluant organique (acétonitrile = ACN, isopropanol = iPrOH, % volumique), {Chaîne A, Colonnes SEC 1, TSKGel PWG6000® + PWG2500® + TSKGel G-Oligo PW®}. Détection UV (250 nm).

Toutefois, quelles que soient les conditions d'analyse employées, l'élution des espèces se situe toujours après celle du front d'élution. Par conséquent, d'autres colonnes de SEC, les Colonnes SEC 2 (PL-Aquagel OH-Mixed-M-8 μ m® + PL-Aquagel OH-Mixed-H-8 μ m® de chez Agilent) ont été testées. Malheureusement, elles ne permettent pas non plus d'obtenir un temps d'élution inférieur (Figure 67). Ces colonnes sont constituées, d'après le fournisseur, d'une phase stationnaire composée de copolymères fonctionnalisés par des groupements polyhydroxyles.

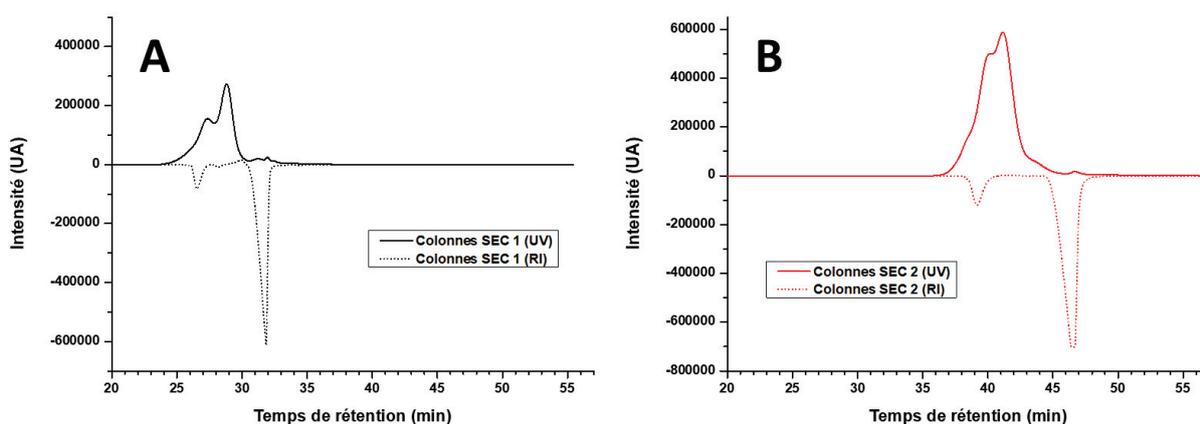


Figure 67 - Comparaison des chromatogrammes de la réaction DHS/GA (0,5 mg/mL dans l'eau, suite à 24h d'agitation, r.t.), obtenus selon le type de colonnes utilisées **(A)** Colonnes SEC 1 en tracé noir, et **(B)** Colonnes SEC 2 en tracé rouge. Détection en UV (250 nm) en traits pleins, et RI en pointillés. Les conditions d'analyse sont strictement identiques entre ces deux types de colonnes. Eluant = acétonitrile/tampon carbonate 0,1 M pH = 9 20/80 (v/v).

b. SEC utilisant le DMSO comme éluant

Suite à ces problèmes d'interactions entre le soluté et la phase stationnaire des colonnes de SEC, des analyses utilisant du DMSO comme éluant ont été effectuées au laboratoire CP2M de l'Université Claude Bernard Lyon 1 (en collaboration avec Olivier Boyron, IR CNRS). Pour cela, un autre couple de monomères, à savoir le DHS et le TDC (à la place du GA) a été employé. Ce couple permet d'atteindre des concentrations bien supérieures à celle utilisées dans l'eau avec le couple GA/DHS (10 mg/mL dans le DMSO contre 0,5 mg/mL dans l'eau). Les chromatogrammes des monomères et de la réaction (après 24h d'agitation à température ambiante) sont présentés sur la Figure 68. Cette fois-ci, les monomères y sont visibles avec le détecteur RI (courbes noire et rouge). Plusieurs raisons peuvent l'expliquer, comme un meilleur contraste entre l'indice de réfraction des monomères et celui du DMSO, un paramètre de sensibilité du détecteur (coefficient de réponse) mieux ajusté, une concentration en monomères plus élevée (20 fois plus). Notons qu'un pic négatif en signal RI peut indiquer que l'indice de réfraction de l'espèce considérée est inférieur à celui du DMSO.

Quant au chromatogramme de la réaction (courbe bleue), il présente deux pics (outre celui du front d'élution vers 33 min), superposables aux deux pics des monomères (courbes rouges et noires). Deux explications pourraient être possibles : (i) soit la réaction n'a pas eu lieu, (ii) soit la réaction est incomplète et les polymères formés sont des oligomères de très faible longueur, de volume très proche de celui des monomères.

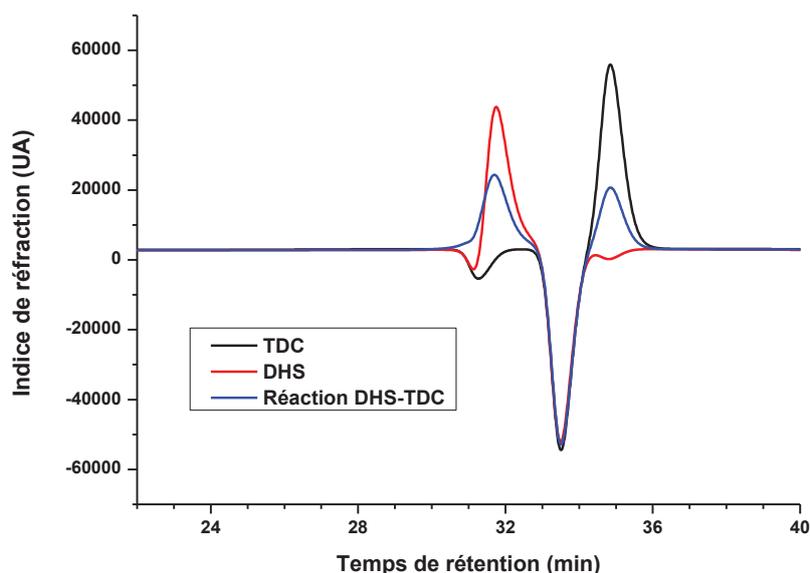


Figure 68 - Comparaison des chromatogrammes des monomères DHS et TDC, et de leur réaction (après 24h d'agitation, r.t., 10 mg/mL dans le DMSO), {Chaîne D et Colonnes SEC 4}. Éluant DMSO, à 40°C. Détection RI.

En utilisant une calibration conventionnelle, il a été possible de déterminer expérimentalement des masses molaires pour ces espèces, soit $M_n = 116 \text{ g.mol}^{-1}$ pour le TDC (attendue à 124 g.mol^{-1}), $M_n = 834 \text{ g.mol}^{-1}$ pour le DHS (attendue à 146 g.mol^{-1}), et $M_n = 936 \text{ g.mol}^{-1}$ pour le pic de la réaction (Figure 69). Il apparaît étonnant que la masse expérimentale du DHS soit si éloignée de sa masse molaire, posant ainsi des questions concernant des possibles réactions secondaires ayant lieu en solution.

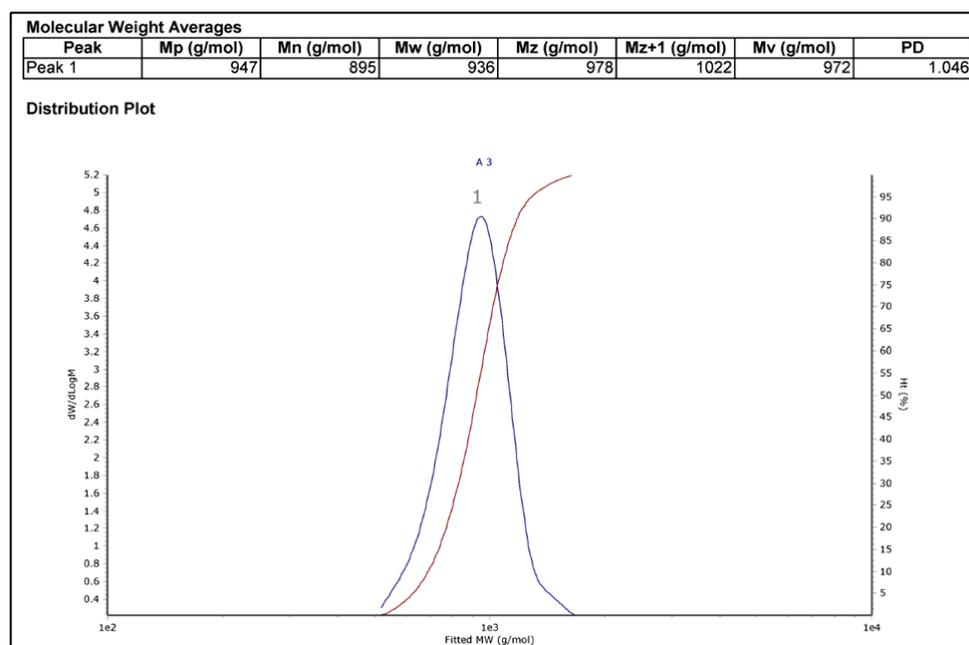


Figure 69 - Distribution en masse molaire du pic de l'éventuel polymère résultant de la réaction, non catalysée, entre le DHS et le TDC (10 mg/mL dans le DMSO, après 24h de réaction), ainsi que les masses molaires moyennes associées.

4. Caractérisation par RMN

Une caractérisation des monomères « modèles » (DHS, GA, TDC) ainsi que des produits de réaction a été effectuée par RMN ^1H , dans le D_2O et le DMSO-d_6 (permettant d'utiliser des concentrations plus élevées).

a. Synthèse dans le D_2O

Tout d'abord, la synthèse avec les monomères DHS et GA a été analysée par RMN ^1H , avec un spectromètre 500 MHz, en collaboration avec la plateforme CCRMN de l'Université Claude Bernard

Lyon 1. Les expériences précédentes ayant eu lieu dans l'eau, la synthèse a été réalisée dans le D₂O, à une concentration totale de 0,5 mg/mL, ce qui est très faible pour une analyse « classique » par RMN. Le spectre RMN ¹H a été enregistré avec une séquence qui permet la suppression du signal très intense à 4,70 ppm correspondant au pic de l'eau inhérent à la solution initiale de GA. Par conséquent, l'analyse de ce spectre a été réalisée en ne prenant pas en compte les signaux dont les déplacements chimiques sont proches de ce pic (Figure 70). Malgré cela, l'attribution des autres pics a été très difficile en raison du manque de résolution et du faible rapport signal/bruit. Le spectre donne cependant des indices de polymérisation, comme le fait que les signaux soient larges, et qu'un signal peut correspondre à une liaison imine (CH=N, vers 7,5 ppm).

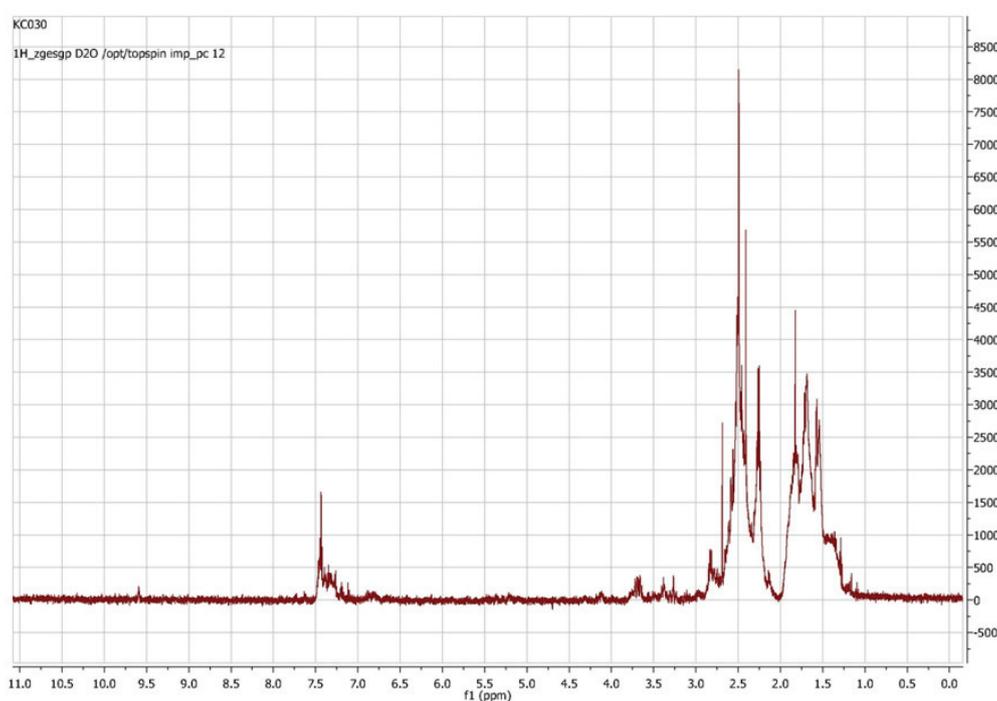


Figure 70 - Spectres RMN ¹H du mélange réactionnel DHS+GA à 0,5 mg/mL dans le D₂O, obtenu en retirant le pic résiduel de l'eau.

b. Synthèse dans le DMSO-d₆

Étant gêné par l'eau résiduelle de la solution initiale du monomère GA (25 ou 70% massique dans l'eau) pour la caractérisation par RMN, ce dernier a été remplacé par le dialdéhyde TDC (disponible sous forme de poudre). De plus, le solvant D₂O a été remplacé par du DMSO-d₆ pour atteindre des concentrations totales en monomères adaptées aux analyses en RMN ¹H (10 mg/mL).

Les spectres RMN ^1H des monomères ont été détaillés en Annexe 1, et utilisés ensuite pour interpréter les spectres de la réaction DHS/TDC (par RMN 1D ^1H et ^{13}C , ou 2D HSQC, HMBC et DOSY), notamment dans le cadre d'une étude cinétique. Toutes ces analyses ont été réalisées sur la plateforme RMN Polymères de l'ICL (AxelOne Campus, Villeurbanne), avec l'aide de Fernande Boisson-Da Cruz (IR CNRS, IMP) pour l'interprétation des spectres.

i. Étude cinétique

Un suivi cinétique (sans agitation) des produits de la réaction DHS/TDC a été réalisé par RMN ^1H directement dans un tube à une concentration totale de 10 mg/mL dans le DMSO- d_6 . Des spectres complémentaires (^{13}C , COSY, HSQC, HMBC, ou DOSY) ont ponctuellement été enregistrés pendant la cinétique pour obtenir des informations structurales. La Figure 71 montre l'évolution des spectres en RMN ^1H . L'attribution des pics est ainsi présentée sur la Figure 73.

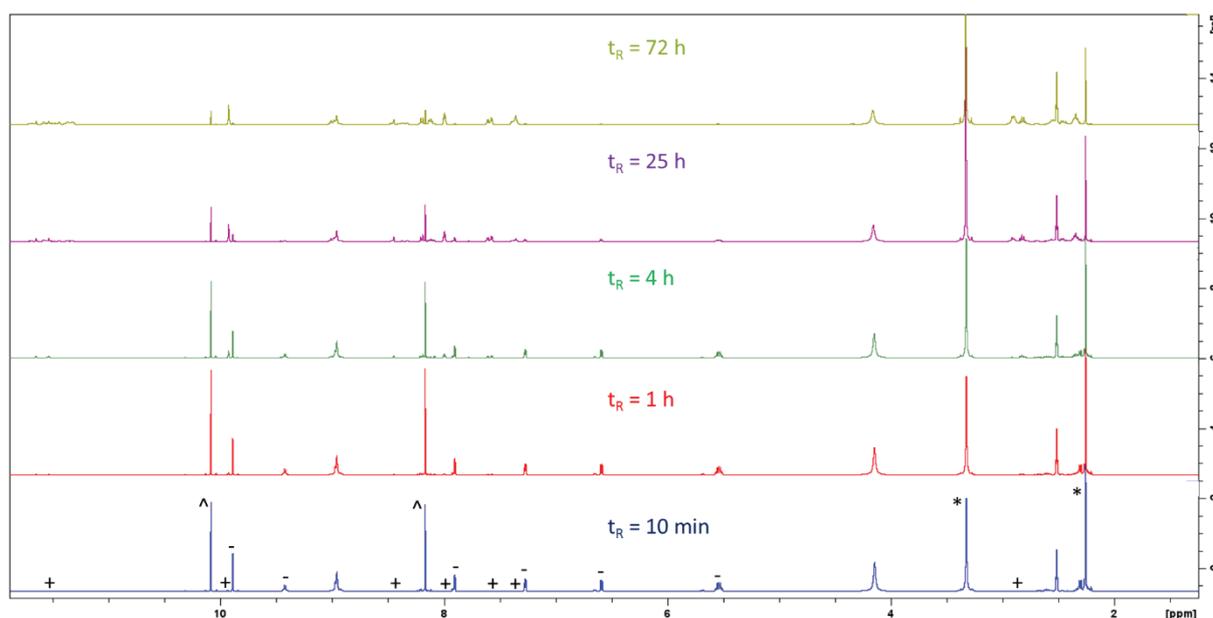


Figure 71 - Superposition de spectres RMN ^1H du milieu réactionnel DHS/TDC (10mg/mL, 298K sans agitation, à différents temps de réaction (de bas en haut : 10 min, 1h, 4h, 25h et 72h), DMSO- d_6). « * » : pics résiduels du DMSO et de l'eau. « + » : signaux qui augmentent au cours du temps. « - » : signaux qui diminuent au cours du temps, attribués aux monomères. « ^ » : signaux qui augmentent puis diminuent au cours du temps, ne correspondant pas aux monomères.

De plus des expériences ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC et HMBC, des expériences en séquence DOSY ont été réalisées (Figure 72), afin de pouvoir discriminer les pics RMN en fonction du coefficient de diffusion de la (macro)molécule à laquelle ils correspondent. De plus, la comparaison des cartes DOSY à différents temps de réaction (7h et 7 jours) montre une diminution du coefficient d'auto-diffusion

associés aux signaux des espèces formées avec le temps de réaction, ce qui traduit une augmentation de la masse molaire.

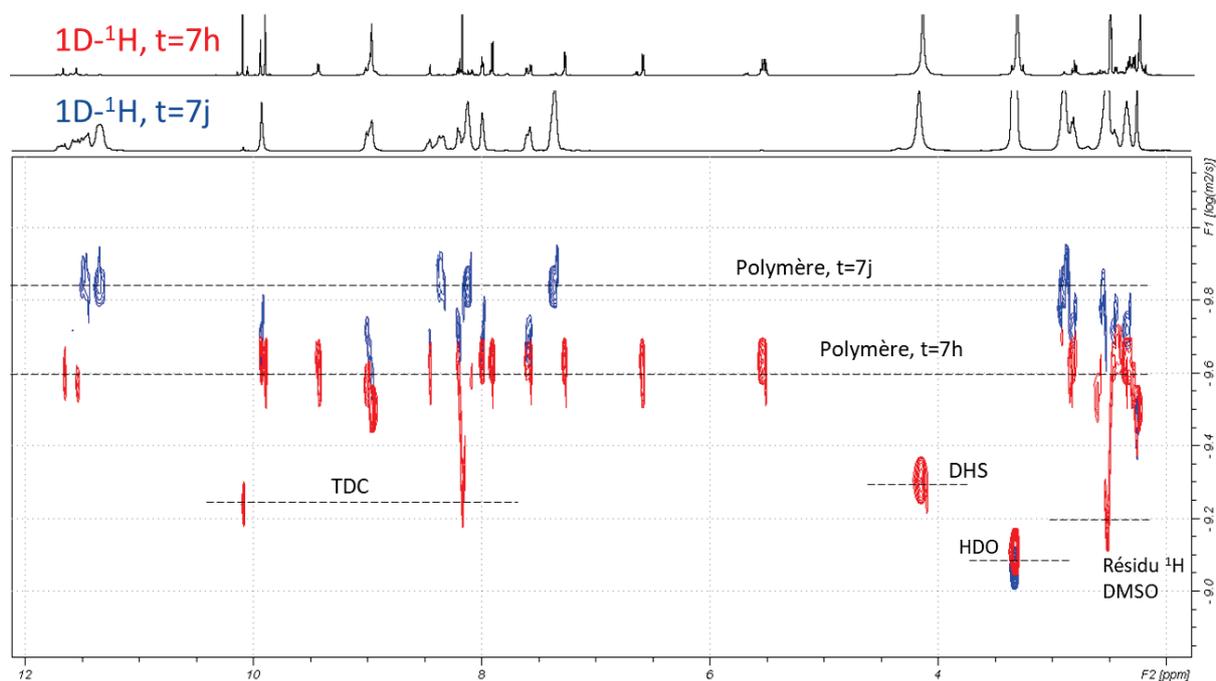


Figure 72 - Carte DOSY de la réaction DHS+TDC (10 mg/mL, 298K sans agitation, spectromètre 400 MHz, DMSO-d₆), à différents temps de réaction (Rouge : t=7h, Bleu : t=7j). Les deux spectres 1D-¹H correspondants sont présentés en projection.

En compilant toutes ces données, il a été possible d'identifier la formation d'un intermédiaire réactionnel selon la réaction décrite sur la Figure 74, et d'attribuer les signaux caractéristiques des espèces formées (Figure 73).

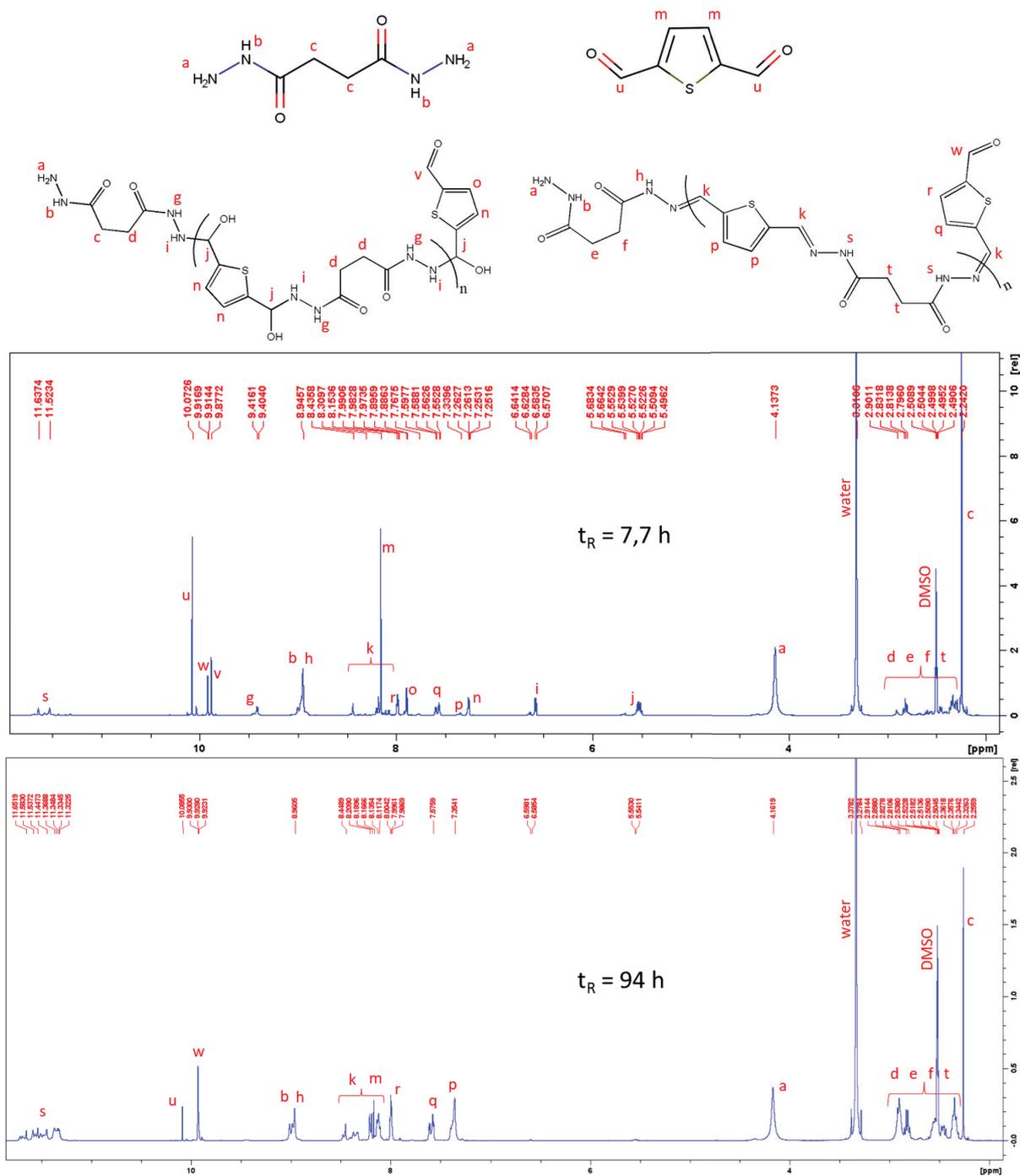


Figure 73 - Attribution des pics RMN ^1H des produits de la réaction DHS+TDC (10 mg/mL, 298K, pour 7,7 h et 94 h de réaction, DMSO-d6) sur la base de simulations et des cartes 2D associées (HSQC, HMBC, DOSY, COSY).

En accord avec la littérature¹⁰², un intermédiaire réactionnel a ainsi été identifié, provenant de l'addition de l'hydrazide sur l'aldéhyde avant l'étape d'élimination de l'eau (Figure 74), constituant ainsi une carbinolamine, elle-même polymérisable.

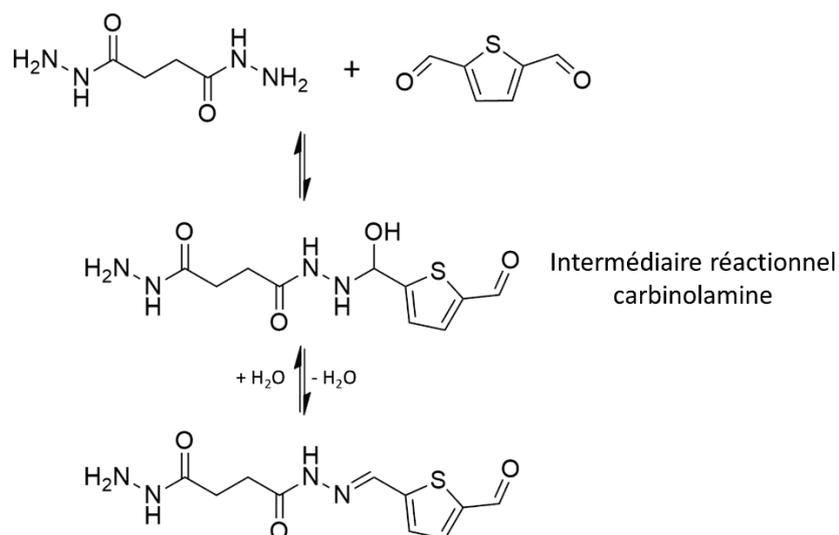


Figure 74 - Mécanisme de formation de la fonction acylhydrazone entre le DHS et le TDC. L'espèce intermédiaire carbinolamine, issue de l'addition de l'hydrazide sur l'aldéhyde subit ensuite l'élimination d'une molécule d'eau.

ii. Interprétation mécanistique

L'identification de l'intermédiaire réactionnel carbinolamine permet de proposer le mécanisme en Figure 75, se déroulant en deux étapes : i) la première correspond à l'addition de l'hydrazide sur l'aldéhyde, ii) et la seconde, à l'élimination d'une molécule d'eau. À ce stade, la formation d'un polymère de carbinolamine n'est pas exclue. Ce mécanisme en deux étapes expliquerait ainsi pourquoi la réaction est catalysée en milieu acide, la seconde étape d'élimination d'une molécule d'eau étant connue pour être catalysée sous cette condition.

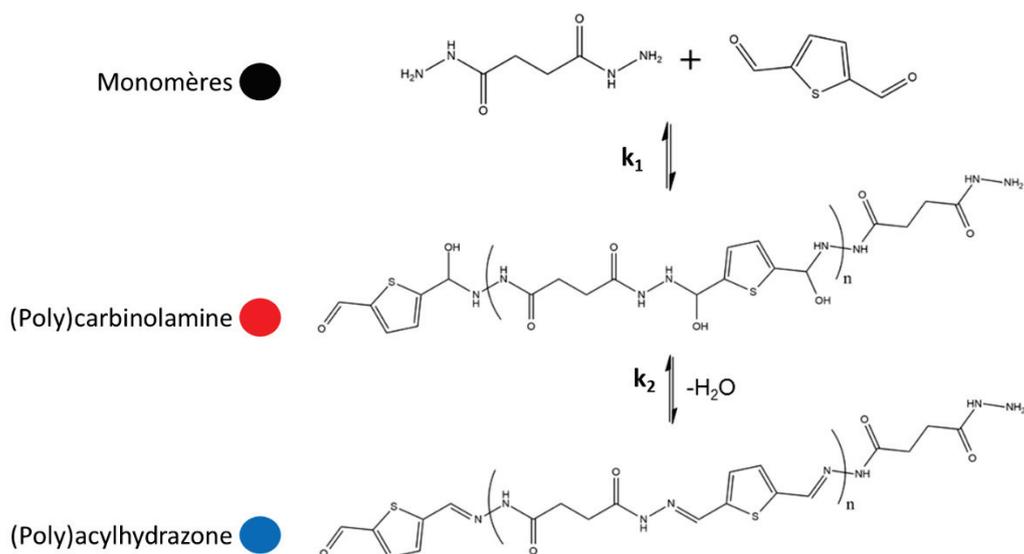


Figure 75 - Mécanisme proposé de la réaction entre le DHS et le TDC, menant à un polyacylhydrazone (PACH), avec comme intermédiaire réactionnel un polycarbinolamine (PCA).
Le code couleur des cercles est à associer à la Figure 76 et à la Figure 77.

Les signaux RMN ^1H caractéristiques des terminaisons de chaîne étant identifiés et quantifiables (Figure 73), la détermination d'un degré de polymérisation moyen en nombre (DP) du polycarbinolamine (PCA) et du polyacylhydrazone (PACH) a été possible en se basant sur les intégrales correspondantes (les pics utilisés seront nommés par leur lettre). Ce DP est défini par le nombre total de motifs (DHS+TDC) divisé par le nombre de macromolécules (Équation 3 et Équation 4).

Équation 3 - Calcul du degré de polymérisation du PCA, en fonction de l'intégrale des pics des protons « n » (7,27 ppm) et « o » (7,90 ppm) en RMN ^1H , soit le total de protons aromatiques du PCA divisés par le nombre de protons aromatiques terminaux du PCA.

$$DP_{PCA} = \frac{[n] + [o]}{2 \times [o]}$$

Équation 4 - Calcul du degré de polymérisation du PACH, en fonction de l'intégrale des pics « r » (7,99 ppm), « q » (7,57 ppm) et « p » (7,34 ppm) en RMN ^1H , soit le total de protons aromatiques du PACH divisés par le nombre de protons aromatiques terminaux du PACH.

$$DP_{PACH} = \frac{[r] + [q] + [p]}{[r] + [q]}$$

L'évolution de ces valeurs de DP moyen en nombre en fonction du temps est présentée en Figure 76. La principale observation est que les DP moyens restent très faibles, ne dépassant pas 2 (Figure 76, à gauche), même après 96h pour le PACH. En revanche, le DP s'élève à 21 après 1 mois de réaction à 25°C sans agitation (Figure 76, à droite). La présence d'oligomères, plutôt que de polymères,

est donc mise en avant ici, et pourrait être expliquée par la faible concentration totale en monomères utilisée. Notons que la formation de macrocycles n'est pas exclue, le DP calculé est un DP apparent qui ne rend pas compte de la longueur moyenne réelle des chaînes. Ceci est corroboré par l'observation faite sur les cartes DOSY dans lesquelles le coefficient de diffusion des espèces obtenues après réaction, reste élevé, mais inférieur à celui des monomères.

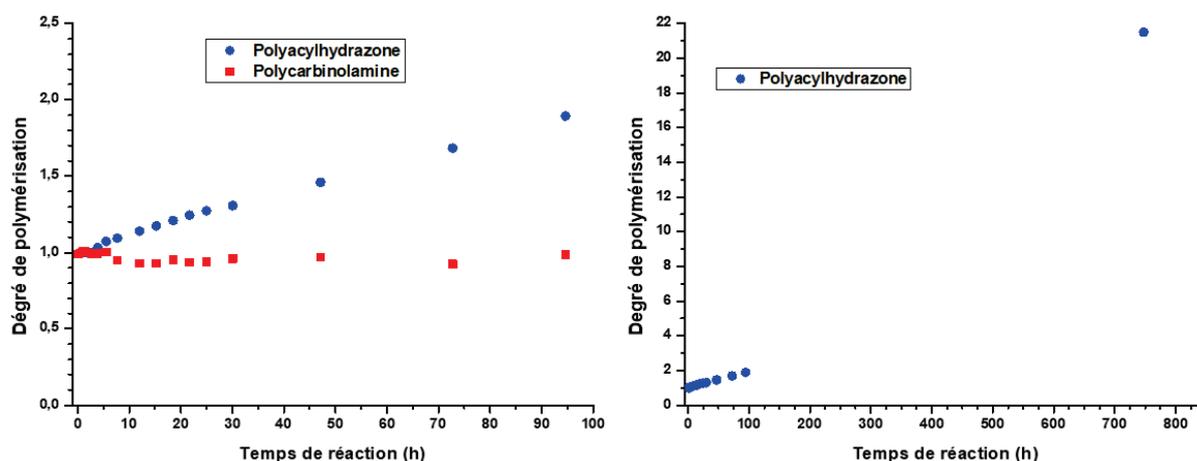


Figure 76 - Évolution du degré de polymérisation (DP) au cours du temps de la réaction DHS+TDC (10 mg/mL, r.t., sans agitation) pour le polycarbinolamine PCA (en rouge) et le polyacylhydrazone PACH (en bleu).

Comme montré sur la Figure 73, les protons aromatiques du cycle thiophène sont bien différenciés sur le spectre selon la structure considérée, qu'il s'agisse du monomère TDC (signal « m » à 8,15 ppm), du polycarbinolamine (signaux « o » et « n » à 7,90 ppm et 7,27 ppm, respectivement) ou du polyacylhydrazone (signaux « r », « q » et « p » à 7,99 ppm, 7,57 ppm et 7,34 ppm, respectivement). Ceux-ci sont les plus simples à identifier car bien résolus (attribués au monomère, au PCA ou au PACH). À partir de l'évolution des intégrales de ceux-ci, le nombre de cycles engagés dans chaque espèce (aldéhyde, carbinolamine, acylhydrazone) en fonction du temps de réaction a pu être examiné (Figure 77). Ainsi, la proportion d'intermédiaire réactionnel atteint son maximum dès 10 min, puis décroît, parallèlement à la proportion du monomère TDC. Le taux de conversion en acylhydrazone est de 95% après environ 4 jours, et de 99% après 1 mois de réaction. Il y a donc un véritable besoin de catalyser la réaction pour augmenter la vitesse de conversion.

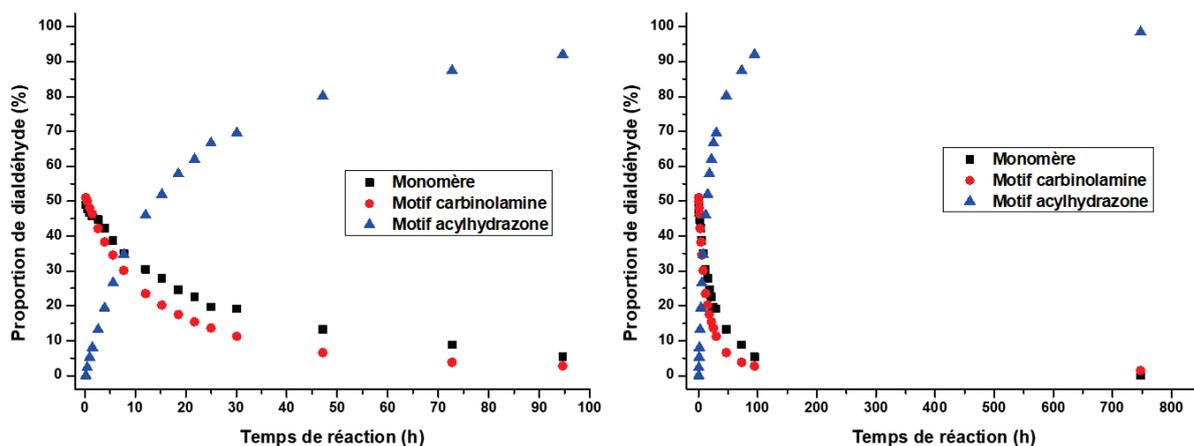


Figure 77 - Évolution du % de cycles thiophène au cours du temps, selon si celui-ci contribue à la structure du monomère TDC (en noir), des motifs de l'intermédiaire polycarbinolamine (en rouge) ou des motifs du polyacylhydrazone (en bleu).

Afin d'approfondir cette analyse mécanistique, et de la simplifier, une approximation a été faite selon les conditions suivantes : la vitesse de polymérisation est équivalente à la vitesse de conversion du polycarbinolamine PCA en polyacylhydrazone PAcH (*i.e.* la vitesse de la deuxième étape est déterminante). En effet, en considérant que la constante de vitesse de la première étape (k_1) est bien plus élevée que celle de la seconde étape (k_2) (*i.e.* étape « limitante »), il est possible de déterminer la valeur de k_2 à l'aide d'une modélisation mathématique par une exponentielle décroissante de la courbe de proportion de carbinolamine (Figure 78). On trouve ainsi que $k_2 = 0,056 \text{ s}^{-1}$. Cette valeur, étant donné les conditions de la réaction (réalisée directement dans un tube RMN sans agitation), est difficilement comparable aux autres expériences menées, mais pourra être comparée à celle obtenue en catalysant la réaction.

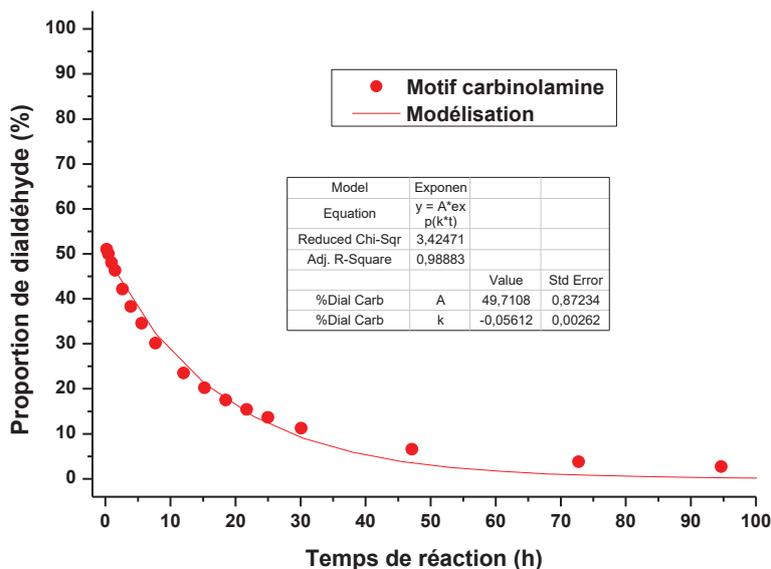


Figure 78 - Évolution de la proportion de carbinolamine en fonction du temps de réaction, obtenant ainsi une valeur de k_2 de $0,056 \text{ s}^{-1}$.

5. Caractérisation par spectrométrie de masse

a. Monomères

Pour compléter leurs analyses en RMN, des spectres de masse des monomères DHS et GA ont été réalisés en spectrométrie de masse ESI-TOF en collaboration avec le CCSM de l'Université Claude Bernard Lyon 1. Ces deux monomères ont été sélectionnés car la réaction est réalisée dans l'eau, et car ce couple permet d'atteindre des concentrations les plus élevées sans précipitation (Tableau 2). Des solutions de monomères à $1,0 \text{ mg/mL}$ dans l'eau ont été utilisées pour cela. La Figure 79 montre le spectre de masse du DHS, avec les pics correspondant à la molécule ($M = \text{DHS}$; $[M+H]^+ = 147,1 \text{ uma}$ et $[M+Na]^+ = 196,1 \text{ uma}$), ainsi que la présence d'un dimère ($[2M+H]^+$) à $293,1 \text{ uma}$ (probablement formé dans la source ESI). D'autres pics, d'intensité très minoritaire, n'ont pas été attribués et pourraient correspondre à des impuretés non identifiées dans l'échantillon, en quantité négligeable.

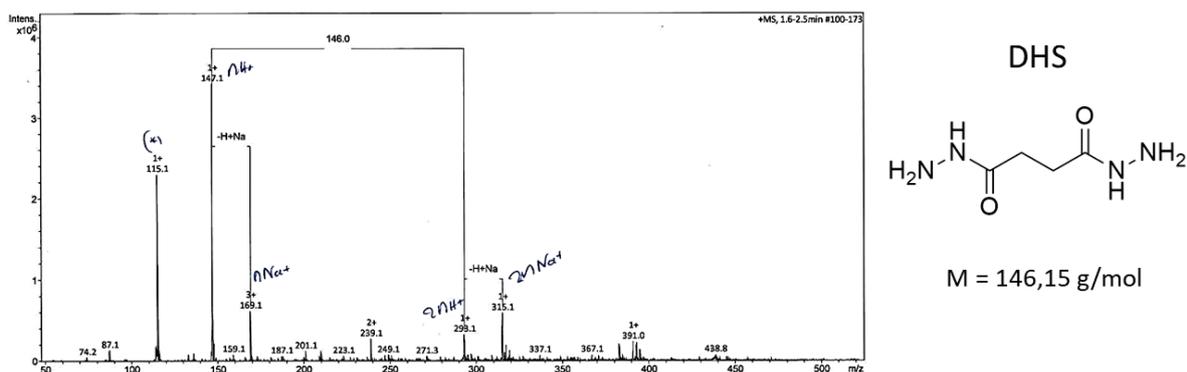


Figure 79 - Spectre de masse ESI-TOF du dihydrazide succinique (DHS)

Le spectre de masse du GA est présenté en Figure 80. Il révèle là aussi les pics attendus pour le monomère ($[M+Na]^+$ à 123,1 uma), le dimère ($[2M+Na]^+$ à 223,0 uma) et le trimère ($[3M+Na]^+$ à 323 uma). De plus, du fait de la présence de méthanol ajouté dans la solution juste avant injection, des composés avec une masse supplémentaire correspondant à une ou plusieurs molécules de méthanol (écarts de 100 uma) sont également détectés.

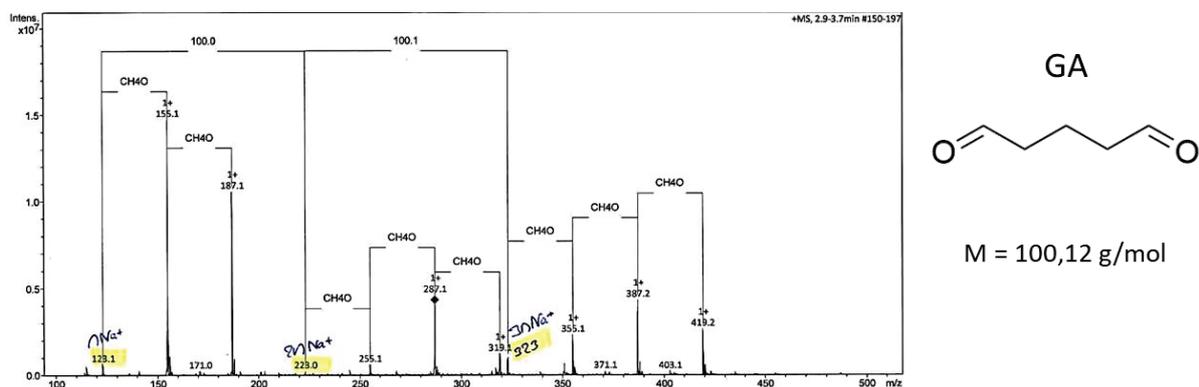


Figure 80 - Spectre de masse ESI-TOF du glutaraldéhyde (GA)

Ces deux spectres de masse permettent d'avancer que les monomères sont relativement purs, en complément des analyses RMN.

b. Réactions de polymérisation

Les réactions des monomères « modèles » ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (à l'IBCP, Lyon, en collaboration avec Frédéric Delolme, IE CNRS). Pour cela, des solutions de monomères DHS et GA à 0,5 mg/mL dans l'eau ont été utilisées. Les matrices employées

pour ces analyses ont été le l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA).

La Figure 81 présente le spectre de masse MALDI-TOF, en modes positif et réflectron, de la réaction juste après le mélange des solutions de monomères DHS/GA, sans catalyseur. On peut identifier des pics, d'intensité relativement élevée, espacés de 210 uma (443,6 ; 653,6 ; 863,7 ; 1073,6 uma). Ces pics, dont deux sont identifiés par une flèche en Figure 81, ont été associés à des oligomères cycliques (avec un adduit Na^+), comportant un nombre égal de monomères DHS et GA, et allant jusqu'à 14 unités de répétition.

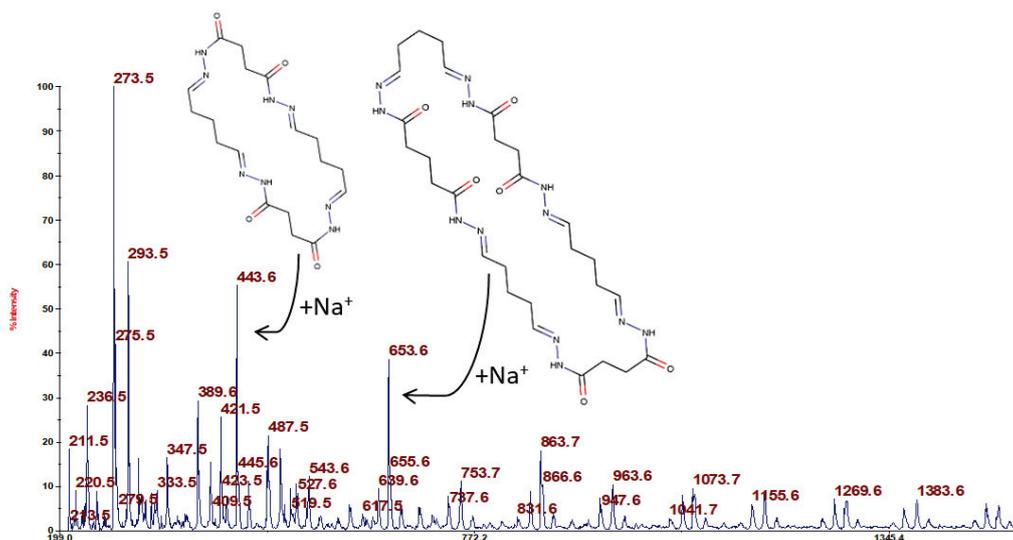


Figure 81 - Spectre de masse MALDI-TOF (matrice DHB) de la réaction entre le DHS et le GA (extemporanée, $C_{\text{TOT}} = 0,5 \text{ mg/mL}$)

À côté de ces « massifs », une multitude de pics existent. Afin de faciliter leur attribution, un agrandissement du spectre de masse est présenté en Figure 82. Pour faciliter la lecture du spectre de masse, ces attributions sont données dans le Tableau 4.

Tableau 4 - Attribution des pics dans la zone agrandie en Figure 82 issue du spectre de masse de la Figure 81. La mention « avec une carbinolamine » signifie qu'une des fonctions acylhydrazones n'a pas subi d'élimination d'eau, la liaison entre deux monomères correspond ainsi encore à l'intermédiaire réactionnel.

Pic monoisotopique (m/z)	Attribution	Adduit	Lettre (Figure 82)
371,5	Non attribué	NA	A
389,6	Non attribué	NA	B
407,5	Non attribué	NA	C
421,5	Oligomère cyclique (2DHS + 2GA)	H ⁺	D
429,6	Non attribué	NA	E
443,6	Oligomère cyclique (2DHS + 2GA)	Na ⁺	F
459,6 / 461,6	459,6 : Oligomère cyclique (2DHS + 2GA) / 461,6 : Oligomère linéaire (2DHS + 2GA)	K ⁺ / Na ⁺	G
485,5 / 487,5	Non attribué	NA	H
503,5	Oligomère linéaire avec une carbinolamine (2DHS + 3GA)	H ⁺	I
525,6	Oligomère linéaire avec une carbinolamine (2DHS + 3GA)	Na ⁺	J
543,6	Oligomère linéaire (2DHS + 3GA)	Na ⁺	K
559,5	Oligomère linéaire (2DHS + 3GA)	K ⁺	L

Les composés ainsi identifiés sont : i) un oligomère cyclique comprenant une quantité égale de DHS et de GA, ii) un oligomère linéaire comprenant des unités GA en extrémités de chaîne, iii) des espèces intermédiaires ayant une fonction carbinolamine, comme démontrée par RMN avec le couple DHS/TDC. Cependant, notons que de nombreux pics n'ont pas encore pu être identifiés.

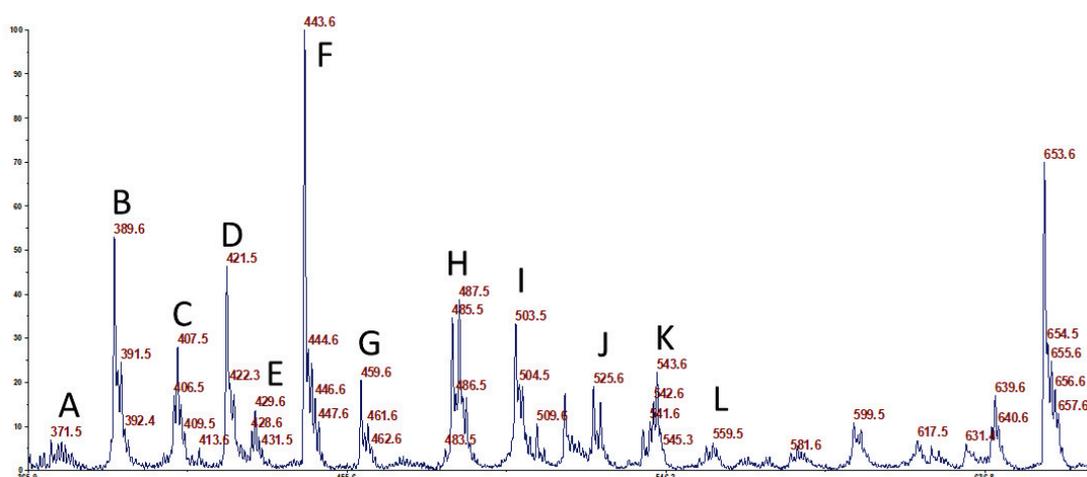


Figure 82 - Agrandissement du spectre de masse positif MALDI-TOF (matrice DHB) de la Figure 81 en mode réflectron de la réaction entre le DHS et le GA (extemporanée, $C_{TOT} = 0,5$ mg/mL). L'attribution (Tableau 4) d'un massif de pics isotopiques à une espèce est effectuée en se basant sur le pic monoisotopique du massif considéré, codé par une lettre.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF n'étant pas une technique quantitative, il ne serait pas rigoureux de déterminer la proportion de macrocycles par rapport aux espèces linéaires à partir de ce spectre de masse. Toutefois, la présence de ces macrocycles n'est pas surprenante étant donné la faible concentration des monomères utilisée, qui mène préférentiellement à la formation d'oligomères cycliques (une réaction intra-chaîne est statistiquement favorisée par rapport à celle inter-chaînes à faible concentration). Par ailleurs, les processus de désorption et d'ionisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF étant dépendants de la structure chimique des composés, notamment de leurs extrémités de chaîne, il est difficile d'essayer d'expliquer pourquoi seules les espèces linéaires ayant des extrémités de chaîne aldéhyde sont détectables dans le spectre de masse.

Afin d'augmenter la concentration en monomères, et d'examiner l'influence de cette augmentation sur la proportion en macrocycles, une réaction avec les monomères DHS et TDC dans le DMSO (concentration 20 fois supérieure) a été également analysée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 83). Le spectre de masse correspondant montre deux catégories d'oligomères : (i) les macrocycliques (cercles violets), les mêmes que précédemment détectés durant la synthèse en milieu aqueux, (ii) mais également les oligomères linéaires (cercles orange) comportant les monomères TDC en bout de chaîne. Des espèces, comportant jusqu'à 19 unités de répétition, correspondant à des oligomères de DP de 9, sont observés. D'une manière inattendue, la présence de macrocycle est toujours observée, indiquant que la concentration n'est peut-être pas encore suffisamment élevée. Comme écrit précédemment, il est impossible de quantifier leur proportion et de la comparer entre spectres de masse, la spectroscopie de masse MALDI-TOF n'étant pas quantitative.

Notons qu'en Figure 83, pour chaque série de cercles, violets et oranges, deux pics sont associés. Le premier (le plus faible en intensité) correspond à la molécule correspondante avec un adduit Na^+ , tandis que le second (celui ayant l'intensité la plus élevée) pourrait correspondre, sans explication certaine, à cette même molécule mais oxydée avec un adduit Na^+ également (l'écart entre les pics est de 16 uma, et il est plus probable qu'un atome de soufre soit oxydé que l'adduit soit un ion K^+ , menant à la même différence de masse entre les pics, il s'agit ici d'un artefact provoqué par l'analyse).

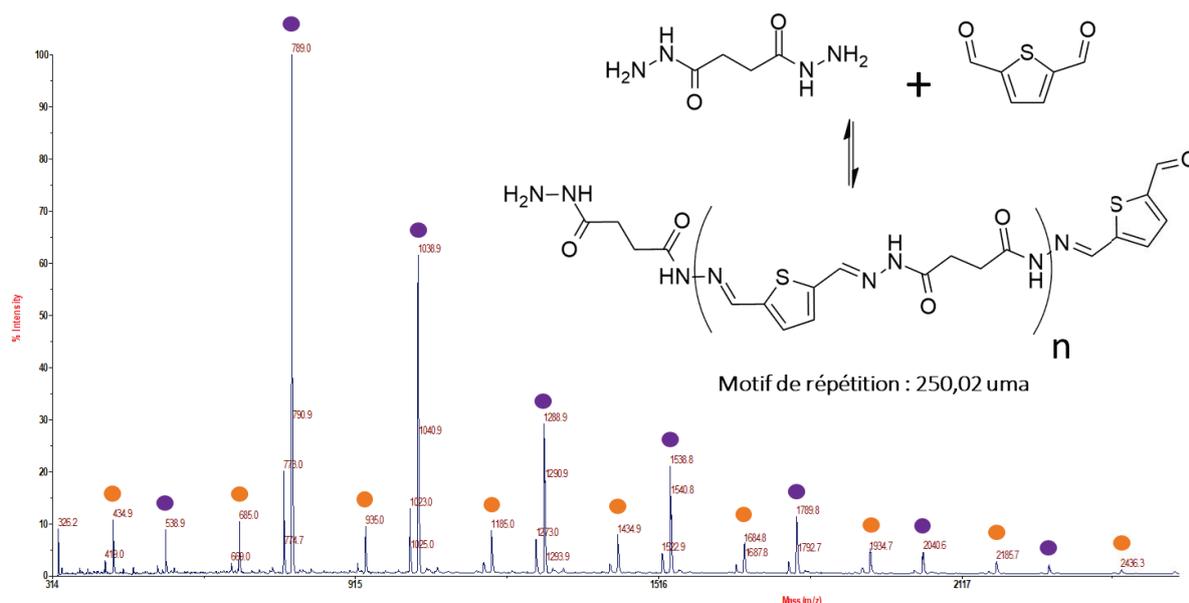


Figure 83 - Spectre de masse MALDI-TOF (matrice CHCA) de la réaction entre le DHS et le TDC dans le DMSO (extemporanée, $C_{TOT} = 10$ mg/mL). Les cercles violets correspondent aux oligomères cycliques, tandis que les cercles orange correspondent aux oligomères linéaires avec le TDC en extrémité de chaîne.

En conclusion, cette analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF de la réaction entre le DHS et le TDC permet de conforter la présence d'espèces linéaires et cycliques, ainsi que l'hypothèse émise lors des analyses RMN, à savoir que le calcul du DP ne doit pas négliger les espèces cycliques.

6. Conclusion

Pour conclure sur les résultats obtenus jusque-là, il a été montré que la polymérisation du TDC et GA avec le DHS avait effectivement lieu, par différentes techniques de caractérisation.

La mise en évidence de la fonction acylhydrazone a été indirectement effectuée par spectrométrie UV-Vis de par l'augmentation de l'absorbance vers 230 nm de la réaction DHS/GA en comparaison des solutions des monomères. L'analyse par chromatographie a révélé un pic en HPLC du mélange DHS/GA dont l'aire à 250 nm s'accroît au cours du temps, mais la caractérisation par SEC, couplée à des détecteurs UV et RI, pour déterminer les masses molaires, n'a pas abouti du fait d'interactions entre les composés et la phase stationnaire des colonnes de SEC.

Les analyses menées en RMN du couple DHS/TDC ont permis de montrer une polymérisation en deux étapes avec formation d'un intermédiaire réactionnel, comme indiqué dans la littérature^{110,111,113}, le (poly)carbinolamine. La constante de vitesse de la conversion de cet

intermédiaire en polyacylhydrazone a été évaluée à $0,056 \text{ s}^{-1}$. Il a également été possible de calculer un DP du polymère obtenu, mais ce DP n'est pas représentatif du nombre moyen de motifs par oligomère au regard de la proportion d'oligomères cycliques (identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF pour les couples DHS/GA et DHS/TDC).

De toutes ces analyses, il en ressort que la réaction entre le monomère dihydrazide DHS et les monomères dialdéhyde GA ou TDC (la réaction avec le TPA n'a pas pu être caractérisée en raison de concentrations trop faibles requises pour ne pas provoquer de précipitation) produit des oligomères de faibles DP (linéaires et cycliques). Afin d'augmenter ces DP, l'augmentation de la vitesse de réaction va être recherchée en jouant sur le pH de la polymérisation. Ainsi, les prochains paragraphes seront dédiés à l'étude de l'ajout d'acide dans le milieu de réaction entre le dihydrazide et le dialdéhyde.

IV. Influence du pH sur la polymérisation

Après avoir apporté les preuves de la polymérisation grâce à différentes techniques complémentaires, cette partie propose d'explorer l'influence du pH sur la formation de PACH. Pour cela, les techniques de caractérisation utilisées auparavant (HPLC, SEC, spectrométrie de masse MALDI-TOF, RMN) seront de nouveau mises à profit pour cette étude.

1. Suivi cinétique par HPLC

En utilisant les mêmes conditions d'analyse que pour les résultats précédemment obtenus par HPLC pour la réaction non catalysée, les chromatogrammes des réactions catalysées ont également été mesurés. La catalyse a consisté à ajouter 40 équivalents d'acide (mol/mol, soit 81 mM) dans la solution par rapport aux monomères, au moment du mélange entre les solutions de monomères (DHS et GA). La nature de l'acide a été choisie en reprenant les plus utilisés dans la littérature pour ce type de réaction, à savoir l'acide chlorhydrique (HCl), ou l'acide acétique glacial (AcOH) et l'acide trifluoroacétique (TFA) qui sont représentés en Figure 84.

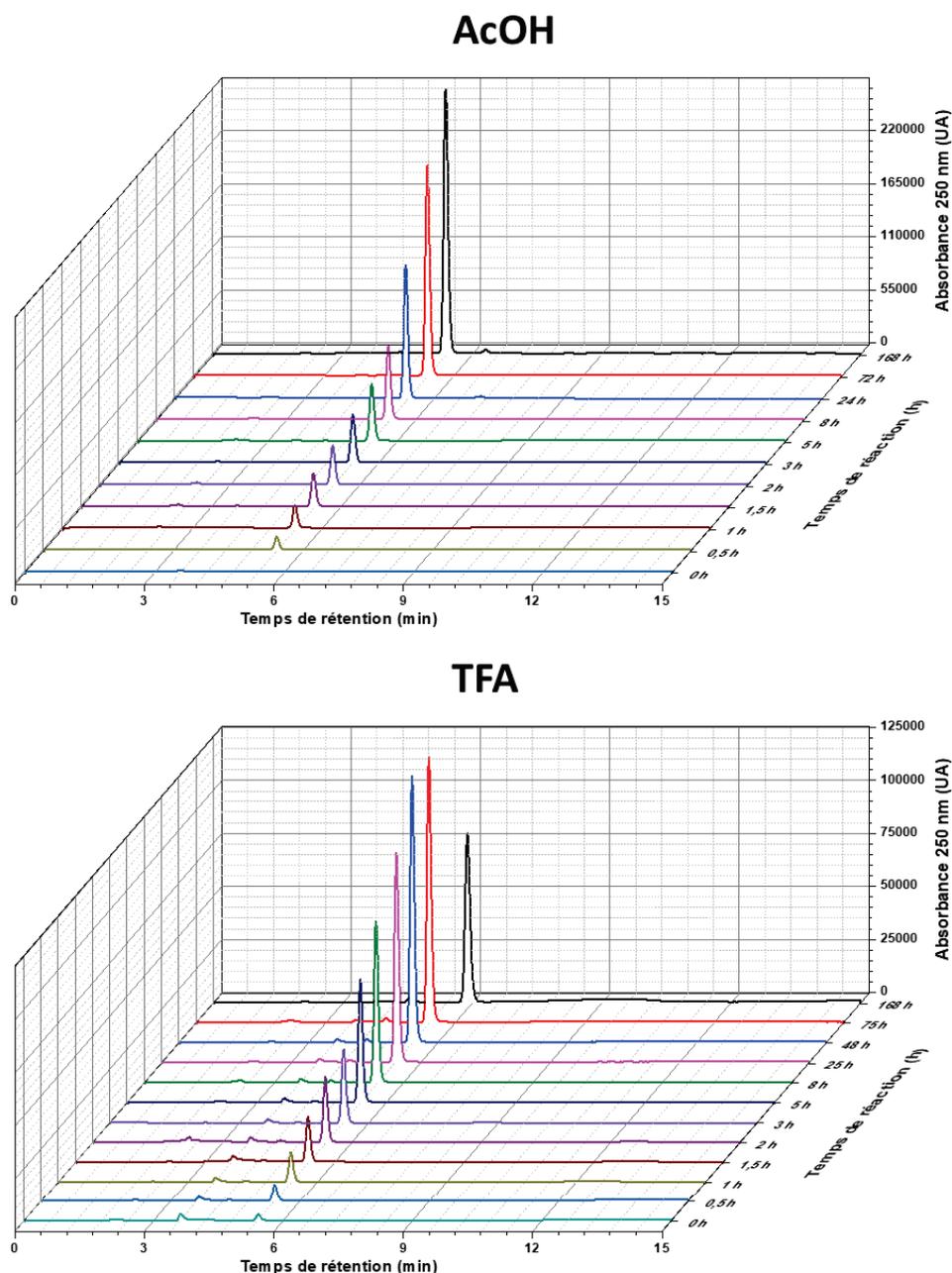


Figure 84 - Superpositions de chromatogrammes à différents temps de réaction entre le DHS et le GA (0,5 mg/mL dans l'eau), en y ajoutant 40 équivalents molaires/monomère d'acide acétique (à gauche) et de TFA (à droite). Éluant = Eau, $\lambda = 250$ nm. {Chaîne A, Colonne HPLC 1}.

Le pic correspondant au polymère vers 6 min a été suivi, et son aire a été représentée en fonction du temps pour chaque type d'acide sur la Figure 85A. Le signal du polymère est bien supérieur dans les premières heures lorsque de l'acide est ajouté, par rapport à la réaction non catalysée (courbe verte), et ce quel que soit l'acide. En revanche, après 24h d'agitation à température ambiante, l'évolution des aires se différencie entre l'acide acétique, l'HCl et le TFA. Tandis que le premier (courbe noire) provoque une évolution suivant une courbe exponentielle classique, l'HCl et le TFA semblent

induire un ralentissement, puis une décroissance de l'aire du pic (courbes rouges et bleues). Les raisons de ces différences entre acides seront discutées plus loin.

La Figure 85B montre l'évolution des aires durant les 8 premières heures, soulignant que l'ajout d'acide provoque bien une augmentation de l'aire de ce pic par rapport à la réaction non catalysée. La vitesse initiale de chacune des réactions catalysées a été déterminée dans les 2 premières heures en effectuant une régression linéaire. En effet, la vitesse calculée à partir de la pente des premiers points de chaque courbe correspond à la vitesse d'apparition des fonctions acylhydrazones suite à la réaction d'une fonction aldéhyde avec une fonction hydrazide.

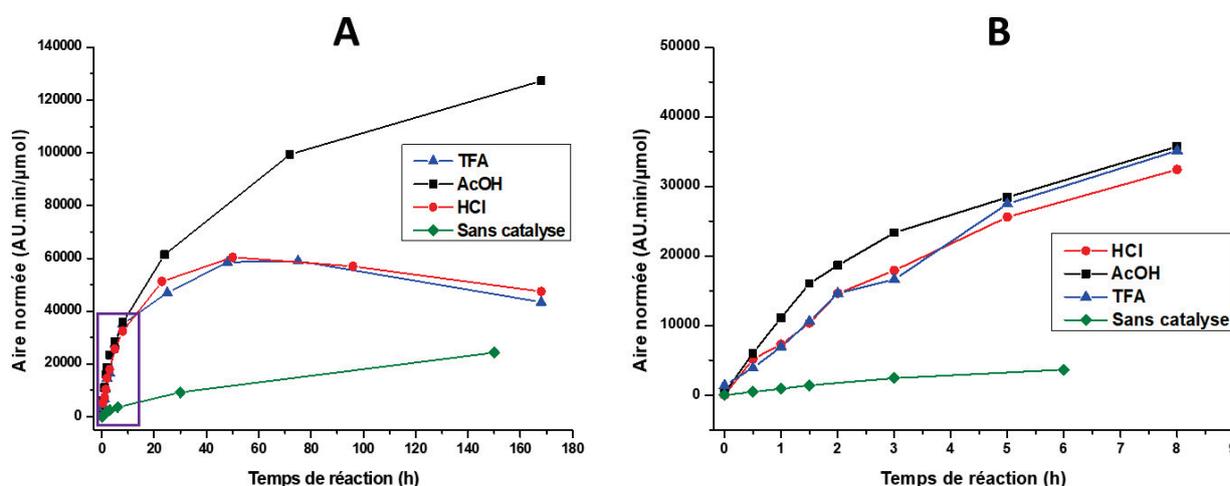


Figure 85 - Évolution de l'aire du pic correspondant au PACh en fonction du temps et du type d'acide utilisé pour la catalyse (40 eq. mol.). **A**) Échelle de temps longue. **B**) Échelle de temps centrée sur les 8 premières heures (rectangle violet sur **A**). Les points utilisés pour le calcul des vitesses initiales sont ceux compris dans les 2 premières heures.

Les valeurs des vitesses initiales de chaque réaction sont regroupées dans le Tableau 5, où elles sont également comparées au pK_a de l'acide et au pH du milieu réactionnel.

Tableau 5 - Comparaison de l'effet des catalyseurs acides (40 eq. mol.) sur la vitesse initiale de la réaction entre le DHS et le GA.

Catalyseur acide	pK_a de l'acide	pH du milieu réactionnel	Vitesse initiale ($\times 10^3$ AU.min/ μ mol/h)
AcOH	4,8	4	$10,5 \pm 0,3$
HCl	-3	1	$6,3 \pm 0,7$
TFA	0,3	1	$6,1 \pm 0,4$
Sans catalyseur	NA	6	$0,92 \pm 0,01$

Le Tableau 5 révèle tout d'abord une augmentation nette de la vitesse initiale par ajout d'acide en comparaison à celle d'une réaction sans catalyseur. Ensuite, ce tableau montre une certaine corrélation entre les vitesses et le pH de la réaction. En effet, il semble exister un pH optimal vers pH 4, comme reporté dans la littérature.⁵⁶

Une raison pour la faible vitesse initiale à pH = 1 pourrait s'appuyer sur les valeurs de pK_a théoriques du dihydrazide de 2,7 et 3,3 (d'après Chemaxon). La protonation partielle des hydrazides qui aurait lieu à pH = 1 aurait donc un effet inhibant l'addition du dihydrazide sur l'aldéhyde, diminuant ainsi la vitesse de réaction. À l'opposé, une valeur de pH de 4 aurait pour conséquence de ne pas limiter la première étape de la réaction, tout en étant suffisamment acide pour catalyser la seconde étape d'élimination de l'eau.

Notons qu'une analyse HPLC a également été réalisée en ajoutant de la triéthylamine (NEt_3), mais les chromatogrammes obtenus n'étant pas répétables, les courbes et les aires ne sont pas reportées ici.

2. Caractérisation par SEC

L'influence de la valeur du pH du milieu réactionnel sur la polymérisation a également été examinée par SEC. Une proportion de 11 équivalents (mol/mol) d'acide acétique par rapport aux monomères (DHS/GA) a été ajoutée au début de la réaction ; le chromatogramme obtenu après 24h d'agitation à température ambiante est montré sur la Figure 86.

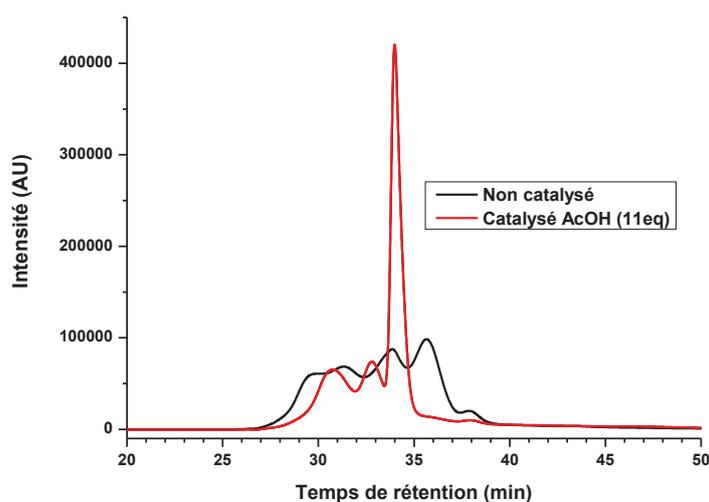


Figure 86 - Comparaison des chromatogrammes SEC de la réaction entre le DHS et le GA après 24h d'agitation à température ambiante dans l'eau (0,5 mg/mL, détection UV à $\lambda=250$ nm). Chromatogramme noir : réaction non catalysée. Chromatogramme rouge : réaction catalysée avec 11 équivalents (mol/mol) d'acide acétique glacial.

Le temps de rétention du massif ne varie pas de manière drastique après ajout d'acide. En revanche, un pic de haute intensité apparaît. Ce pic est en fait attribué à l'acide acétique, grâce à des chromatogrammes « contrôles » contenant la même concentration d'acide acétique. Ainsi, on n'observe malheureusement pas d'apparition de polymère de masse molaire plus élevée, soit parce que cette masse ne varie pas avec l'ajout d'acide, soit parce que les interactions avec la phase stationnaire limitent encore l'apparition d'espèces à temps d'éluion plus faible. La deuxième hypothèse paraît plus plausible car la réaction effectuée dans le DMSO, montre que l'ajout d'acide permet d'obtenir des composés manifestement de masse molaire plus élevée (déplacement du chromatogramme vers les plus faibles temps d'éluion, Figure 87) pour le couple DHS/TDC.

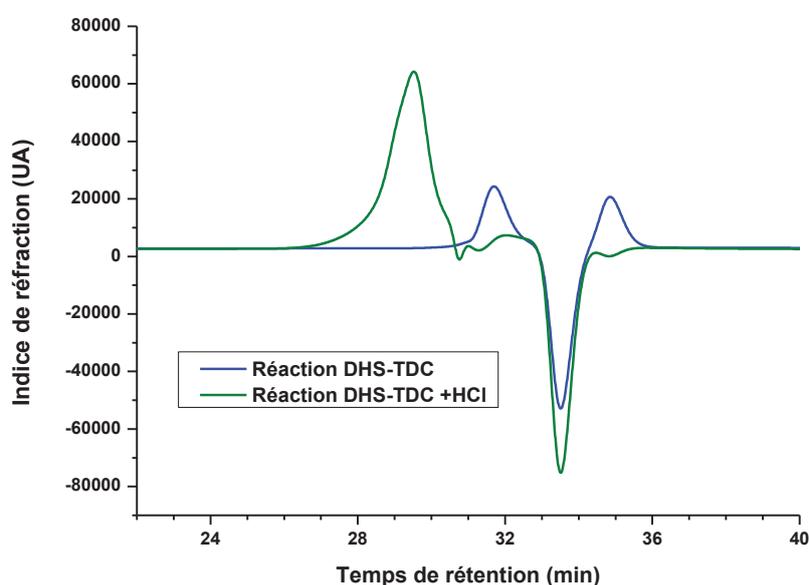


Figure 87 - Comparaison des chromatogrammes SEC de la réaction entre le DHS et le TDC après 24h d'agitation à température ambiante dans le DMSO (10 mg/mL). Chromatogramme bleu : réaction non catalysée, chromatogramme vert : réaction catalysée par 0.05% (v/v) de HCl.

La masse molaire moyenne en nombre de la réaction DHS/TDC obtenue à partir de cette analyse dans le DMSO est d'environ $M_n = 3\ 100$ g/mol, contre une masse molaire moyenne d'environ 900 g/mol pour la réaction DHS/TDC non catalysée, avec une dispersité similaire ($\mathcal{D} = 1,11$ ici contre 1,05). La distribution en masse du pic du polymère et ces valeurs sont données en Figure 88.

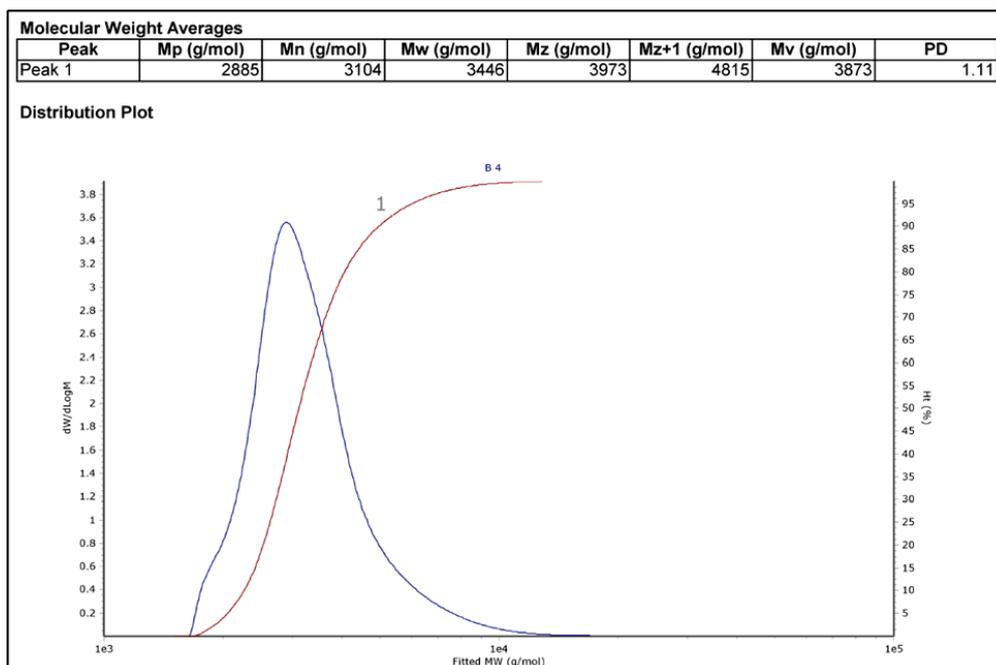


Figure 88 - Distribution en masse du pic du polymère résultant de la réaction catalysée (0,05% volumique de HCl) entre le DHS et le TDC (10 mg/mL dans le DMSO, après 24h de réaction), ainsi que les masses molaires moyennes associées.

3. Caractérisation par spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'influence de la présence d'acide dans le milieu réactionnel des monomères DHS et TDC dans le DMSO a également été analysée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 89). Le spectre de masse obtenu révèle les mêmes pics en présence ou non de catalyseur acide. Les intensités relatives sont cependant différentes, mais il ne serait pas rigoureux de s'attarder dessus étant donné que la spectrométrie de masse MALDI-TOF n'est pas quantitative. La présence d'oligomères de faibles valeurs de m/z avec ou sans catalyseur peut cependant indiquer que les vitesses initiales de réaction sont d'un ordre de grandeur similaire, ou que des « puits thermodynamiques » existent. Ces derniers ont déjà été reportés dans la littérature comme pouvant conduire à la formation d'oligomères cycliques.^{55,56,71}

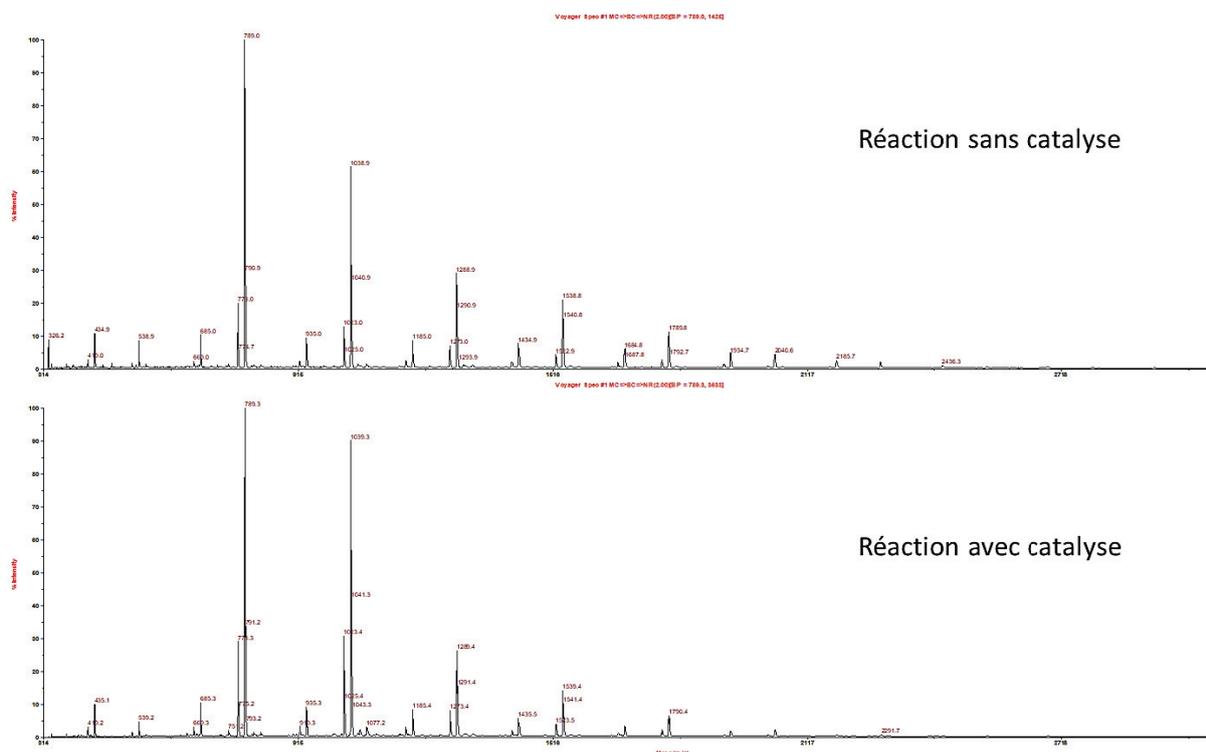


Figure 89 - Comparaison des spectres de masse MALDI-TOF (matrice CHCA) de la réaction TDC+DHS (extemporanée, 10 mg/mL dans le DMSO). En haut : réaction non catalysée, en bas : réaction catalysée par 0,05 % volumique d'HCl.

4. Suivis cinétique par RMN

La réaction des monomères TDC et DHS dans le DMSO-d₆ a également été analysée par RMN ¹H avec 0,05 % (v/v) d'acide chlorhydrique (non deutéré). Comme pour les analyses précédentes, celles-ci ont été réalisées sur la plateforme RMN de l'ICL (AxelOne Campus, Villeurbanne) en collaboration avec Fernande Boisson - Da Cruz (IR CNRS à l'IMP). Les paragraphes suivants présentent une étude de la cinétique réactionnelle et une discussion la concernant, notamment par comparaison avec la réaction sans catalyse acide.

a. Suivi cinétique avec ajout d'acide

L'attribution des pics des spectres RMN ¹H a été réalisée à l'aide des spectres RMN ¹³C et 2D (HSQC, COSY, HMBC, DOSY) et est représentée sur la Figure 90 après 2h de réaction. Sur ces spectres l'intermédiaire réactionnel carbinolamine, précédemment identifié (« v » à 9,87 ppm ; « g » à 9,40

ppm ; « o » à 7,89 ppm ; « n » à 7,25 ppm ; « i » à 6,57 ppm), n'est plus présent, confirmant l'hypothèse que la catalyse acide intervient dans la seconde étape (l'élimination de l'eau est plus rapide, donc le temps d'existence de l'intermédiaire est plus court). Notons que les spectres acquis au cours des toutes premières minutes réactionnelles mettent en évidence une disparition très rapide des pics correspondant au monomère TDC (« u » à 10,07 ppm ; « m » à 8,14 ppm), comme montré en Figure 91.

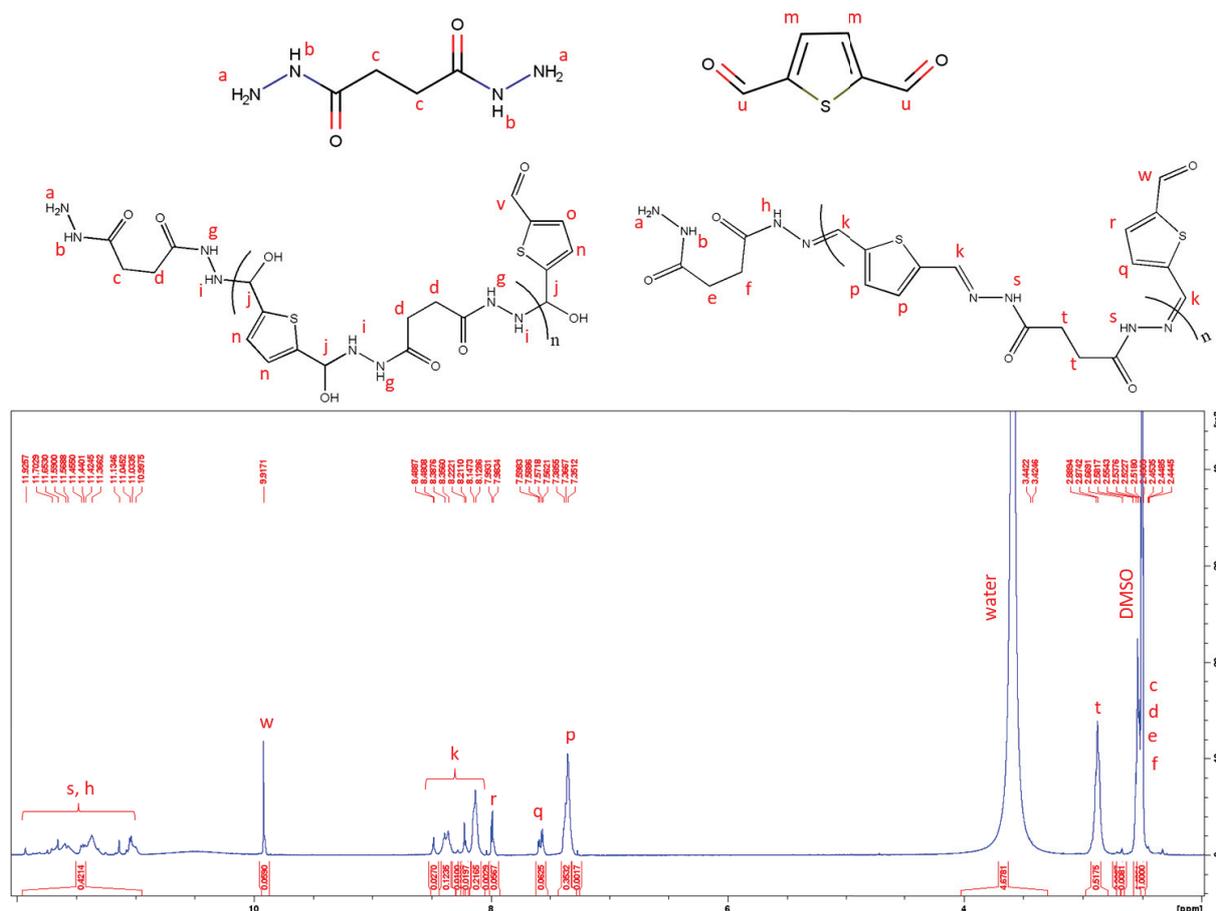


Figure 90 - Spectre RMN ^1H réalisé après 2h de réaction entre le TDC et le DHS + 0,05% volumique d'HCl 37% dans du DMSO-d $_6$ à température ambiante, sans agitation. Spectromètre 400 MHz, à 298 K.

L'évolution des spectres RMN ^1H dans le DMSO-d $_6$ en Figure 91 révèle une diminution des pics des protons des extrémités de chaînes (cycles thiophènes « r » à 7,99 ppm et « q » à 7,57 ppm et aldéhyde « w » à 9,91 ppm). Parallèlement, l'allure des signaux caractéristiques des unités de répétition (« s », « k » et « p ») évolue, probablement due à l'augmentation du DP. Après 48h de réaction, les spectres montrent également l'apparition de pics bien résolus (signaux désignés par une flèche sur le spectre à 48h), qui traduisent la formation d'une espèce de plus faible masse molaire. Il n'a pas été possible d'identifier la structure exacte de cette espèce mais celle-ci semble néanmoins

provenir de la coupure des chaînes de polyacylhydrazone, probablement une structure dimérique dont les signaux fins se trouvent dans les mêmes zones spectrales que les signaux du motif de répétition.

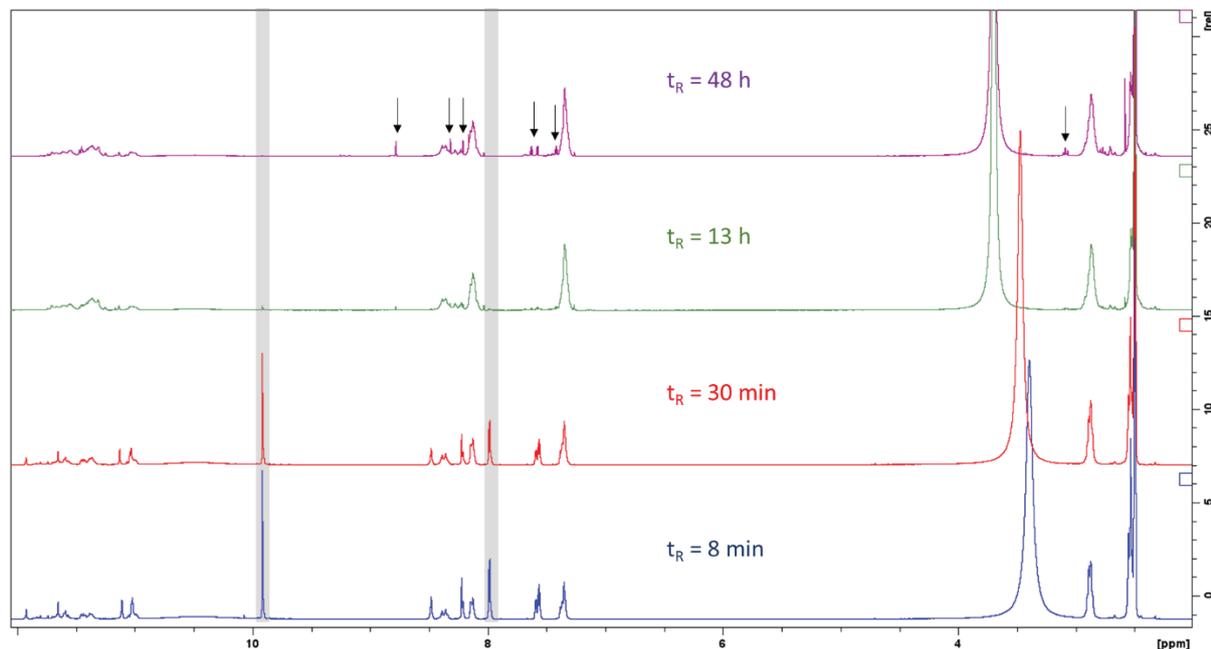


Figure 91 - Évolution cinétique des spectres RMN ^1H de la réaction entre le TDC et le DHS + 0,05% volumique d'HCl 37% dans du DMSO- d_6 à température ambiante, sans agitation (spectromètre 400 MHz, 298 K). Les flèches noires correspondent aux déplacements chimiques de pics bien résolus qui apparaissent après 48h de réaction. Les zones grisées correspondent aux signaux des terminaisons qui diminuent.

D'une manière analogue à celle utilisée pour la réaction non catalysée par un acide, le calcul d'un DP du PACH a été réalisé. Le calcul est réalisé en utilisant les protons des cycles thiophènes du polymère, soit $DP = \frac{[p]+[r]+[q]}{[r]+[q]}$, les lettres entre crochets correspondant à l'attribution donnée en Figure 90. La Figure 92 montre l'évolution du DP calculé. Celui-ci augmente de façon quasi-linéaire au cours des 8 premières heures (Figure 92A). À partir de 8h, cette augmentation s'accroît fortement (Figure 92B).

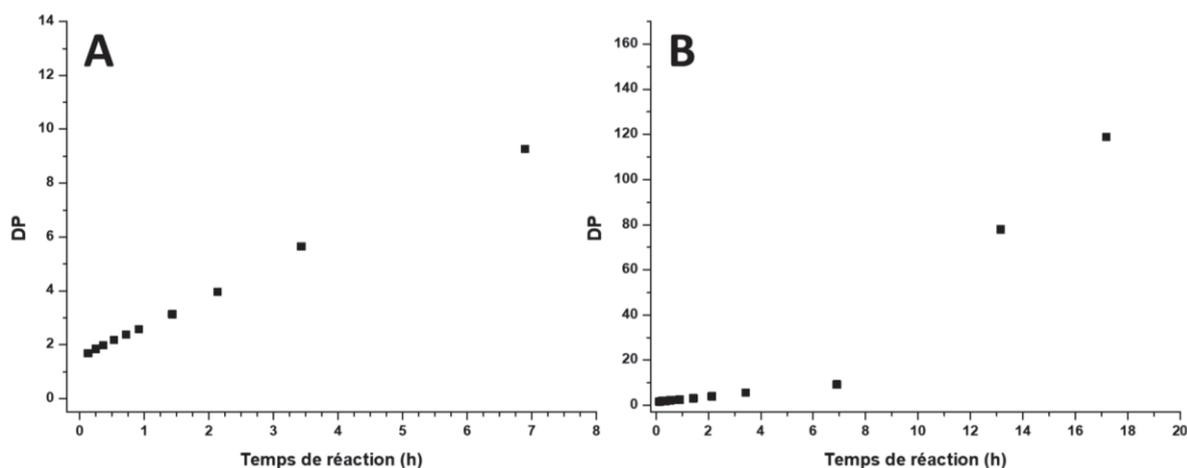


Figure 92 - Degré de polymérisation (DP) du PACH formé à partir des monomères TDC et DHS dans DMSO-d₆ + 0,05% volumique d'HCl. A) Durant les 8 premières heures réactionnelles, B) Durant les 18 heures réactionnelles.

Selon les résultats obtenus en spectrométrie de masse MALDI-TOF, cette augmentation du DP correspondrait à la fois à la formation d'oligomères linéaires de plus en plus longs, mais également à la formation de macrocycles. Comme il n'est *a priori* pas possible en RMN de distinguer les pics correspondant aux motifs de répétition des oligomères linéaires de ceux des macrocycles, le calcul du DP est ici faussé (les macrocycles n'ayant pas d'extrémité de chaîne aldéhyde ou thiophène), et ne rend pas compte de la masse moyenne en nombre réelle des chaînes. Néanmoins l'observation de deux pentes différentes sur l'évolution du DP en fonction du temps pourrait traduire deux étapes dans le processus de formation des chaînes : i) une première étape d'augmentation préférentielle des chaînes linéaires (jusqu'à DP = 10), puis ii) une phase de cyclisation de ces chaînes lorsque ce DP critique est atteint.

b. Comparaison avec la réaction non catalysée

La comparaison de l'analyse cinétique par RMN des réactions avec le couple DHS/TDC avec ou sans catalyseur souligne plusieurs différences (Figure 93). Tout d'abord, aux temps courts de la réaction catalysée, on voit que l'intermédiaire réactionnel est absent (zones hachurées vertes sur la comparaison de spectres), et que les monomères ne sont présents qu'à l'état de traces (zones hachurées rouges). Cela confirme donc que l'acide introduit a catalysé la réaction, et particulièrement la seconde étape (élimination de l'eau). Le taux de conversion en acylhydrazone est alors de 99 % dès 8 minutes de réaction, alors qu'il est de 0 % au même temps de réaction sans acide. Le choix de la

comparaison des spectres sur la Figure 93 paraît ainsi pertinent car ils correspondent à un taux de conversion similaire pour des temps de réaction très différents (8 min et 14j).

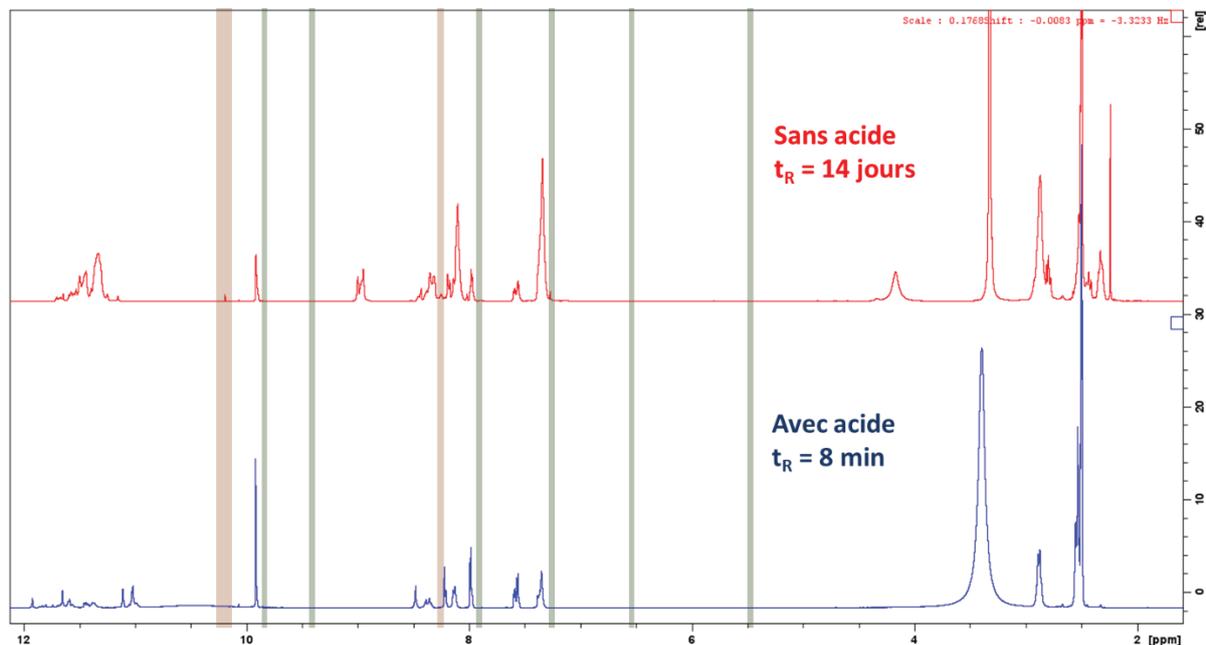


Figure 93 - Superposition des spectres RMN ^1H de la réaction entre le TDC et le DHS (DMSO- d_6 , 10 mg/mL). **En bas** : $t_R = 8$ min, avec ajout de 0,05 % (v/v) HCl 37%. **En haut** : $t_R = 14$ jours, sans ajout d'acide. Les zones hachurées rouges correspondent aux déplacements chimiques attribués aux signaux des monomères, tandis que les vertes correspondent aux déplacements chimiques attribués aux signaux de l'intermédiaire réactionnel.

Si le taux de conversion n'est pas très intéressant à comparer graphiquement dans nos échelles de temps car il est déjà presque à 100% pour la réaction catalysée dès les premières minutes de réaction. En revanche, le degré de polymérisation est plus significatif, comme montré sur la Figure 94. La réaction catalysée montre une augmentation du DP bien supérieure à celle de la réaction non catalysée.

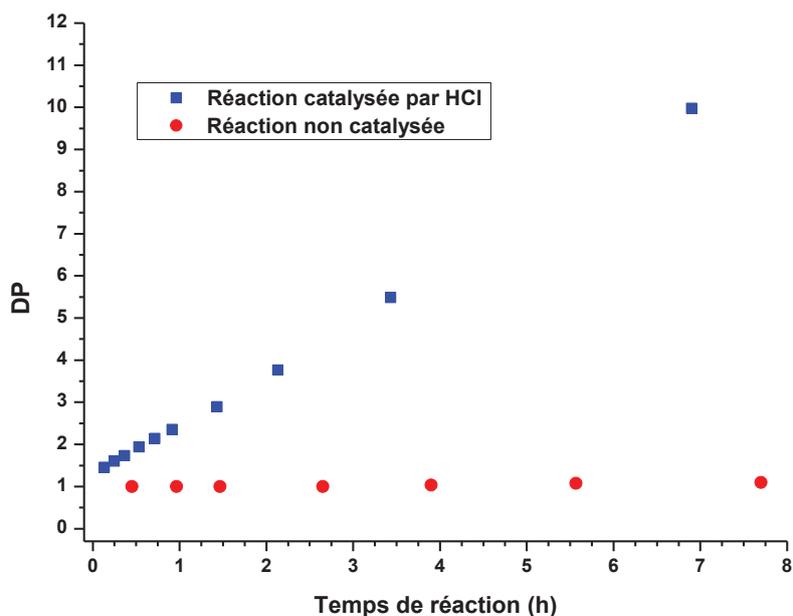


Figure 94 - Comparaison du degré de polymérisation (DP) calculé pour la réaction entre le TDC et le DHS avec ajout d'acide (0,05 % v/v HCl 37%, points bleus) et sans ajout d'acide (points rouges).

5. Conclusion

Pour conclure cette partie traitant de l'influence du pH sur la polymérisation, il a été montré par RMN et par HPLC que la conversion des dihydrazides et des dialdéhydes en polyacylhydrazone est bien catalysée en milieu acide. En particulier, un pH réactionnel d'environ 4 mène à une vitesse de conversion plus rapide qu'à un pH de 1. Ceci pourrait indiquer qu'une valeur de pH réactionnel trop faible pourrait conduire à une protonation des fonctions dihydrazide et ralentir la première étape d'addition. Les analyses RMN ont également montré que le taux de conversion avec 0,05 % d'acide chlorhydrique était de 99% après 8 minutes, contre 14 jours pour atteindre le même taux sans catalyse acide (ces valeurs étant établies sans agitation du milieu réactionnel). En plus du taux de conversion, l'influence de la catalyse acide sur le degré de polymérisation a été évaluée. Il est environ 10 fois supérieur avec la catalyse acide après 8h de réaction.

En revanche, l'analyse extemporanée de la réaction par spectrométrie de masse MALDI-TOF ne montre pas de différence drastique entre une réaction catalysée ou non. Mais il est connu que cette technique n'est pas adaptée pour une analyse quantitative. Quant aux analyses par SEC, elles ont montré une augmentation de la masse molaire des oligomères formés (seulement dans le DMSO), confirmée par RMN. Cependant, au regard des spectres de masse obtenus, le calcul de ce DP est très probablement biaisé par la présence d'oligomères cycliques, malgré le fait qu'il soit relativement similaire à celui observé en spectrométrie de masse MALDI-TOF.

V. Conclusion sur les polyacylhydrazones à base de monomères « modèles »

En conclusion de ce chapitre consacré à l'étude des polyacylhydrazones (PACH) « modèles » en milieu aqueux, il a été dégagé plusieurs aspects essentiels de la polymérisation et de la caractérisation. En premier lieu, une solubilité satisfaisante des monomères dans l'eau n'est pas garante d'une solubilité satisfaisante du polymère formé. En effet, pour une réaction stœchiométrique entre un dihydrazide et un dialdéhyde, il existe une concentration limite avant précipitation pour chaque couple de monomères. La plus haute concentration limite dans l'eau a été établie à 0,5 mg/mL pour le couple DHS/GA, tandis que des concentrations supérieures (10 mg/mL) ont été atteintes dans le DMSO pour le couple DHS/TDC. Les analyses ont donc été menées sur ces deux réactions dans ces deux solvants (eau ou DMSO), en fonction de la technique de caractérisation utilisée et de ses critères de sélection. Malheureusement, lorsque la réaction conduisait à la précipitation du milieu, le précipité n'a pu être analysé (sauf par spectroscopie infrarouge ATR mais sans certitude). Il se pourrait fortement qu'il s'agisse du PACH, mais la resolubilisation de celui-ci pour le vérifier n'a pas été possible.

La polymérisation des dialdéhydes (GA et TDC) et du dihydrazide (DHS) a été prouvée en montrant l'augmentation de l'absorbance à 230 nm de la réaction au cours du temps, ou en observant l'apparition d'un pic en HPLC et l'évolution de son aire avec le temps. Mais les plus formelles mises en évidence de la polymérisation sont issues des spectres de masses MALDI-TOF, et des spectres RMN. Dans les deux cas, des signaux caractéristiques de la formation de fonctions acylhydrazones ont été détectés.

Après avoir mis en évidence la polymérisation, cette dernière a été examinée de façon plus approfondie. Notamment, l'étude du couple DHS/GA dans l'eau a permis de montrer que la réaction entre ces deux monomères est bien catalysée par l'acide. De plus, conformément à la littérature, une valeur de pH optimale semble exister aux alentours de 4. En effet, une valeur de pH plus faible conduit à la fois à une vitesse initiale inférieure, mais également à une diminution du signal UV après quelques heures. Il est alors possible que la réaction soit ralentie dans ces conditions, et que des réactions secondaires existent. En revanche, pour des valeurs de pH égales ou supérieures à 4, une faible conversion en acylhydrazone est observée. Les analyses par RMN ont permis l'identification d'un intermédiaire réactionnel de type carbinolamine (avant l'étape d'élimination de l'eau) pour le couple DHS/TDC, dont la conversion en acylhydrazone est catalysée par un milieu acide, expliquant ainsi le comportement de la polymérisation à des pH acides.

L'étude de ce couple de monomères dans le DMSO a permis de calculer le degré de polymérisation et de déterminer son évolution au cours du temps. Après 8h de réaction, sans agitation et à température ambiante, un DP de 10 est atteint avec une catalyse acide, alors qu'il est seulement de 1 sans catalyse acide.

De plus, les spectres de masse du milieu réactionnel, dans l'eau comme dans le DMSO, montrent la formation de macrocycles, faussant ainsi le calcul du DP par RMN. La présence de ces macrocycles est accompagnée de celle d'oligomères linéaires pour la réaction dans le DMSO, solvant qui permet l'emploi d'une concentration initiale en monomères plus élevée. En effet, la formation de ces macrocycles pourrait être attribuée à la très faible concentration en monomères utilisable, qui est elle-même limitée par la précipitation du polymère.

Ainsi, de nombreuses limites apparaissent pour l'analyse de ces polymères « modèles ». Tout d'abord, l'étude approfondie de ces PACH « modèles » est limitée par leur faible solubilité. Par ailleurs, l'analyse par SEC de la réaction en milieu aqueux n'a pu être effectuée en raison d'interactions entre le soluté et la phase stationnaire des différentes colonnes utilisées. De la même façon, des analyses en *Asymmetric Flow Field Flow Fractionation* (AF4) ont été réalisées, mais seul un très faible signal UV a été obtenu, indiquant soit une trop faible concentration, soit une interaction avec la membrane du conduit d'analyse. Enfin, les techniques de caractérisation les plus pertinentes pour ce travail ont aussi montré des limites. La spectrométrie de masse MALDI-TOF présente un aspect quantitatif limité et un seuil de détection bas pour des masses molaires élevées. Quant à la RMN, la complexité d'attribution des nombreux pics, associée à la nécessité d'une concentration en polymère élevée pour une caractérisation structurale plus complète par des expériences RMN ¹³C et bidimensionnelles, ainsi que l'absence d'agitation durant l'acquisition des spectres, ont été les principaux éléments limitants de la caractérisation.

L'objet du chapitre suivant (Chapitre III) est toujours la description de l'étude de cette polymérisation, mais cette fois-ci avec des monomères plus hydrosolubles que les monomères commerciaux utilisés dans ce Chapitre II. Ces monomères, d'intérêt pour le projet ANR DynaSWEET, ont été synthétisés par le partenaire ICBMS.

Chapitre III :

Synthèse et caractérisation de polyacylhydrazones à partir de monomères d'intérêt

Sommaire du chapitre

I.	INTRODUCTION	130
II.	CARACTERISATION DES MONOMERES D'INTERET	133
1.	<i>Détermination de la solubilité dans l'eau</i>	<i>133</i>
a.	Solubilité des monomères seuls.....	133
b.	Solubilité des mélanges de monomères	134
2.	<i>Analyse de la déprotection des dialdéhydes.....</i>	<i>135</i>
a.	Par spectrométrie de masse MALDI-TOF	135
b.	Par HPLC.....	138
c.	Par RMN ¹ H	140
3.	<i>Analyse de l'hydrolyse du dihydrazide DHI</i>	<i>141</i>
a.	Par spectrométrie de masse MALDI-TOF	141
b.	Par HPLC.....	142
c.	Par RMN ¹ H	144
d.	Mécanismes d'hydrolyse du dihydrazide DHI dans la littérature.....	148
4.	<i>Conclusion.....</i>	<i>150</i>
III.	POLYMERISATION A PARTIR DES MONOMERES D'INTERET	152
1.	<i>Mise en évidence de la polymérisation.....</i>	<i>152</i>
a.	Par spectroscopie UV	152
b.	Par SEC	154
c.	Par spectrométrie de masse MALDI-TOF	156
i.	Réactions réalisées dans l'eau	156
ii.	Réactions réalisées dans le DMSO.....	162
d.	Par RMN	164
2.	<i>Influence de différents paramètres sur la formation des polymères</i>	<i>167</i>
a.	Influence du pH et de l'ajout d'un catalyseur	168
b.	Influence de l'ajout de dialdéhydes supplémentaires.....	170
3.	<i>Conclusion.....</i>	<i>175</i>
IV.	CONCLUSION SUR LES POLYACYLHYDRAZONES A PARTIR DE MONOMERES D'INTERET	177

I. Introduction

À la suite de l'utilisation des monomères « modèles » commerciaux, des monomères d'intérêt pour le projet ANR DynaSWEET ont été employés pour préparer de nouveaux polyacylhydrazones. Ces monomères ont été synthétisés par Fanny Demontrond (Doctorante au laboratoire ICBMS, partenaire du projet) lors de sa thèse.²¹⁰ Ils correspondent à des dihydrazides et à des dialdéhydes soit nommés « Lehn », soit « Ulrich ». Ils sont d'intérêt pour le projet car potentiellement plus hydrosolubles, et pourraient ainsi permettre d'atteindre des concentrations en monomères plus importantes sans précipitation.

Les monomères « Lehn » ont été nommés ainsi car ils ont été inspirés de travaux issus de la thèse de Sophie Lohmann (soutenue à l'Université Louis Pasteur, Strasbourg, en 2003)²¹³, et d'un article de Sreenivasachary *et al.*,¹⁶³ tous deux faisant partie du groupe de recherche de Jean-Marie Lehn. La structure de ces monomères, et leur abréviation, sont données en Figure 95. Notons que les dialdéhydes sont synthétisés et stockés sous une forme protégée par acétalisation, et la déprotection de ces fonctions s'effectue en milieu acide.

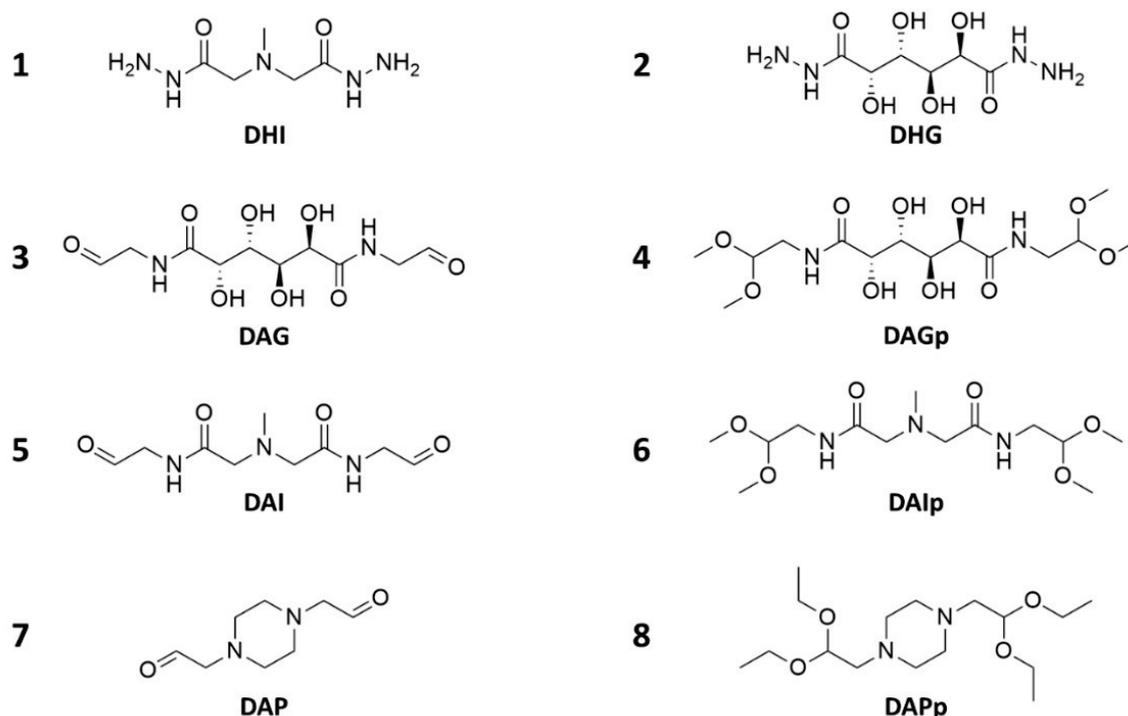


Figure 95 - Structures et abréviations des monomères dits « Lehn ».

Les abréviations sont données dans ce manuscrit selon : « DA » ou « DH » pour respectivement dialdéhyde ou dihydrazide, suivi d'une lettre indiquant la « base » de la molécule, éventuellement suivi d'un « p » si la molécule est sous sa forme acétal protégée. Les « bases » des molécules sont « I » pour « iminodiacétate », « G » pour « glucarate », et « P » pour piperazine. Ainsi, par exemple, DHI signifie « dihydrazide iminodiacétate », DAG « dialdéhyde glucarate », et DAPp « dialdéhyde piperazine protégé ».

Quant au monomère dit « Ulrich » (Figure 96), il correspond à un dihydrazide dont la synthèse est issue d'un article du groupe de Sébastien Ulrich (Bouillon *et al.*¹⁸²). Il sera nommé par la suite DHU pour « dihydrazide Ulrich ». Ce monomère, également d'intérêt, présentant un comportement particulier dans l'eau, sa caractérisation ainsi que sa polymérisation avec un dialdéhyde seront décrites dans un chapitre à part entière (Chapitre IV).

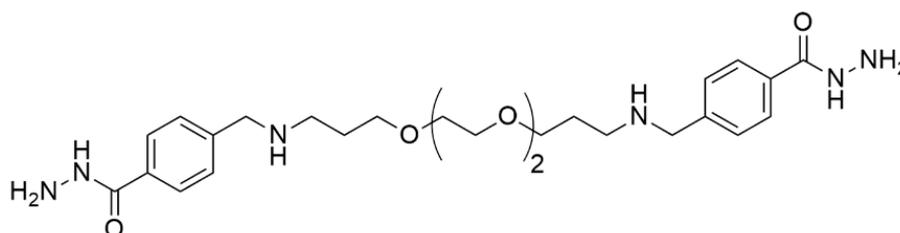


Figure 96 - Structure et abréviation du monomère dont la synthèse est issue des travaux de Bouillon, Ulrich *et al.*¹⁸², nommé DHU pour « Dihydrazide Ulrich ».

Dans le Chapitre II, il a été montré que la réaction entre des monomères « modèles » commerciaux conduisait à une précipitation, pour des concentrations bien plus faibles que les solubilités individuelles des monomères. Afin de rester dans un milieu homogène, il a donc fallu soit se placer à des concentrations faibles dans l'eau (0,5 mg/mL au total), soit utiliser un solvant permettant des concentrations plus élevées (10 mg/mL dans le DMSO).

Quand cela a été possible, la caractérisation du polymère a montré la formation dans l'eau d'oligomères de faible DP, principalement sous forme de macrocycles. Rappelons que cette caractérisation a été difficile car, par exemple, des interactions entre le polymère et la phase stationnaire de la colonne SEC ont rendu impossible leur analyse par cette technique. Ce chapitre III considère des monomères attendus pour être plus solubles dans l'eau, et donc conduisant à l'obtention de polyacylhydrazones à des concentrations et des masses molaires plus élevées sans précipitation. En effet, comme le montre la Figure 97 issue d'un article ayant inspiré le *design* des monomères « Lehn », l'augmentation de la concentration en monomères dihydrazide et dialdéhyde conduit à des polymères de DP plus élevés.¹⁶³ De plus, la théorie de Jacobson-Stockmayer⁷¹ (établie sur la polycondensation linéaire) indique qu'une concentration plus élevée induit une diminution en proportion de macrocycles d'oligomères.

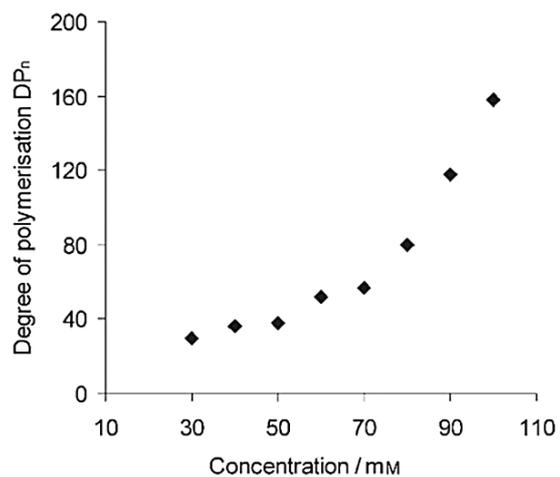


Figure 97 - Influence de la concentration totale en monomères dihydrazide et dialdéhyde sur le degré de polymérisation des polymères obtenus dans l'eau, d'après Sreenivasachary *et al.*¹⁶³ Pour comparaison, dans le Chapitre II, la concentration totale se situait au maximum à 2 mM.

II. Caractérisation des monomères d'intérêt

Une fois sélectionnés et synthétisés, les monomères (dihydrazides et dialdéhydes) ont été caractérisés par différentes méthodes. Leur solubilité dans l'eau, mais également les réactions secondaires pouvant advenir en solution et ayant un potentiel impact sur leur future polymérisation, ont été examinées.

1. Détermination de la solubilité dans l'eau

L'étude de la solubilité dans l'eau des monomères individuellement ou en mélange va être décrite dans les paragraphes suivants.

a. Solubilité des monomères seuls

Cette solubilité a été évaluée visuellement en fonction du temps (après 24h et 10 j) et du pH du milieu. Ainsi, des essais de solubilisation ont été menés dans l'eau pure, mais également en milieu acide contenant de l'acide chlorhydrique (1% v/v de HCl 37%). Un test de neutralisation par ajout de NaOH a également été mené pour évaluer cet effet. L'acidification du milieu conduisant à la déprotection des dialdéhydes, le but de cette étude était également de tester la solubilité aqueuse des dialdéhydes déprotégés. La concentration choisie pour ces tests a été de 10 mM (équivalents à 2-4 mg/mL selon le monomère), supérieure à ce que pouvait offrir les monomères modèles. Les résultats sont donnés dans le Tableau 6.

Tableau 6 - Solubilité visuelle des monomères en fonction du temps et du milieu, à température ambiante et sous agitation magnétique. La concentration est fixée à 10 mM pour chaque monomère.

Monomère	Aspect visuel			
	Eau	Eau + HCl 37% (1% v/v, pH ≈ 1)		
	Après 24h	Après 24h	Après 10j	Après 24h et neutralisation par NaOH
DHG	Opaque blanc	Opaque blanc	Opaque blanc	Opaque blanc
DHI	Limpide	Limpide	Limpide	Limpide
DAGp	Flocons	Limpide	Flocons	Limpide
DAIp	Limpide	Limpide	Limpide	Limpide
DAPp	Limpide	Limpide	Limpide	Limpide

Le Tableau 6 montre que le DHG n'est pas soluble dans l'eau à 10 mM, très probablement du fait de son caractère prononcé de donneur et accepteur de liaisons hydrogènes. En conséquence, le DHG ne sera pas utilisé dans ce chapitre en raison de sa trop faible solubilité dans l'eau. D'une façon similaire, le DAGp (ou le DAG selon l'avancement de la déprotection) n'est pas soluble dans l'eau à un pH neutre, mais le devient après ajout d'acide. D'une manière étonnante, il précipite après une dizaine de jours (ce phénomène a également été observé par le partenaire ICBMS du projet). Les autres monomères ne posent *a priori* pas de souci de solubilité à 10 mM.

b. Solubilité des mélanges de monomères

Une fois les monomères individuellement sélectionnés selon leur hydrosolubilité, leur mélange été analysé visuellement en fonction du temps (après 2h, 48h, ou 10j). La concentration en chacun des monomères a été choisie égale à 10 mM. Notons que la solution de dialdéhyde contient 1% v/v de HCl 37% sous agitation pendant 24h pour le déprotéger. L'ajout équi-volumique de chacun des deux monomères conduit à une concentration finale de 5 mM par monomère et à 0,5% v/v de HCl 37%. Ce dernier jouera alors le rôle de catalyseur de la réaction entre les monomères.

Tableau 7 - Aspects visuels des mélanges de monomères en fonction du temps, à température ambiante et sous agitation magnétique. La concentration finale est de 5 mM par monomère, et les dialdéhydes ont été déprotégés pendant 24h avec 1 % (v/v) HCl (37%), soit une concentration finale en HCl (37%) de 0,5 % v/v.

Monomères		Aspect visuel			
Dihydrazide	Dialdéhyde	t ₀	t + 2h	t + 48h	t + 10j
DHI	DAG	Limpide	Limpide	Limpide	Flocons
DHI	DAI	Limpide	Limpide	Limpide	Limpide
DHI	DAP	Limpide	Limpide	Limpide	Limpide

Le Tableau 7 révèle que les solutions contenant le DHI, le DAI et le DAP ne montrent pas de signe de précipitation jusqu'à 10j après mélange. En revanche, on retrouve ici le comportement singulier du DAG, dont la réaction avec le DHI montre une précipitation sous forme de flocons après 10j.

2. Analyse de la déprotection des dialdéhydes

Comme mentionné dans l'introduction, les fonctions aldéhyde des monomères dialdéhydes utilisés lors de ce travail sont protégées avec des acétals pour permettre une meilleure conservation de celles-ci sans réaction secondaire. Ainsi, afin que ces monomères puissent réagir avec les dihydrazides, ils doivent être préalablement déprotégés en milieu acide. L'étude de cette étape est le but des analyses présentées ci-après. Les différentes techniques utilisées et présentées successivement sont : la spectrométrie de masse MALDI-TOF, les chromatographies HPLC ou SEC, et la spectroscopie RMN.

a. Par spectrométrie de masse MALDI-TOF

La déprotection des dialdéhydes a été analysée par spectrométrie de masse MALDI-TOF, en comparant les spectres de masse de solutions de dialdéhydes de 10 mM, avec et sans acide. Plus précisément, la déprotection a été effectuée en utilisant une solution aqueuse de 1% v/v d'acide chlorhydrique 37% (conduisant à une valeur de pH de 1), sous agitation pendant 12 h.

Après ajout de cet acide, les spectres de masse du DAI (Figure 98), du DAP (Figure 99) ou du DAG (Figure 100) révèlent des pics correspondant aux (i) dialdéhydes protégés (*i.e.* espèces initiales, cercles orange), (ii) dialdéhydes protégés avec une extrémité hémiacétal (cercles bleus), (iii) dialdéhydes protégés à une seule extrémité (avec acétal ou hémiacétal, cercles verts ou rouges), et enfin (iv) dialdéhydes totalement déprotégés (cercles violets). Les codes couleurs et les différentes espèces détectées au cours de l'étape de déprotection sont résumés sur le Tableau 8.

Tableau 8 - Composés issus de la déprotection des dialdéhydes, avec leur structure chimique. Dans le cas du DAP, la protection est effectuée avec des groupements éthyles et non méthyles.

Dénomination	Structure chimique	Couleur
Diacétal		
Acétal/Hémiacétal		
Dialdéhyde semi-protégé		
Dialdéhyde semi-protégé hémiacétal		
Dialdéhyde déprotégé		

D'après les spectres de masse ci-dessous, l'existence d'espèces déprotégées dans ces conditions est donc prouvée pour les dialdéhydes DAG et DAI. Cependant, aucune espèce déprotégée n'apparaît dans les spectres de masse du DAP.

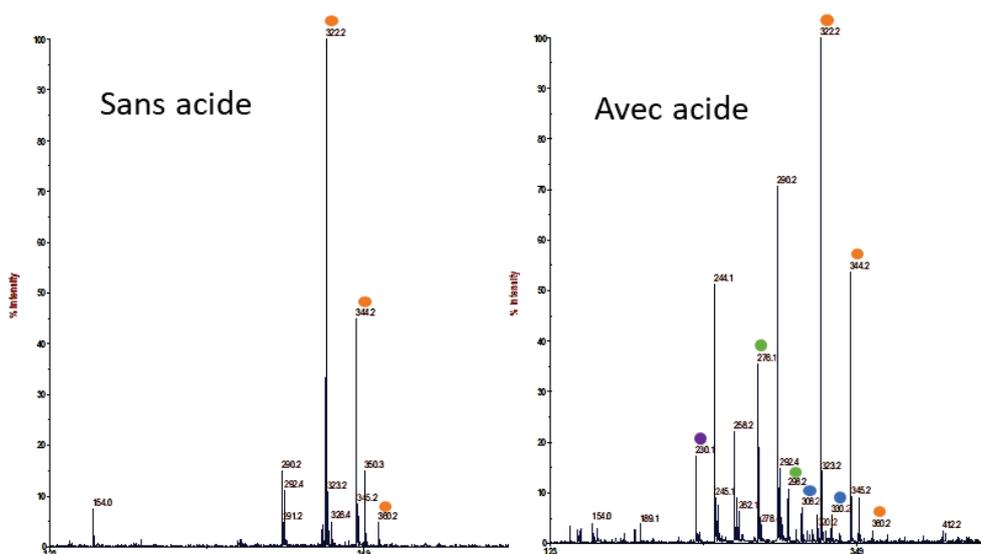


Figure 98 - Spectres de masse MALDI-TOF positifs (matrice DHB) du DAIp sans ajout d'acide (à gauche), et avec ajout de 1% (v/v) HCl (à droite), concentration de 10 mM dans l'eau. Les cercles orange correspondent au DAIp (avec respectivement des adduits H^+ , Na^+ et K^+), les cercles bleus correspondent au DAIp dont une extrémité est sous la forme hémiacétal, les cercles verts sont attribués au DAI semi-protégé ($DAIp_{1/2}$), avec des adduits H^+ et Na^+ , et le cercle violet correspond au DAI ($+H^+$).

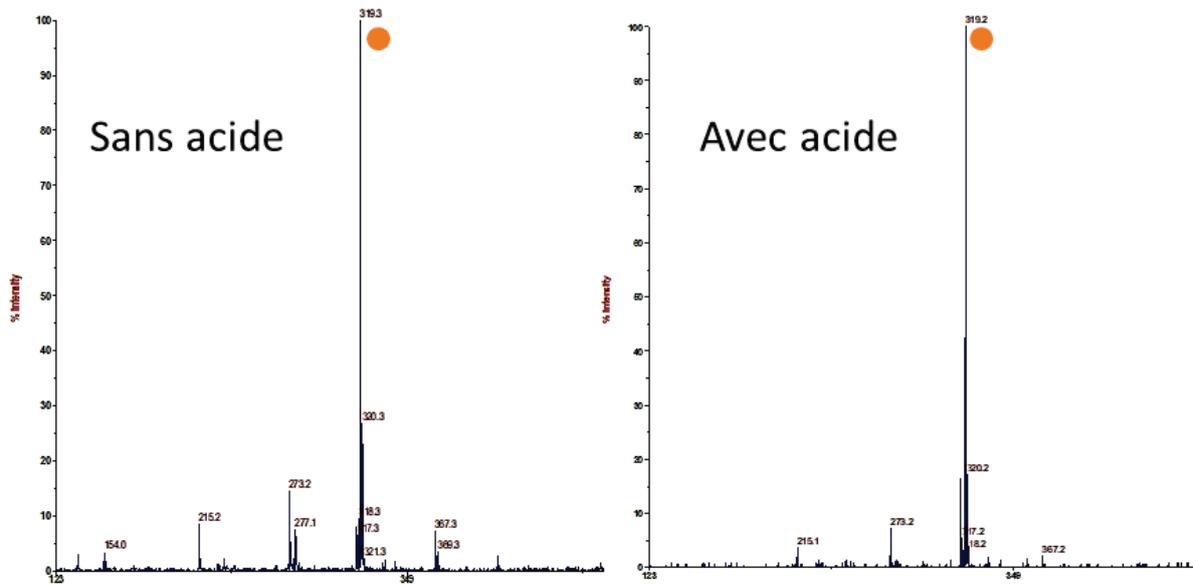


Figure 99 - Spectres de masse MALDI-TOF positifs (matrice DHB) du DAPp sans ajout d'acide (à gauche), et avec ajout de 1% v/v HCl (à droite), concentration de 10 mM dans l'eau. Le cercle orange correspond au DAPp (+H⁺). Les autres pics correspondent aux pics caractéristiques de la matrice utilisée.

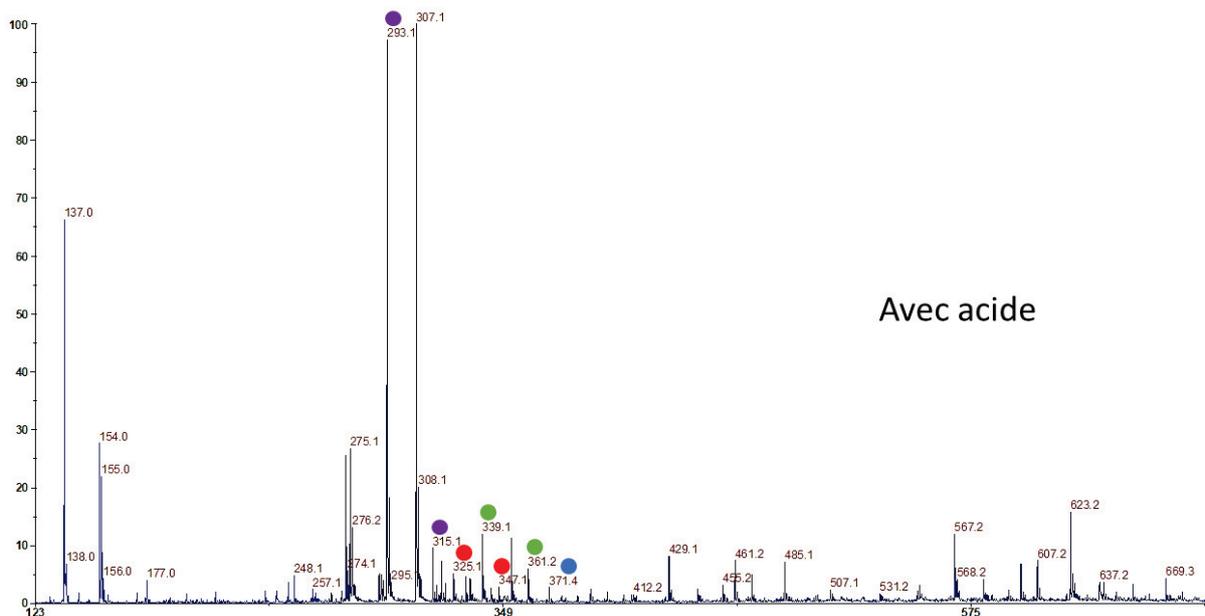


Figure 100 - Spectres de masse MALDI-TOF positifs (matrice DHB) du DAGp avec ajout de 1% v/v HCl, concentration de 10 mM dans l'eau. Le cercle bleu correspond au DAGp dont une extrémité est sous la forme hémiacétal (+H⁺), les cercles verts sont attribués au DAG semi-protégé (DAGp_{1/2}), avec des adduits H⁺ et Na⁺, et les cercles rouges correspondent au DAGp_{1/2} hémiacétal (avec adduits H⁺ et Na⁺), et les cercles violets sont attribués au DAG (+H⁺ et Na⁺). Le spectre de masse n'est pas comparé au DAGp sans acide, car celui-ci n'est pas soluble dans l'eau dans ces conditions.

L'étude de l'étape de déprotection dans ces conditions nécessite des analyses orthogonales pour confirmer ces conclusions. Notons que des espèces à +14 uma des pics monoisotopiques du DAG, DAI, DAG_{p1/2} et DAIp_{1/2} sont détectées. Après examen des structures possibles, aucune n'a été jugée suffisamment plausible. Néanmoins, celles-ci seront discutées dans les paragraphes suivants.

b. Par HPLC

Les analyses obtenues par spectrométrie de masse MALDI-TOF n'étant pas quantitatives dans les conditions utilisées, des études complémentaires ont été réalisées en HPLC.

La caractérisation de l'étape de déprotection par HPLC-MS a été le fruit d'une collaboration avec Élodie Fromentin (CCSM, Université Claude Bernard Lyon 1). En effet, en utilisant la Chaîne B, une optimisation de la séparation des espèces présentes dans la solution a été effectuée à l'IMP (conditions : Colonne HPLC 4, Nucleosil Nautilus, éluant : eau/ACN 100/0 v/v pendant 8 min puis gradient linéaire de 100/0 à 20/80 v/v pendant 12 min). Cette optimisation réalisée, la méthode de séparation et la colonne ont été transférées au CCSM pour les analyser avec un détecteur de spectrométrie de masse (MS). Ces analyses ont permis l'attribution des différents pics obtenus en HPLC. L'évolution de ces pics a pu être ensuite suivie à l'IMP en fonction du temps en utilisant une détection UV à 250 nm. Cette évolution pour le DAIp (3h, 48h, 5j, 8j, 14j après ajout de 1% (v/v) de HCl) est présentée en Figure 101.

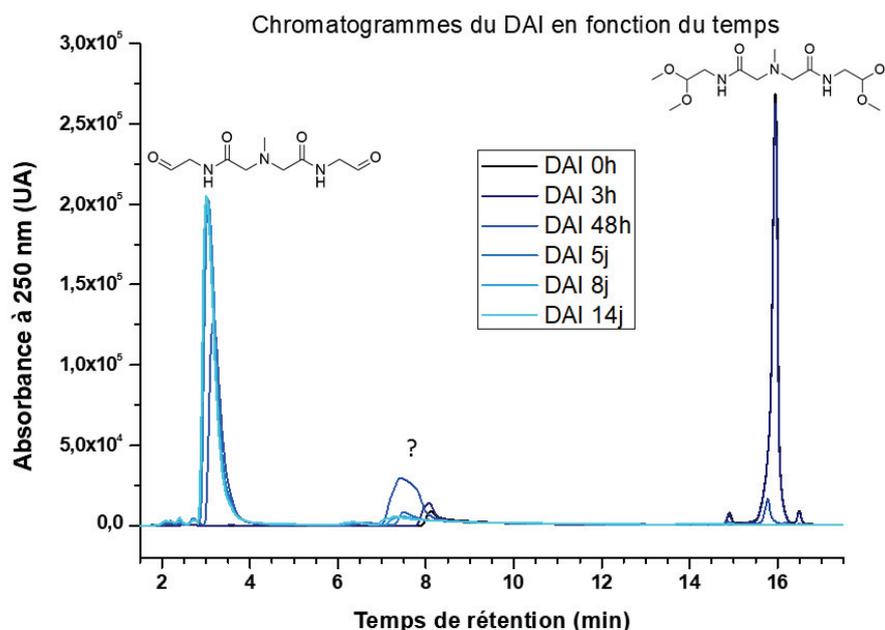


Figure 101 - Évolution des chromatogrammes HPLC du DAI (10 mM dans l'eau) en fonction du temps (après ajout de 1% v/v de HCl) à température ambiante et sous agitation. L'attribution des pics a été réalisée avec un détecteur MS. Une espèce correspondant à une masse de 244,13 uma (notée « ? ») n'a pas été attribuée. Détection UV à 250 nm.

D'après la Figure 101, il est possible d'affirmer que la conversion du DAIp en DAI est complète après 5 jours à température ambiante et sous agitation. Notons que jusqu'à 3h, l'échantillon est resté dans le passeur d'échantillons à 15 °C. Ainsi, la vitesse de déprotection est probablement sous-estimée dans cette étude cinétique. Le pic annoté « ? » dans cette figure correspond à une espèce d'une masse monoisotopique de 244,13 uma, déjà observée dans les spectres de masse MALDI-TOF, et non attribuée à ce jour.

L'étude cinétique de la déprotection du DAG (3h ou 48h après ajout de l'acide), réalisée dans les mêmes conditions, est présentée en Figure 102.

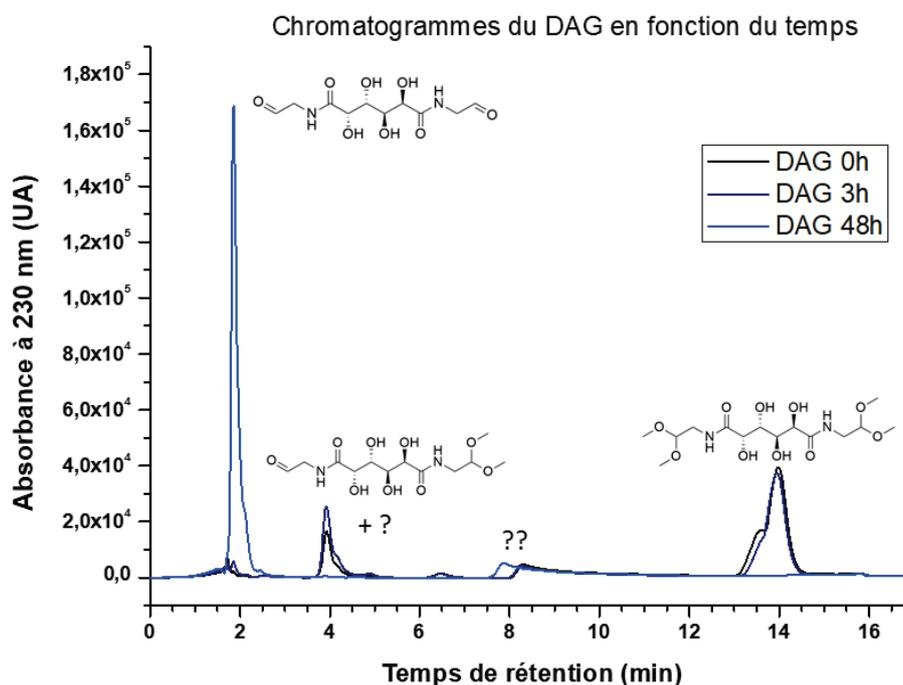


Figure 102 - Évolution des chromatogrammes HPLC du DAG (10 mM dans l'eau) en fonction du temps (après ajout de 1% v/v d'HCl) à température ambiante et sous agitation. L'attribution des pics a été réalisée avec un détecteur MS. Une espèce (« ? »), superposée au DAG_{1/2}, correspondant à une masse de 307,11 uma, n'a pas été attribuée. Celle marquée par « ?? », correspondant à une masse de 248,09 uma n'a pas été identifiée non plus. Détection UV à 250 nm.

Pour ce monomère, l'étude s'est arrêtée à 48h en raison de l'apparition d'un précipité dans la solution après. Notons que sa déprotection est totale en 48h. Cependant, à l'instar de la déprotection du DAI, on peut remarquer deux espèces (à 307,11 et 248,09 uma), non identifiées et également observées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. La masse de ces espèces se situe à une masse inférieure de 32 uma par rapport à la masse du dialdéhyde protégé et à la masse du dialdéhyde semi-protégé. Une structure possible pourrait être celle donnée en Figure 103, interprétable par une élimination de méthanol sur l'acétal. D'une façon équivalente, ces dérivés peuvent aussi être observés déprotégés sur l'autre extrémité. Cependant, d'un point de vue mécanistique, ces composés

paraissent peu plausibles et leur structure nécessite d'être confirmée par RMN ^1H . Ils seront appelés « PDAI » et « PDAG » dans la suite de ce chapitre, notamment dans les analyses par spectrométrie de masse.

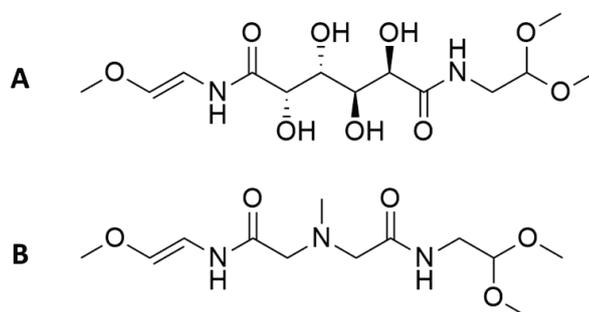


Figure 103 - Hypothèses structurales de composés dérivés des dialdéhydes DAGp (A) et DAIp (B) pouvant correspondre à l'écart de 32 uma observé en spectrométrie de masse MALDI-TOF et LC-MS. Ces composés seront nommés « PDAG » et « PDAI » dans la suite de ce chapitre.

Une analyse par SEC a également été réalisée, et a montré l'apparition de pics supplémentaires suite à la déprotection, indiquant une fois de plus que les espèces formées ont une interaction avec la phase stationnaire des colonnes SEC (Annexe 2).

c. Par RMN ^1H

Enfin, pour encore compléter ces analyses, des spectres RMN ^1H ont été enregistrés pendant 24h sur les solutions de dialdéhydes protégés (dans le D_2O), dans lesquelles des proportions de 0 à 1% (v/v) de HCl ont été ajoutées. Les spectres obtenus avec 0,1% de HCl montrent une très faible évolution du signal du CH acétal de l'aldéhyde protégé à 4,6 ppm avec l'apparition d'un triplet à 5,1 ppm qui a été attribué à l'hémiacétal, dans le cas du DAIp.

Sur les spectres enregistrés avec 1% de HCl, les signaux caractéristiques du DAIp ne sont plus présents et le signal à 5,1 ppm est majoritaire. Un singulet vers 9,5 ppm, attribué au proton de l'aldéhyde, est également observé (Figure 104). La déprotection est donc plus efficace avec 1% (v/v) d'acide chlorhydrique qu'avec 0,1% (v/v). Une concentration élevée en HCl favorise donc la déprotection, celle-ci n'est cependant pas totale à 24h, ce qui est cohérent avec ce qui est observé en HPLC. Notons que cette déprotection partielle n'est peut-être pas limitante puisque la réaction de la faible proportion d'aldéhyde déprotégé est censée déplacer l'équilibre de la déprotection en faveur de cette espèce.

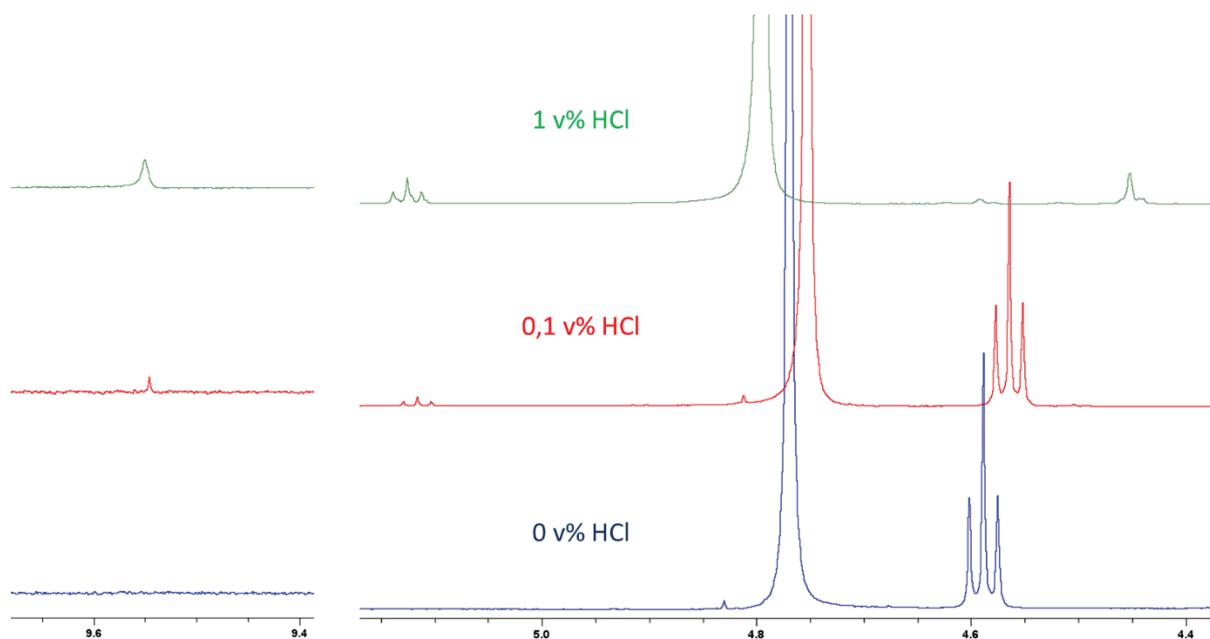


Figure 104 - Spectre RMN ^1H du DAIP (10mM, D_2O), dans lequel une quantité de 0 v% (bleu), 0.1 v% (rouge) ou 1 v% (vert) d'acide chlorhydrique (37%) est ajoutée pendant 24h. Les singulets à 4.8 ppm sont attribués à l'eau.

3. Analyse de l'hydrolyse du dihydrazide DHI

Par ailleurs, outre l'étape de déprotection des dialdéhydes à effectuer avant la polymérisation, une précaution est à prendre lors de cette polymérisation : celle de ne pas hydrolyser les fonctions hydrazide des monomères dihydrazide dans l'eau. Les paragraphes suivants ont pour but de détailler les analyses démontrant les conditions de cette hydrolyse sur le monomère DHI (le monomère DHG s'est avéré trop peu soluble et n'a donc pas été utilisé), ainsi que d'identifier son mécanisme, et les conditions dans lesquelles cette hydrolyse est catalysée.

a. Par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF d'une solution de DHI, à 10 mM agitée 24h à température ambiante dans l'eau, a tout d'abord été effectuée. Le spectre de masse obtenu révèle (i) comme attendu, la structure du DHI (Figure 105 A et B), (ii) mais également une forme dimérisée (Figure 105 D), provenant de l'addition d'un dihydrazide sur un autre, (iii) ainsi que le DHI hydrolysé sur une extrémité (Figure 105 C). Cette hydrolyse conduit à la formation d'une fonction carboxylique. À côté de ces pics, d'autres, mineurs et non identifiés à ce jour, existent.

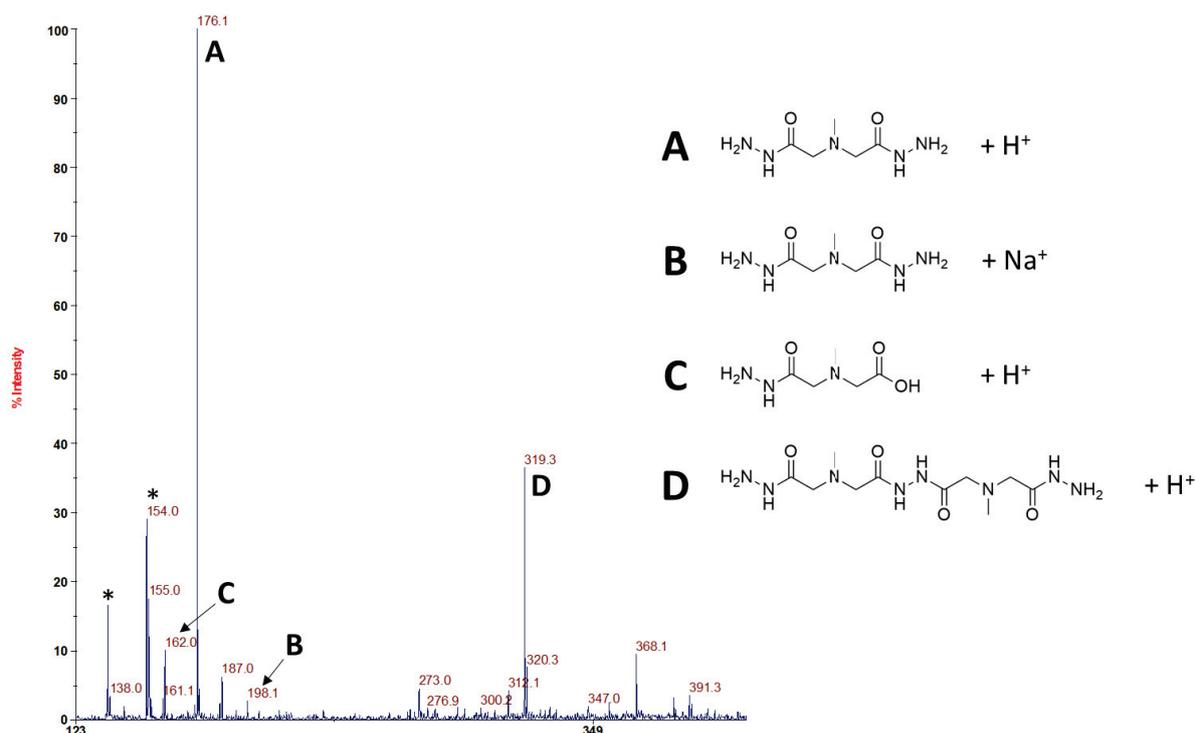


Figure 105 - Spectre de masse MALDI-TOF positif (matrice DHB) d'une solution de DHI (10 mM, 24h, agitation à température ambiante). * = matrice.

La technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF ne permettant pas une analyse quantitative des différentes espèces présentes, des techniques de caractérisation complémentaires ont été employées afin d'approfondir l'étude de cette hydrolyse.

b. Par HPLC

La solution de DHI a été ensuite analysée par HPLC, en utilisant la Chaîne B et la Colonne HPLC 4 (Nucleosil Nautilus ; éluant eau/ACN 100/0 v/v pendant 8 min puis un gradient linéaire de 100/0 à 20/80 v/v pendant 12 min, avec une détection UV à 250 nm). La séparation de plusieurs pics a d'abord été optimisée sur ce système en utilisant la détection UV, puis l'attribution de chaque pic a été effectuée par LC-MS en utilisant la même colonne et les mêmes conditions d'analyse. Ensuite, une étude cinétique (3h, 48h, 5j, 8j, 14j) a été réalisée, avec et sans ajout d'acide chlorhydrique (1 v% HCl, 37 %) ; les chromatogrammes sont présentés en Figure 106.

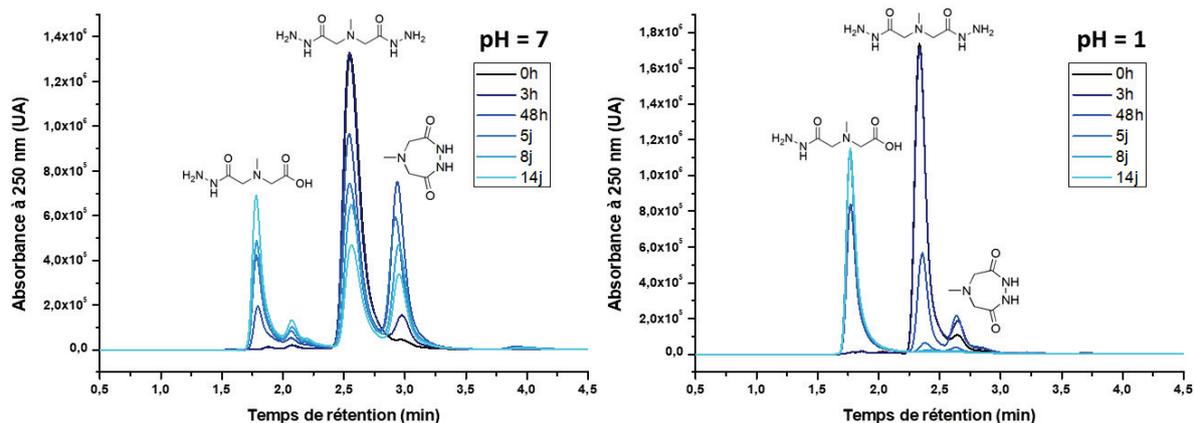


Figure 106 - Évolutions des chromatogrammes HPLC d'une solutions de DHI (10 mM) à différents temps (agitation à température ambiante). **À gauche** : sans ajout d'acide chlorhydrique (milieu à pH = 7), **à droite** : avec ajout d'acide chlorhydrique (1 v% HCl, 37 %, milieu à pH = 1). Détection UV à 250 nm.

Étonnamment, la structure du DHI dimérisé, détecté par spectrométrie de masse MALDI-TOF, n'est pas visible dans ces chromatogrammes. En revanche, un composé « intermédiaire » est présent à un temps de rétention de 3,0 min. Il correspond au DHI sous forme cyclisée, provenant d'une addition nucléophile d'une des extrémités sur l'autre. L'évolution des chromatogrammes HPLC avec le temps confirme bien son caractère d'intermédiaire réactionnel, entre le DHI initial (temps de rétention = 2,5 min) et le DHI hydrolysé final (temps de rétention = 1,8 min). Par ailleurs, la comparaison de cette évolution en fonction du pH du milieu (pH 1 ou 7) montre la catalyse de cette hydrolyse en milieu acide. Le DHI est d'ailleurs complètement hydrolysé après 8 jours dans l'eau à pH = 1 à température ambiante.

Enfin, notons que sans ajout d'acide, le DHI hydrolysé est élué en deux temps de rétention proches (1,7 et 2,1 min). Pour les deux, le spectre de masse correspond bien à ce composé, et l'aire de ces pics varie de la même façon avec le temps. Une hypothèse d'interprétation est que la fonction d'acide carboxylique co-existe avec sa forme carboxylate à un pH neutre, présentant des interactions différentes avec la phase stationnaire de la colonne HPLC. Cet équilibre serait ainsi fortement déplacé en milieu acide, conduisant à l'élué d'un seul pic à 1,7 min à pH = 1 (Figure 106, à droite).

c. Par RMN ^1H

Une étude cinétique de cette hydrolyse a également été réalisée par RMN ^1H , en utilisant des solutions de DHI à 10 mM dans du D_2O , avec ou sans ajout de 0,05 v% final d'HCl 37%. Pour cela, des prélèvements réguliers, issus d'un flacon laissé sous agitation à température ambiante, ont été effectués. La superposition des spectres enregistrés à différents temps d'agitation (3h, 24h, 48h, 5j, 7j), et une proposition d'attribution des pics, sont données en Figure 107.

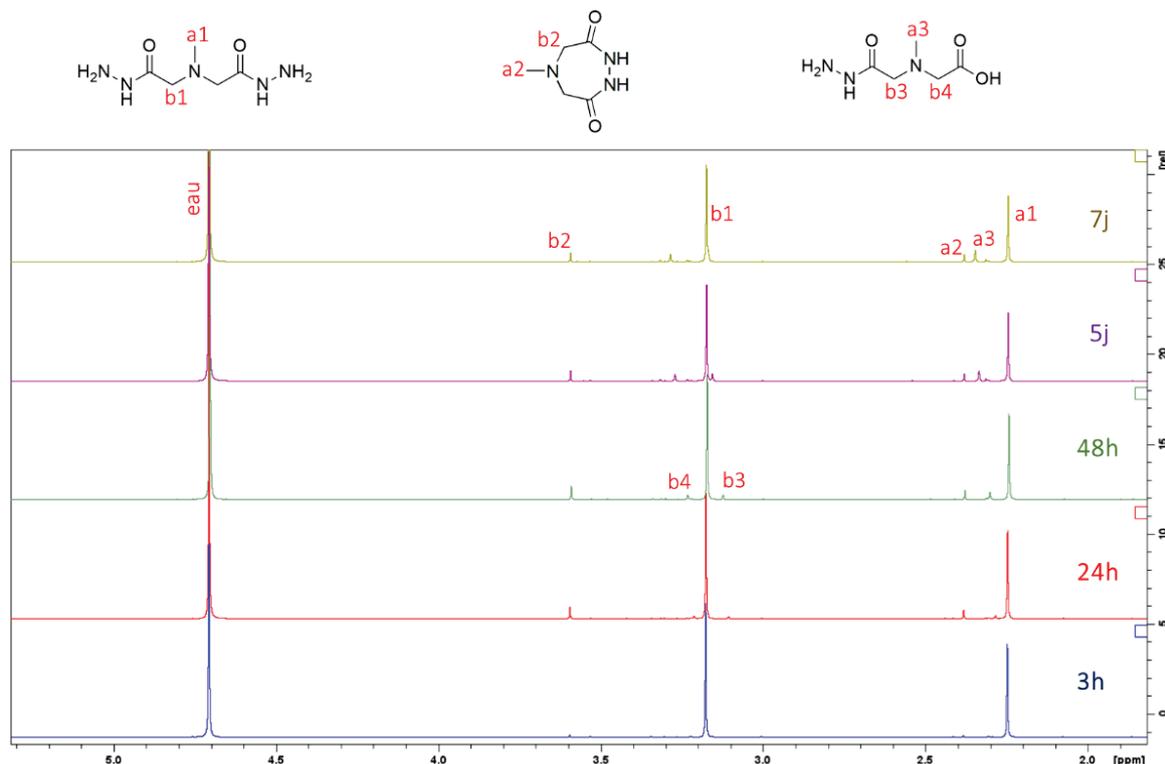


Figure 107 - Superposition de spectres RMN ^1H d'une solution de DHI (D_2O , 10 mM) enregistrés au cours du temps. Spectromètre 400 MHz, 298 K.

L'évolution de ces spectres montre l'apparition de signaux différents de ceux du DHI. Ceux-ci ont été attribués au produit d'hydrolyse et à la forme intermédiaire cyclisée, mises en évidence précédemment par LC-MS. En revanche, il paraît étonnant que le signal attribué au proton « b2 » (CH_2 de l'intermédiaire cyclisé) soit un singulet, car comme la structure est cyclique, il n'y a plus de libre rotation autour de la liaison sigma, et ainsi les deux H du CH_2 ne seraient plus équivalents. Ceci conduirait théoriquement à un doublet de doublet (représentation en 3D au niveau du plan du cycle sur la Figure 108). Plusieurs hypothèses à cela peuvent être avancées : 1) les protons « a2 » et « b2 » correspondent en fait à la forme intermédiaire dimérisée, détectée en spectrométrie de masse MALDI-TOF mais pas en HPLC (avec détection MS ou UV), ou 2) le signal des protons « b2 » de l'espèce cyclique

résulte en fait en un singulet d'une manière que nous n'expliquons pas, l'intermédiaire observé serait ainsi cyclique, ce qui serait cohérent avec les études cinétiques effectuées en LC-MS (pas ou très peu de dimère par rapport au cycle). En l'état actuel de nos connaissances et avec « seulement » des spectres 1D- ^1H , il n'est pas possible de trancher entre ces deux hypothèses.

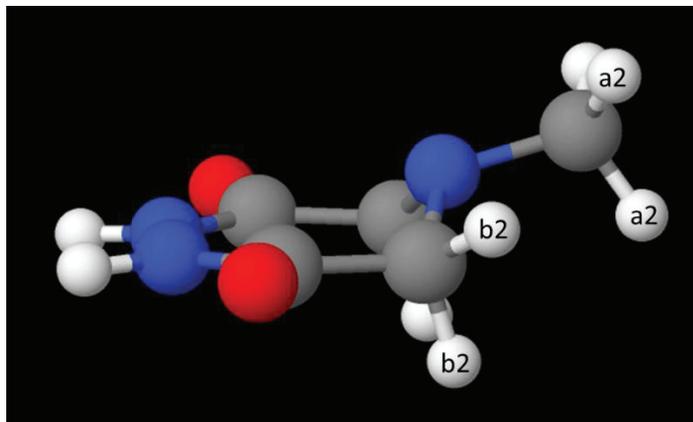


Figure 108 - Représentation 3D de la structure chimique de la forme intermédiaire cyclisée, dans un plan horizontal par rapport au cycle à 7.²¹⁴

La même étude cinétique a été réalisée pour une solution de DHI contenant de l'acide chlorhydrique ; les spectres RMN ^1H sont montrés en Figure 109. D'une façon similaire, on retrouve ici les mêmes composés, avec des déplacements chimiques modifiés à cause de la protonation de certains azotes, mais ces déplacements chimiques ne varient pas au cours du temps.

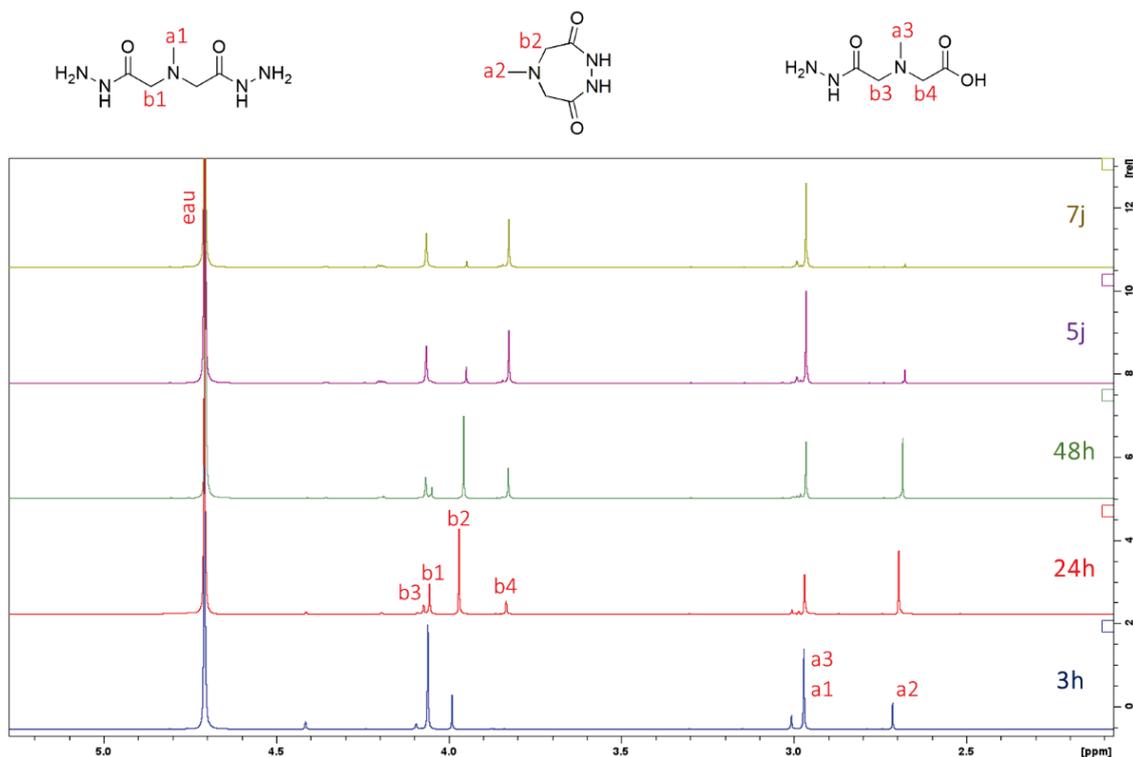


Figure 109 - Superposition de spectres RMN ^1H d'une solution de DHI (D_2O + HCl 99,5/0,5 (v/v), 10 mM) enregistrés au cours du temps. Spectromètre 400 MHz, 298 K.

En intégrant les aires de ces pics, il est ainsi possible de calculer la proportion relative de chaque espèce au cours du temps. Les protons des CH_2 sont ceux utilisés pour le calcul (en réalisant une moyenne pour les protons b3 et b4). Les évolutions des proportions de chaque espèce obtenues en RMN ^1H sont montrées en Figure 110 (A et B). Elles sont comparées aux graphes de proportions des espèces déterminées à l'aide des aires en HPLC (à 250 nm), et présentées en Figure 110 (C et D). Notons que les différences de proportion observées entre les analyses en RMN ^1H et celles en HPLC peuvent être imputables à des différences de coefficients d'extinction molaires selon les espèces considérées. Ceci expliquerait les différences entre ces graphes.

Toutefois, à $\text{pH} = 1$, des résultats semblables sont obtenus (Figure 110 B et D) pour une échelle de temps longue (une semaine), à savoir, la quasi-absence du DHI et de l'intermédiaire cyclique. De plus, pour ce même pH , la quantité de dihydrazide cyclique atteint un maximum en 48h, puis décroît. Des résultats semblables sont aussi obtenus pour un pH neutre (Figure 110 A et C), même si les valeurs des proportions déterminées à partir des analyses RMN sont différentes de celles en HPLC, comme expliqué plus haut. Les valeurs obtenues en détection UV (HPLC) ne sont là qu'à titre qualitatif car elles confirment la présence d'un maximum pour la quantité d'intermédiaire (aux alentours de 48h).

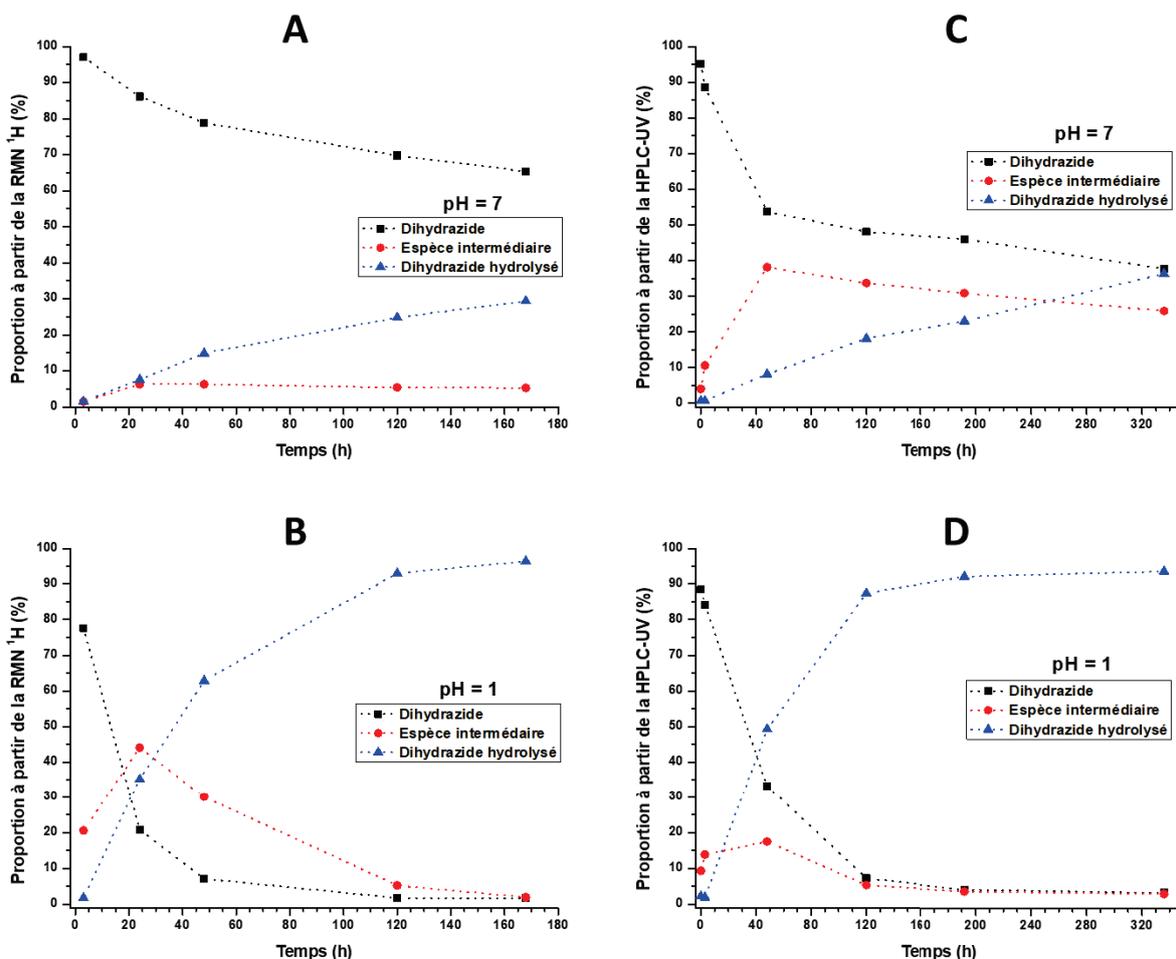


Figure 110 - Proportions des espèces détectées en fonction du temps, **A)** par RMN ¹H à pH = 7, **B)** par RMN ¹H à pH = 1, **C)** par HPLC-UV à pH = 7, **D)** par HPLC-UV à pH = 1.

Ces graphes de proportions des espèces démontrent également que l'espèce intermédiaire peut difficilement être un dimère, en raison de la contribution de protons de type « b1 » sur ces espèces, qui modifieraient le rapport de proportions entre le dihydrazide DHI et l'intermédiaire réactionnel. La Figure 111 montre les différentes courbes obtenues pour un pH = 1, en faisant l'hypothèse que l'intermédiaire observé est un cycle (Figure 111A) ou un dimère (Figure 111B). L'apparition de proportions négatives avec l'hypothèse d'un dimère conforte le choix d'attribuer les signaux de l'intermédiaire à l'espèce cyclisée, même si des expériences supplémentaires sont nécessaires pour trancher avec certitude.

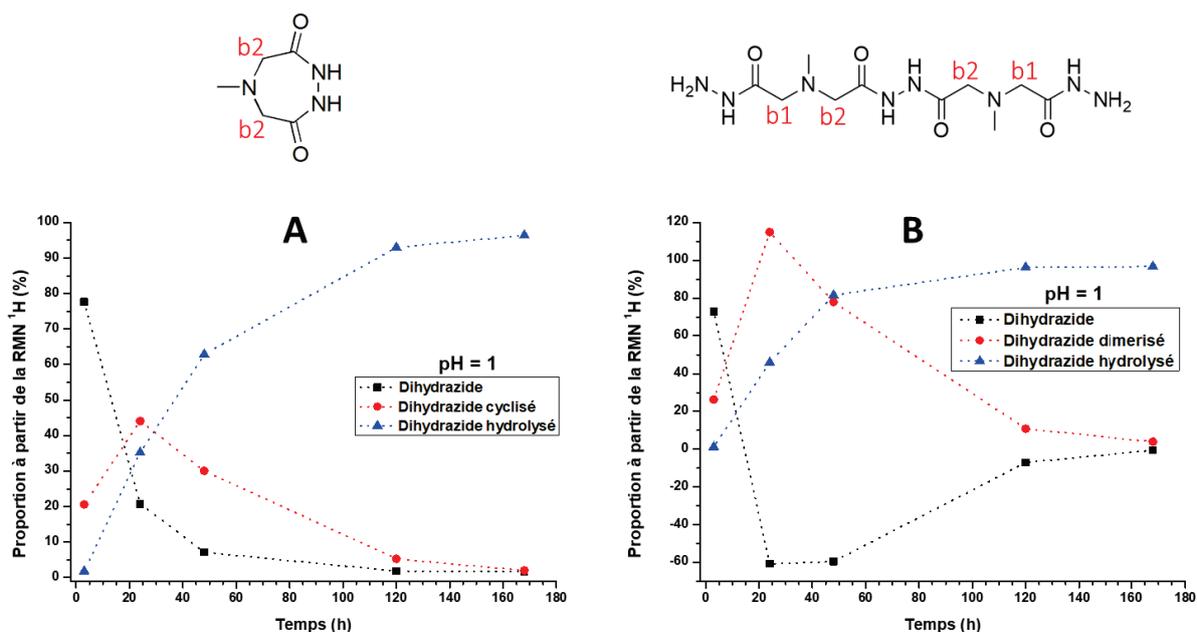


Figure 111 - Proportions des espèces détectées en fonction du temps, par RMN ^1H à pH = 1. **A)** En faisant l'hypothèse que l'intermédiaire est la forme cyclisée. **B)** En faisant l'hypothèse que l'intermédiaire est la forme dimérisée.

Ces graphes, présentant la proportion des espèces au cours du temps, en prenant en compte les espèces intermédiaires cyclisées et/ou dimérisées, permettent d'avancer un mécanisme d'hydrolyse, qui sera discuté et comparé ci-après à ce qui est relaté dans la littérature.

d. Mécanismes d'hydrolyse du dihydrazide DHI dans la littérature

À la lumière des analyses réalisées en spectrométrie de masse MALDI-TOF et RMN ^1H et celles des cinétiques, les mécanismes proposés pour l'hydrolyse du dihydrazide DHI sont donnés en Figure 112. Il convient de noter que ces deux voies d'hydrolyse, faisant intervenir une réaction intra- ou intermoléculaire, ne s'excluent pas, même si la voie intermoléculaire est probablement très minoritaire car non détectée en LC-MS et peu probable en RMN ^1H .

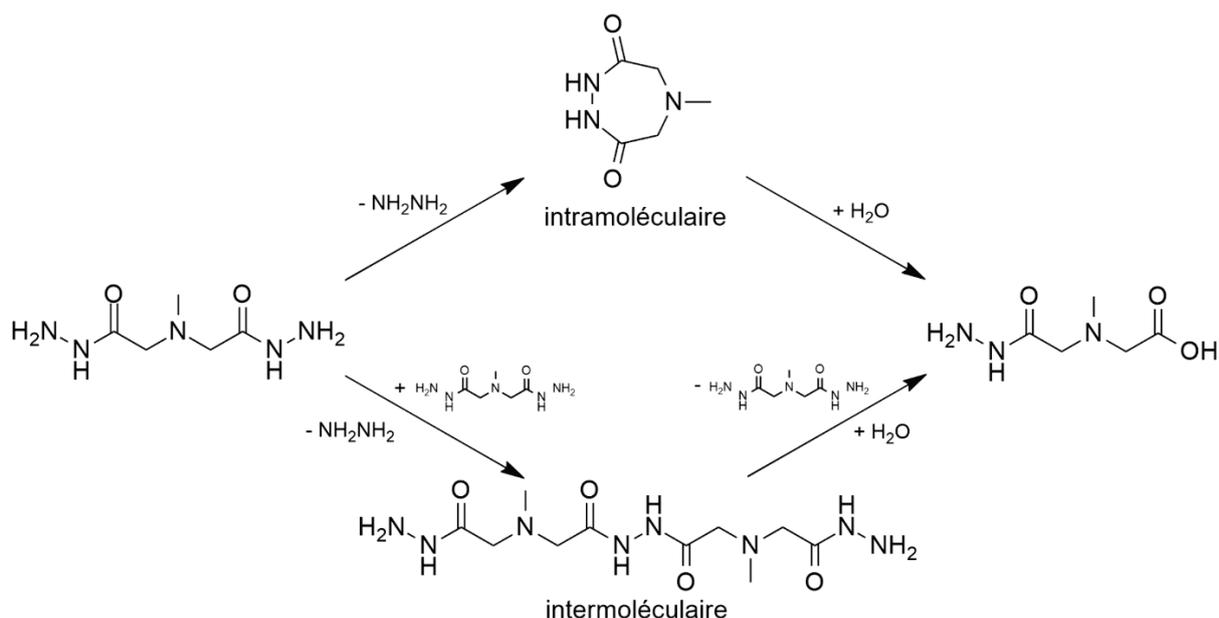


Figure 112 - Mécanisme proposé pour l'hydrolyse du DHI (dans l'eau à température ambiante), faisant intervenir une réaction intra- ou intermoléculaire.

À notre connaissance, aucun article dans la littérature ne décrit de tels mécanismes. Cox et Yates²¹⁵ présentent un mécanisme d'hydrolyse d'hydrazide mais réalisé dans des conditions très acides, nécessitant une double protonation de la fonction hydrazide (Figure 113). Cette hydrolyse a également été étudiée par Mashima et Ikeda^{216,217} dans des conditions très acides ou très basiques. D'autres voies d'hydrolyse ont été explorées mais en impliquant des catalyseurs métalliques (cuivre ou palladium).^{218,219}

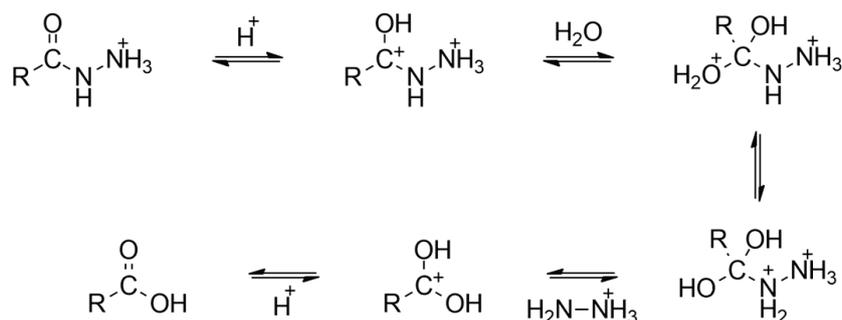


Figure 113 - Mécanisme d'hydrolyse proposé par Cox et Yates²¹⁵, dans un milieu fortement concentré en acide sulfurique.

L'hydrolyse n'a donc pas jamais été étudiée de manière approfondie en conditions douces dans la littérature. Cependant, des articles rapportent la présence de l'intermédiaire cyclique observé (« diazane ») comme étant un produit secondaire non souhaité (Figure 114),²²⁰ ou alors il a été étudié parmi un grand nombre de composés pour l'étude réactionnelle de dérivés semblables.^{221,222}

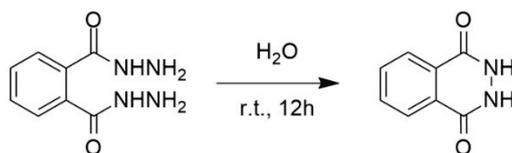


Figure 114 - Réaction secondaire observée par Zhu *et al.*²²⁰, menant à l'hétérocycle dans des conditions aqueuses douces, similaires à celles employées durant ce travail de thèse. Le rendement a été établi à 50%.

Dans tous ces articles²²⁰⁻²²², seul l'hétérocycle a été observé, sans l'hydrolyse que nous avons détectée et étudiée. À ce jour, on peut s'étonner que des équipes ayant travaillé avec des dihydrazides, dans des conditions aqueuses, n'aient pas remarqué cette hydrolyse, qui conduit inévitablement à la formation de polymères de masse molaire plus faible que celle attendue.

4. Conclusion

Pour conclure cette partie sur l'étude des monomères d'intérêt (monomères dits « Lehn »), il a été montré que leur solubilité dans l'eau (et celle de leur produit réactionnel) est plus élevée que celle des monomères « modèles » du Chapitre II. Ceci permet d'atteindre des concentrations suffisamment confortables pour effectuer un plus grand nombre de caractérisation dans l'eau.

Les dialdéhydes (DAG, DAI et DAP) sont conservés sous leur forme acétal protégée, et leur emploi nécessite donc une étape de déprotection en milieu acide. L'étude de cette déprotection a démontré que l'ajout de 1% (v/v) d'acide chlorhydrique (37%) pendant 12h permettait d'obtenir partiellement la forme aldéhyde, en équilibre avec la forme acétal et hémiacétal. C'est le déplacement de l'équilibre provoqué par la réaction entre l'aldéhyde et l'hydrazide qui permettrait ainsi une déprotection totale.

Il a été également montré que le monomère DAGp n'était pas soluble dans l'eau à pH neutre, mais l'était à pH acide (où il se déprotège) seulement pendant quelques jours, cantonnant ses analyses à un intervalle de temps limité. Par ailleurs, le monomère DAPp est difficilement analysable par spectrométrie de masse, mais ses formes déprotégées (DAPp_{1/2} et DAP) sont cependant détectables par SEC ou par RMN ¹H. Enfin, des composés dérivés ont été détectés par spectrométrie de masse pour les monomères DAG et DAI, mais leur structure n'a pas été identifiée en utilisant conjointement la spectrométrie de masse MALDI-TOF, la LC-MS et la RMN ¹H.

Des deux monomères dihydrazides proposés, seul le DHI est hydrosoluble. Cependant, il a été montré que celui-ci s'hydrolysait à une extrémité (en une fonction acide carboxylique) dans l'eau. Les

aspects cinétique et mécanistique ont montré que cette hydrolyse faisait intervenir un hétérocycle ou un dimère par condensation de deux hydrazides. Ensuite, une addition nucléophile de l'eau provoque l'apparition de la forme hydrolysée. Cette réaction est catalysée en milieu acide. Des études par RMN ^1H et LC-MS ont montré que le DHI était quasiment totalement converti en sa forme hydrolysée après une semaine à pH = 1 à température ambiante, et que les formes hydrolysées et intermédiaires étaient loin d'être négligeables après quelques heures à pH = 7.

III. Polymérisation à partir des monomères d'intérêt

Une fois caractérisés, les monomères « Lehn » ont ensuite été utilisés pour préparer des PACH entre deux monomères, un dihydrazide et un dialdéhyde. Comme pour les polymères « modèles », un des principaux objectifs a été ensuite de mettre en évidence cette polymérisation en s'appuyant sur plusieurs techniques de caractérisation complémentaires. Enfin, des polymérisations utilisant plus de deux monomères ont été réalisées et étudiées afin de démontrer la faisabilité d'une copolymérisation et l'aspect dynamique des polymères obtenus.

1. Mise en évidence de la polymérisation

a. Par spectroscopie UV

La mise en évidence de la polymérisation par spectroscopie UV a été réalisée en comparant des spectres UV de différentes solutions (des monomères : dialdéhyde protégé, dialdéhyde déprotégé, dihydrazide, et des réactions entre : dihydrazide et dialdéhyde, dihydrazide et dialdéhyde déprotégé, comme témoin). Les solutions ont été préparées à 2 mM (et 2 mM/monomère pour les réactions) à température ambiante. La déprotection des dialdéhydes a été réalisée en amont pendant 12h, et les réactions ont été analysées après 4h d'agitation à température ambiante. La compilation des spectres pour les trois couples de monomères est présentée sur la Figure 115.

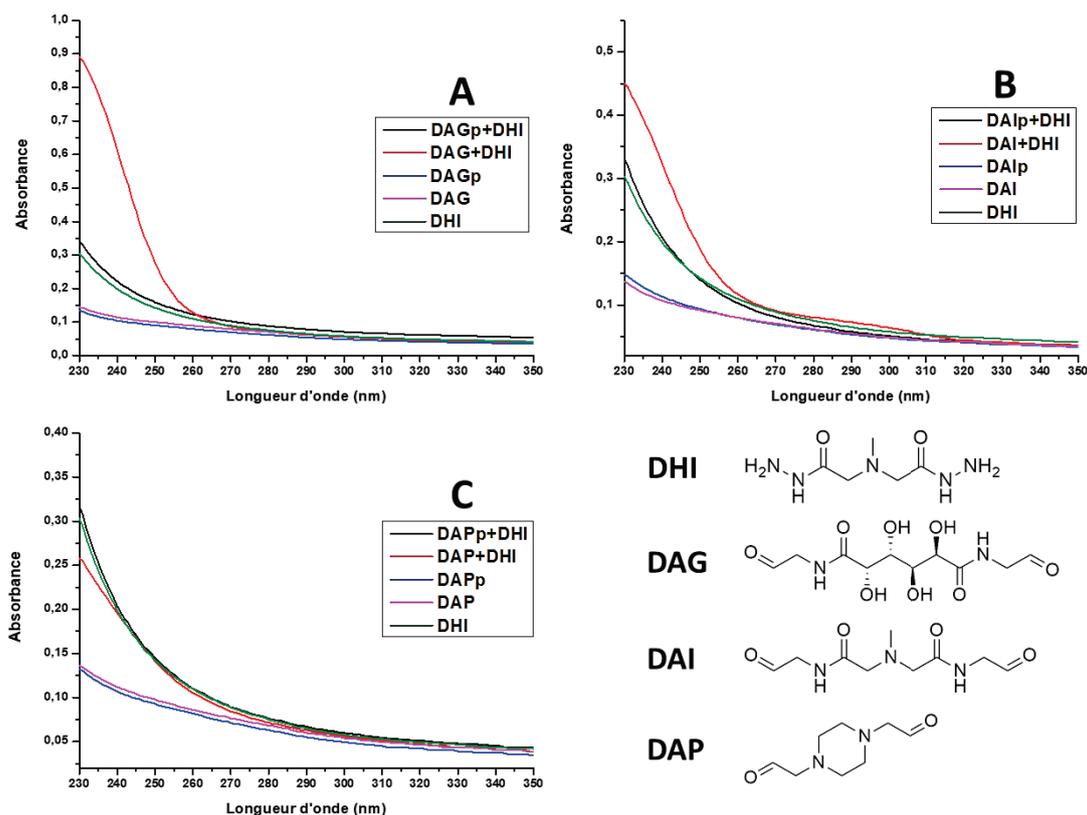


Figure 115 - Superposition de spectres UV réalisés pour des solutions (2 mM/monomère) de dialdéhyde protégé, de dialdéhyde déprotégé (1 v% HCl pendant 12h), de dihydrazide, de la réaction dialdéhyde protégé-dihydrazide (pendant 4h, sans ajout d'acide), et de la réaction dialdéhyde déprotégé-dihydrazide (pendant 4h, catalysé par l'acide de la déprotection). **(A)** Combinaisons de DHI et de DAG, **(B)** Combinaisons de DHI et de DAI, **(C)** Combinaisons de DHI et de DAP. Par abus de langage, les solutions de dialdéhyde ayant été déprotégées sont appelées par le nom du dialdéhyde, même si elles contiennent aussi d'autres espèces conséquentes à la déprotection.

Cette figure montre l'augmentation de l'absorbance vers 230 nm lorsque le dihydrazide DHI est mis en contact avec la solution de dialdéhyde déprotégé (partiellement) de DAG ou de DAI (courbes rouges en Figure 115A et B). Cette augmentation pourrait être corrélée à la formation de fonctions acylhydrazone, comme observé et discuté dans le Chapitre II.

En revanche, pour le couple DHI/DAP (Figure 115C), il n'existe pas d'augmentation d'absorbance ce qui semblerait indiquer que la polymérisation n'a pas lieu entre ces deux monomères. Une explication possible, et cohérente avec l'étude précédente des monomères, serait que la déprotection du DAPp est moins efficace dans ces conditions, empêchant ainsi le déroulement de la réaction avec le dihydrazide DHI. Quant à la diminution d'absorbance de la solution de réaction entre le DAP et le DHI par rapport à celle du DHI à pH neutre, elle pourrait s'interpréter par l'hydrolyse du DHI couplée à une faible polymérisation, une fonction acide carboxylique absorbant moins qu'une fonction hydrazide, comme montré par Mashima et Ikeda,²¹⁶.

b. Par SEC

Les réactions entre le DHI et un dialdéhyde (DAI ou DAG) ont ensuite été analysées par SEC. Dans un premier temps, la Chaîne A et la colonne TSKGel Oligo seule ont été utilisées. Les chromatogrammes comparant les solutions de monomères à celle de la réaction (après 9 ou 10 jours) sont présentés en Figure 116, pour deux éluants différents (eau MilliQ en Figure 116 A et B, ou eau + NaCl 0,2 M en Figure 116 C et D) et avec des conditions réactionnelles identiques (T_{amb} , 5 mM/monomères dans l'eau, 0,5 v% de HCl provenant de la solution de dialdéhyde déprotégée pendant 12h).

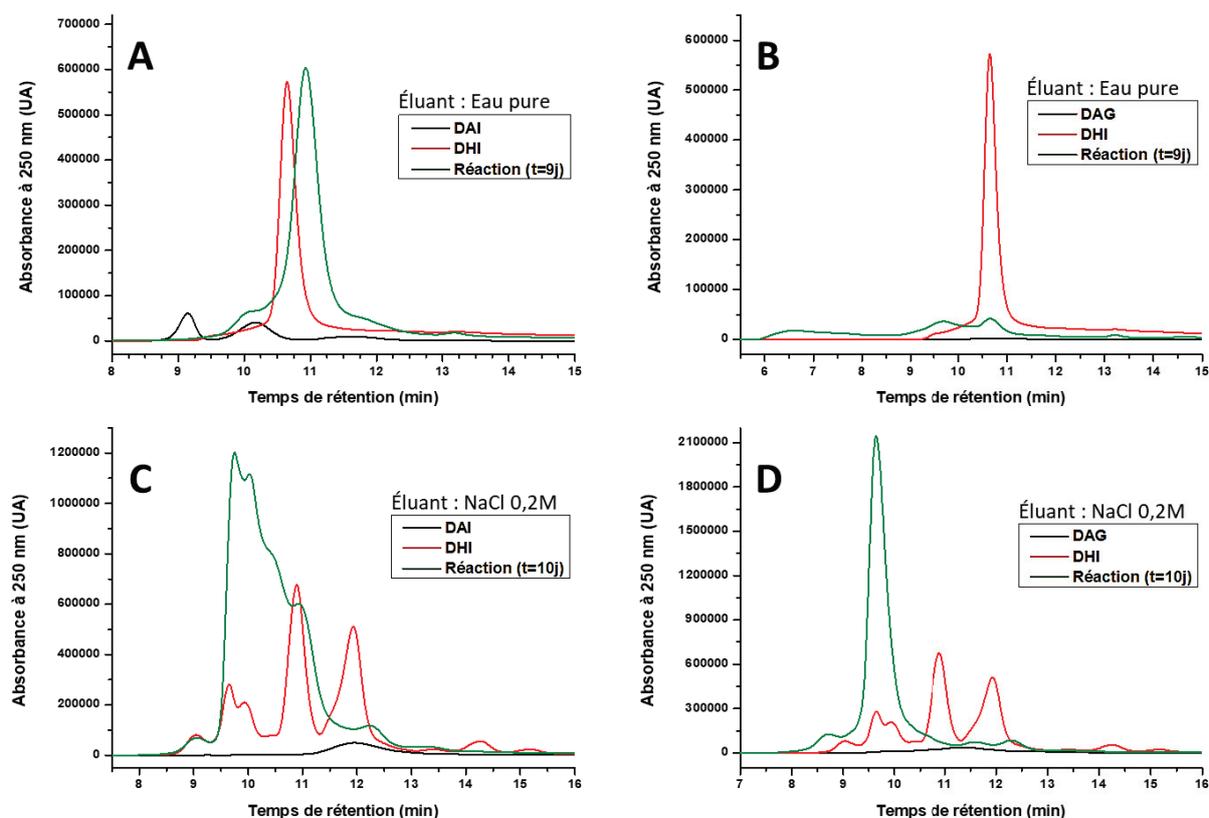


Figure 116 - Chromatogrammes réalisés sur la colonne TSKGel Oligo avec la Chaîne A, avec une détection UV à 250 nm et un éluant composé d'eau ou d'eau + NaCl 0,2M. Les solutions de monomères sont à 10 mM (le dialdéhyde a été déprotégé par 1 v% HCl pendant 12h), et les réactions sont à 5 mM/monomères (0,5 v% HCl). **(A)** Réaction DHI/DAI dans l'eau, **(B)** Réaction DHI/DAG dans l'eau, **(C)** Réaction DHI/DAI dans une solution de NaCl 0,2 M, **(D)** Réaction DHI/DAG dans une solution de NaCl 0,2 M.

Cette figure montre que l'ajout de sel (NaCl 0,2 M) dans l'éluant (Figure 116 A et B versus C et D) provoque l'apparition de plusieurs pics pour le DHI. Ces pics pourraient correspondre à des dérivés secondaires identifiés précédemment (*i.e.* dérivés hydrolysés, et/ou intermédiaires cycliques et dimérisés), laissant supposer de fortes interactions enthalpiques de ceux-ci avec la phase stationnaire.

Concernant les chromatogrammes des réactions, les différences d'aires, selon l'éluant utilisé, sont considérables (*i.e* augmentation forte de l'aire avec l'éluant eau + NaCl), indiquant une possible rétention électrostatique du polymère sur la phase stationnaire quand l'éluant est seulement constitué d'eau pure. Ensuite, si on examine les temps de rétention des espèces, les différences entre les solutions de monomère et celles de réaction sont assez faibles. Il est donc ainsi difficile de mettre en évidence une polymérisation à partir de ces chromatogrammes.

En Figure 117, les chromatogrammes des échantillons, acquis avec une détection RI, permettent de mettre en évidence le temps d'élution du front d'élution pour des Colonnes SEC 1 (TSKGel PWG6000 + PWG2500 + Oligo) et des Colonnes SEC 2 (PL-Aquagel OH-Mixed-M + OH-Mixed-H). Elle met ainsi aussi en évidence que la majorité des pics est éluée après le front d'élution pour les Colonnes SEC 1 (Figure 117B), et avant ce front pour les Colonnes SEC 2 (Figure 117C). Par conséquent, afin de déterminer les masses molaires moyennes des polymères, seul ce dernier jeu de colonnes (Colonnes SEC 2) a été étalonné avec des standards de pullulane de différentes masses molaires (Figure 117A), et les masses semblent ainsi être très faibles.

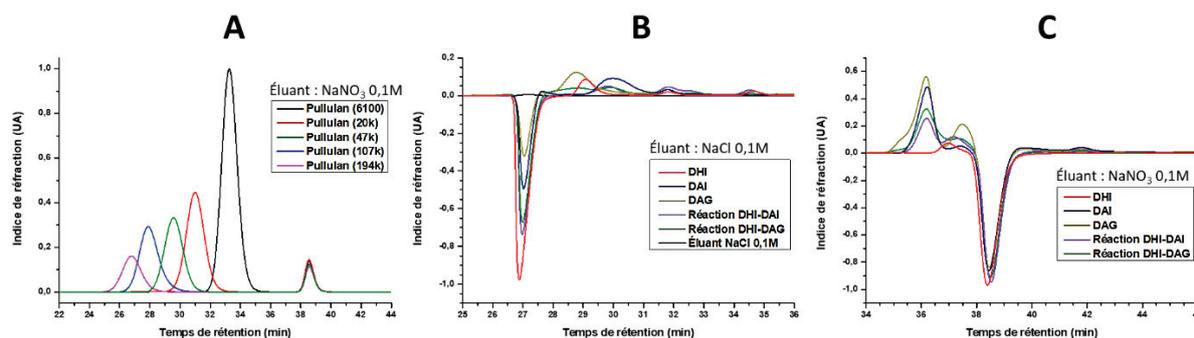


Figure 117 - Comparaison des chromatogrammes (détection RI) de la calibration des Colonnes SEC 2 (A), et de ceux des échantillons sur les Colonnes SEC 1 (B) et les Colonnes SEC 2 (C). Les solutions de monomères sont à 10 mM (le dialdéhyde a été déprotégé par 1 v% HCl pendant 12h), et les réactions sont à 5 mM/monomères (contenant 0,5 v% HCl). Les analyses ont été conduites sur la Chaîne A.

En Figure 118, les chromatogrammes obtenus avec les Colonnes SEC 2 couplées, cette fois-ci, à une détection UV à 250 nm, sont présentés. Le sel ajouté dans l'éluant n'est plus NaCl mais NaNO_3 (0,1M) pour éventuellement observer un effet positif sur la séparation. Malheureusement, les pics obtenus avec la solution de la réaction sont élués en même temps que les solutions de monomères. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les polymères formés n'atteignent pas une masse molaire significativement différente de celle des monomères, correspondant ainsi à des oligomères de faible masse molaire ou à des macrocycles, et/ou qu'il existe des interactions fortes de ces espèces avec la

phase stationnaire des colonnes (*i.e.* la séparation ne s'effectuerait pas par SEC selon le volume hydrodynamique des espèces, mais plutôt selon leur affinité avec le gel poreux de la colonne).

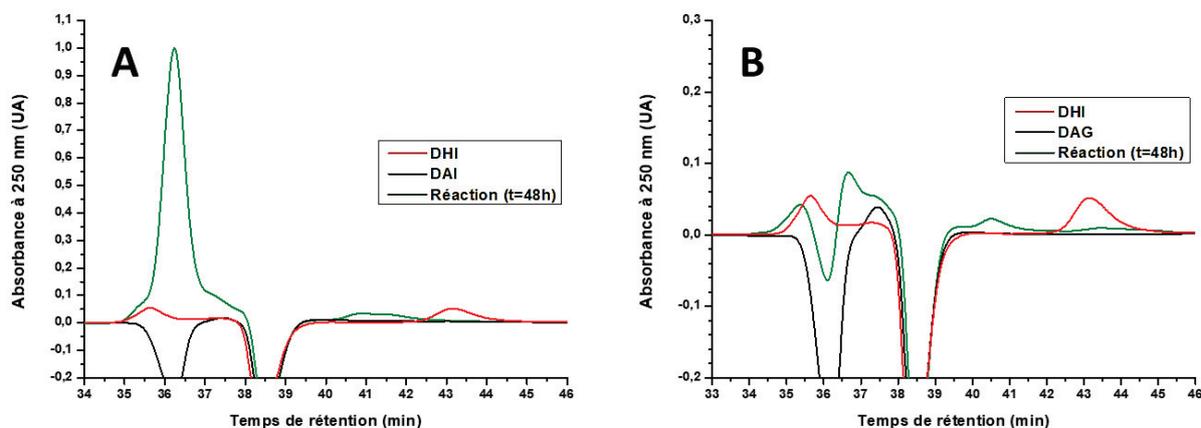


Figure 118 - Chromatogrammes obtenus à partir des Colonnes SEC 2 (PL-Aquagel OH-Mixed-M + OH-Mixed-H) avec la Chaîne A, détection UV à 250 nm, avec un éluant eau+NaNO₃ 0,1 M. Les solutions de monomères sont à 10 mM (le dialdéhyde a été déprotégé par 1 v% HCl pendant 12h), et les réactions sont à 5 mM/monomères (contenant 0,5 v% HCl). **(A)** Réaction DHI-DAI. **(B)** Réaction DHI/DAG.

La littérature faisant mention d'une augmentation de DP avec la concentration initiale en monomères,¹⁶³ l'impact de cette concentration a aussi été évaluée par SEC en comparant des mélanges de monomères contenant 5 et 50 mM/monomères. Malheureusement, le temps d'élution des espèces a été trouvé le même (chromatogrammes non donnés), indiquant i) soit que la masse des oligomères n'a potentiellement pas été augmentée, contrairement à ce qu'indique la littérature,¹⁶³ ii) soit que les interactions solutés/phase stationnaire sont prépondérantes, et donc que l'analyse par SEC ne peut pas être réalisée dans ces conditions d'analyse.

c. Par spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'analyse des réactions entre le DHI et le DAP, DAG, ou DAI, été réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF dans deux solvants : l'eau (à pH acide issu de la déprotection des dialdéhydes), et le DMSO.

i. Réactions réalisées dans l'eau

Les réactions ont été réalisées dans l'eau pour seulement un couple de monomères, le DHI/DAP (à 5 mM par monomère). Pour cela, la solution de dialdéhyde protégé a été laissé

pendant 12h à pH = 1 pour sa déprotection, conformément à ce qui a été étudié dans la partie précédente. Les réactions ont été analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF extemporanément (« t = 0 ») et à t = 2h30, pour comparaison.

Les spectres de masse obtenus (Figure 119) et le tableau d'attribution associé (Tableau 9) révèlent les oligomères DHI-DAPp protégés dès t=0, et DAPp-DHI-DAPp après 2h30. Ainsi, d'après ces spectres de masse, seuls des oligomères de très faible DP sont formés, pouvant s'interpréter par la faible déprotection du DAPp dans les conditions utilisées. Les rares fonctions aldéhyde déprotégées seraient donc consommées immédiatement par les fonctions hydrazide, menant à des oligomères de très faible masse molaire. Cela peut expliquer la raison pour laquelle seuls les monomères DAPp (« DAP protégés ») sont détectables sur le spectre de masse, et non les DAP (« DAP non protégés »).

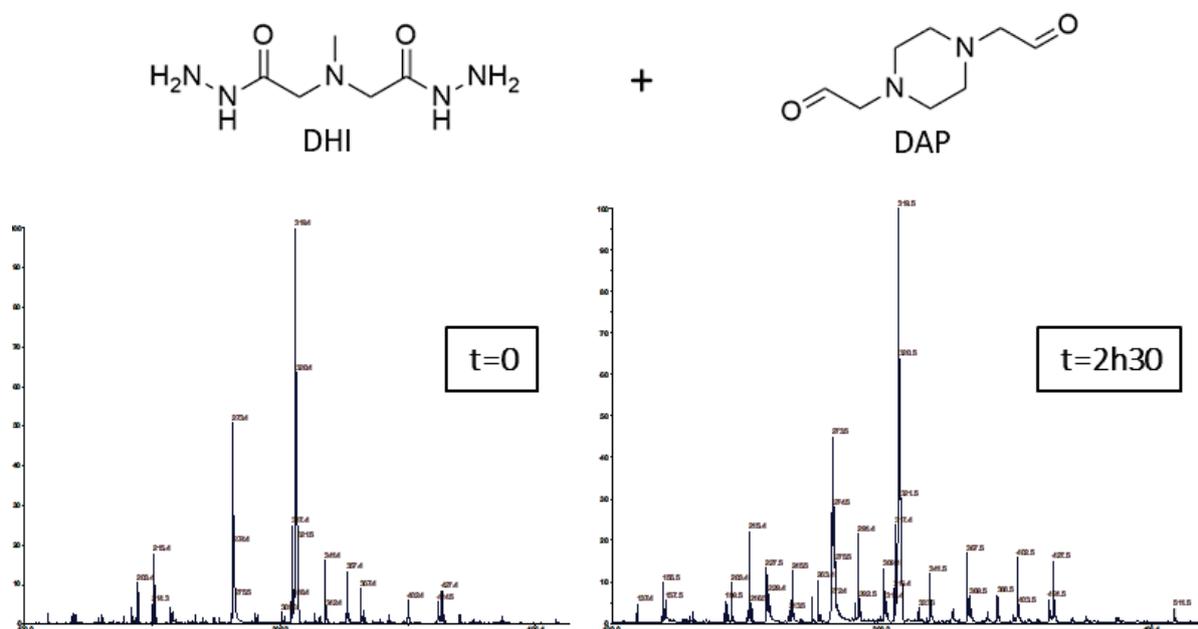


Figure 119 - Comparaison entre les spectres de masse MALDI-TOF positifs (matrice DHB) de la réaction entre le DHI et le DAP à t = 0 et +2h30 (5 mM/monomère, eau MilliQ). L'attribution des pics identifiés est donnée dans le Tableau 9.

Tableau 9 - Attribution des pics des spectres de masse MALDI-TOF de la Figure 119 (avec « dérivé DAP » = espèce non identifiée).

Réaction DHI+DAP (5 mM/monomère)				
Pics (uma)	Présent à t=0	Présent à t=2h30	Attribution	Adduit
137,4		x	DHB	
155,5		x	DHB	
199,5		x	DHB	
203,4	x	x	Non attribué	NA
215,4	x	x	DHB	
227,5		x	Non attribué	NA
229,4		x	Non attribué	NA
245,5		x	Non attribué	NA
263,4		x	Non attribué	NA
291,4		x	Non attribué	NA
309,4		x	Non attribué	NA
319,4	x	x	DAPp	H ⁺
341,4	x	x	DAPp	Na ⁺
357,4	x	x	DAPp	K ⁺
367,4	x	x	Dérivé DAP	H ⁺
388,5		x	Non attribué	NA
402,4	x	x	DP=1 DHI-DAPp	H ⁺
424,5	x	x	DP=1 DHI-DAPp	Na ⁺
427,4	x	x	Non attribué	NA
511,5		x	Non attribué	NA
628,6		x	DP=1 DAPp-DHI-DAPp	H ⁺

La réaction entre les monomères DHI et DAG a également été étudiée (Figure 120, Tableau 10). Les spectres de masse sont quasiment identiques à t = 0 et à t = 2h30. De nombreuses espèces oligomériques y sont détectables, telles que les composés DHI-DAG cycliques et linéaires, ainsi que des composés de masse molaire plus élevée, allant jusqu'à des composés contenant 5 unités de répétition possédant différentes extrémités de chaîne. Les structures détectées sont le DHI-DAG-DHI avec l'hydrazide hydrolysé en extrémité de chaîne ($m/z = 593,1$ uma), mais également les dérivés du DAG dont la structure n'a pas été identifiée, mais qui peuvent se condenser avec un hydrazide ($m/z = 738,2$ uma).

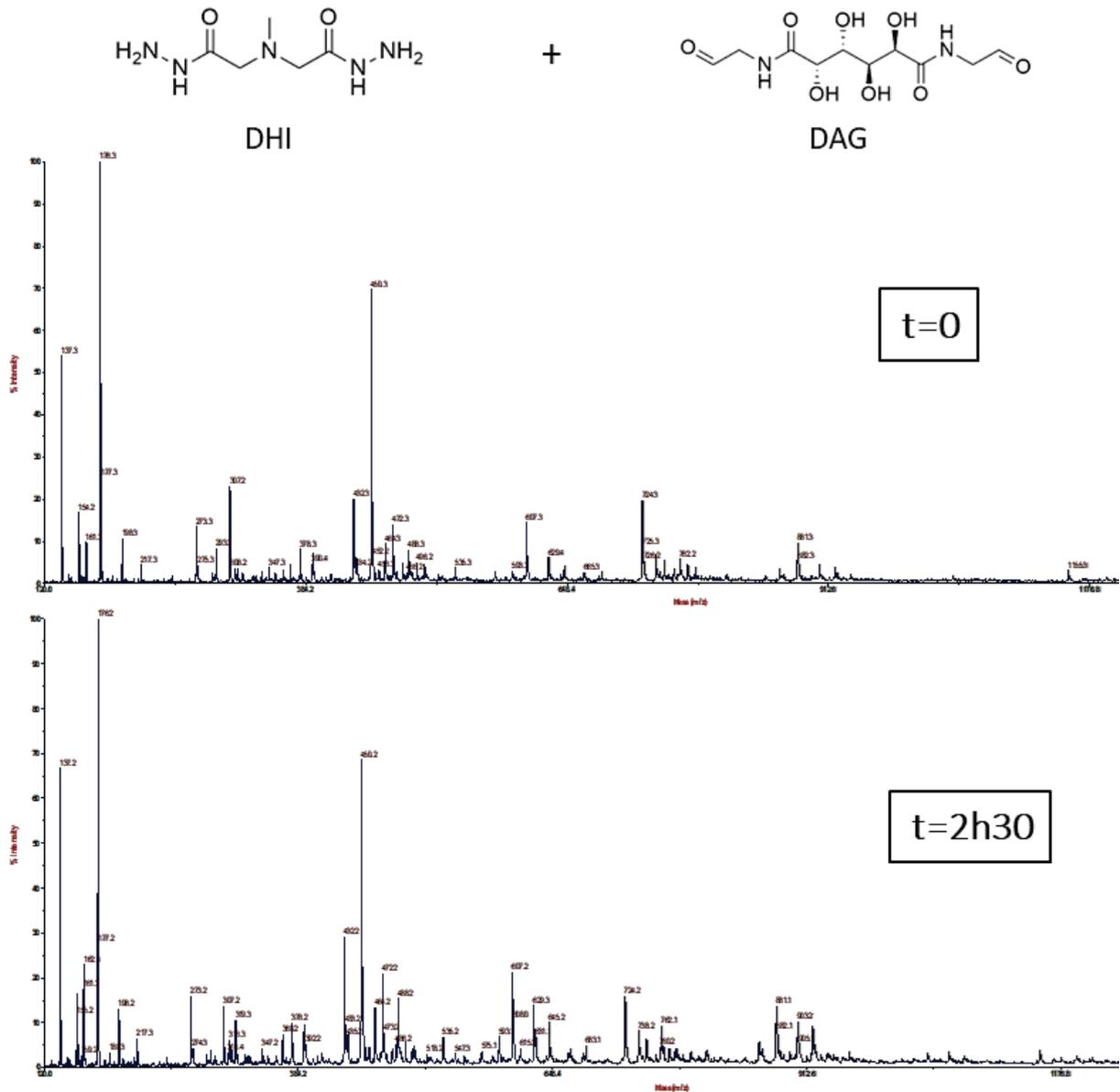


Figure 120 - Comparaison entre les spectres de masse MALDI-TOF positifs (matrice DHB) de la réaction entre le DHI et le DAG à t = 0 et +2h30 (5 mM/monomère, eau MilliQ). L'attribution des pics identifiés est donnée dans le Tableau 10.

Tableau 10 - Attribution des pics des spectres de masse MALDI-TOF de la Figure 120

Réaction DHI+DAG (5 mM/monomère)				
Pics (uma)	Présent à t=0	Présent à t=2h30	Attribution	Adduit
176,3	x	x	DHI	H ⁺
198,3	x	x	DHI	Na ⁺
217,3	x	x	Non attribué	NA
293,2	x		DAG	H ⁺
307,2	x	x	Dérivé du DAGp déprotégé	H ⁺
319,3		x	Dimère DHI	H ⁺
368,2		x	Dérivé inconnu du DHI	NA
378,3	x	x	Non attribué	NA
432,3	x	x	DP=1 cycle	H ⁺
450,3	x	x	DP=1 linéaire	H ⁺
464,3	x	x	DP=1 Dérivé DAG+DHI	H ⁺
472,3	x	x	DP=1 linéaire	Na ⁺
488,3	x	x	DP=1 linéaire	K ⁺
535,3	x	x	Non attribué	NA
593,1		x	DP=1 DHI-DAG-DHI hydrolysé	H ⁺
607,3	x	x	DP=1 DHI-DAG-DHI	H ⁺
629,4	x	x	DP=1 DHI-DAG-DHI	Na ⁺
645,2		x	DP=1 DHI-DAG-DHI	K ⁺
683,1		x	Non attribué	NA
724,3	x	x	DP=1 DAG-DHI-DAG	H ⁺
738,2		x	DP=1 DAG-DHI-Dérivé DAG	H ⁺
762,2	x	x	DP=1 DAG-DHI-DAG	K ⁺
881,3	x	x	DP=2 linéaire	H ⁺
903,2		x	DP=2 linéaire	Na ⁺
1155,3	x	x	DP=2 DAG-DHI-DAG-DHI-DAG	H ⁺

De la même façon qu'avec les deux premiers couples (DHI/DAP et DHI/DAG), la réaction entre les monomères DHI et DAI a été étudiée par spectrométrie de masse MALDI-TOF en Figure 121. Les attributions associées sont données en Tableau 11. Pareillement au couple DHI/DAG, les espèces détectées sont les mêmes à t = 0 et t = 2h30, à l'exception de celles de valeurs de m/z supérieures à 800 uma, qui ne sont plus présentes à t = 2h30. Ceci pourrait être dû à des biais inhérents à la technique de spectrométrie, à un réarrangement des oligomères en des configurations plus stables thermodynamiquement (celles qui seraient détectées), ou encore à la formation d'espèces de DP trop élevé pour être détectées en spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Notons que les combinaisons d'oligomères détectables sont ici quasiment les mêmes qu'avec le couple DHI/DAG, à savoir des espèces jusqu'à un DP de 2, avec différentes combinaisons d'extrémités de chaîne. Il est également intéressant de remarquer que les fonctions aldéhyde, lorsqu'elles sont en extrémité de chaîne, sont protégées ou déprotégées, pouvant indiquer que la vitesse de déprotection et celle de conversion en fonction acylhydrazone sont d'un ordre de grandeur similaire.

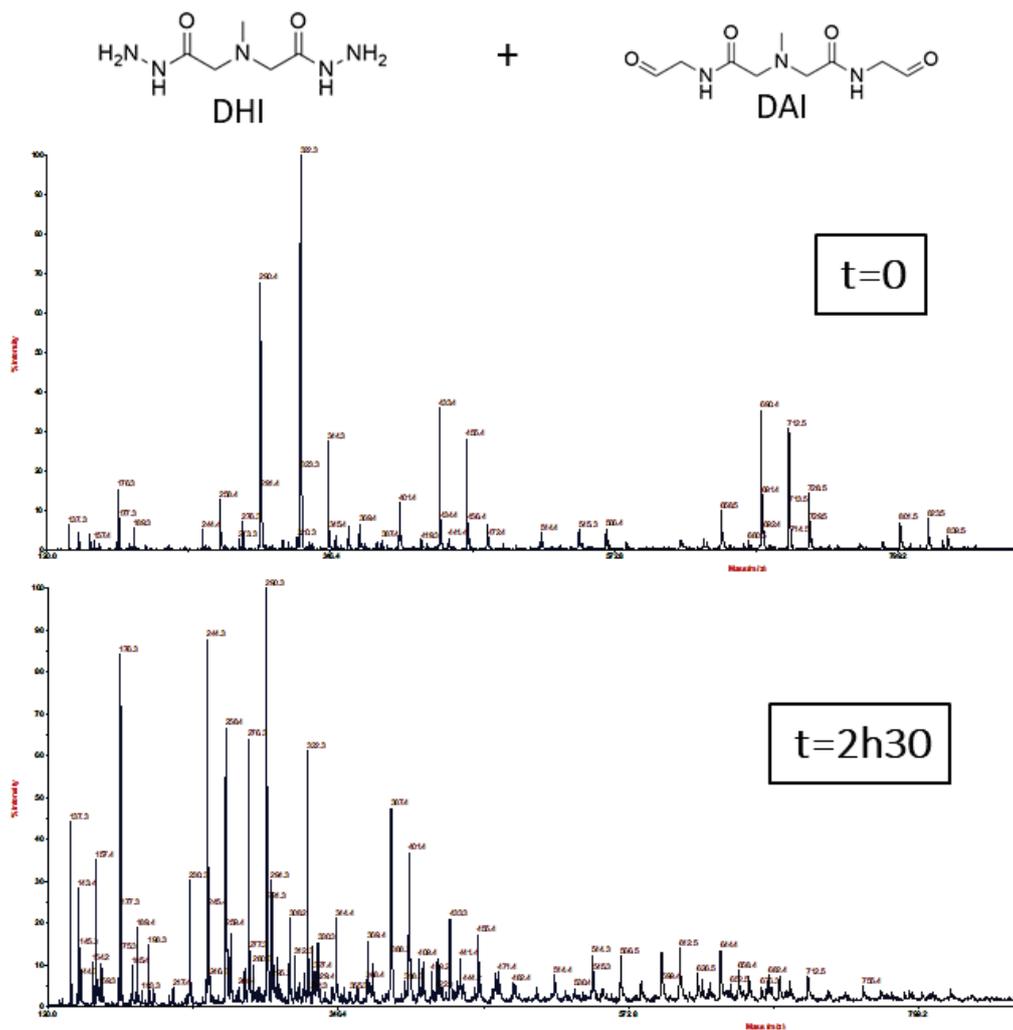


Figure 121 - Comparaison entre les spectres de masse MALDI-TOF positifs (matrice DHB) de la réaction entre le DHI et le DAI à t = 0 et +2h30 (5 mM/monomère, eau MilliQ). L'attribution des pics identifiés est donnée dans le Tableau 11.

Tableau 11 - Attribution des pics des spectres de masse de la Figure 121.

Réaction DHI+DAI (5 mM/monomère)					Réaction DHI+DAI (5 mM/monomère)				
Pics (uma)	Présent à t=0	Présent à t=2h30	Attribution	Adduit	Pics (uma)	Présent à t=0	Présent à t=2h30	Attribution	Adduit
176,3	x	x	DHI	H ⁺	444,4	x	x	Non attribué	NA
189,3	x	x	Non attribué	NA	455,4	x	x	DP=1 linéaire protégé	Na ⁺
198,3		x	Non attribué	NA	472,4	x		Non attribué	NA
230,3		x	Non attribué	NA	482,4		x	Non attribué	NA
244,4	x	x	Dérivé DAIp déprotégé	H ⁺	514,4	x	x	PDAI	H ⁺
258,4	x	x	Non attribué	NA	544,3	x	x	DP=1 DHI-DAI-DHI	H ⁺
273,3	x	x	DHB		566,4	x	x	DP=1 DHI-DAI-DHI	Na ⁺
276,3	x	x	DAIp1/2	H ⁺	597,4		x	DP=1 DAI-DHI-DAI	H ⁺
290,4	x	x	Dérivé DAIp	H ⁺	612,5		x	Non attribué	NA
308,2		x	Non attribué	NA	626,5		x	Non attribué	NA
322,3	x	x	DAIp	H ⁺	658,5	x	x	DP=1 DAI-DHI-Dérivé DAI	H ⁺
330,3		x	Non attribué	NA	690,4	x	traces	DP=1 DAI-DHI-DAIp	H ⁺
344,3	x	x	DAIp	Na ⁺	712,5	x	x	DP=1 DAI-DHI-DAIp	Na ⁺
369,4	x	x	DP=1 cycle	H ⁺	728,5	x		DP=1 DAI-DHI-DAIp	K ⁺
387,4	x	x	DP=1 linéaire	H ⁺	755,4		x	Non attribué	NA
401,4	x	x	DP=1 Dérivé DAI-DHI	H ⁺	801,5	x		DP=2 linéaire protégé	H ⁺
409,4		x	Non attribué	NA	823,5	x		DP=2 linéaire protégé	Na ⁺
419,3	x	x	Non attribué	NA	839,5	x		DP=2 linéaire protégé	K ⁺
433,4	x	x	DP=1 linéaire protégé	H ⁺	1058,5	x		DP=2 DAIp-DHI-DAI-DAIp	H ⁺
441,4		x	Non attribué	NA					

ii. Réactions réalisées dans le DMSO

Les réactions ont également été réalisées dans le DMSO (5 mM/monomère), à l'instar de ce qui avait été effectué pour les réactions à partir des monomères « modèles ». La Figure 122 présente le spectre de masse obtenu après 2h30 de réaction pour le couple DHI/DAI. D'une manière analogue à ce qui a été observé dans l'eau, des oligomères de très faible DP sont observés. En revanche, leur DP maximal détectable est plus faible que celui observé dans l'eau.

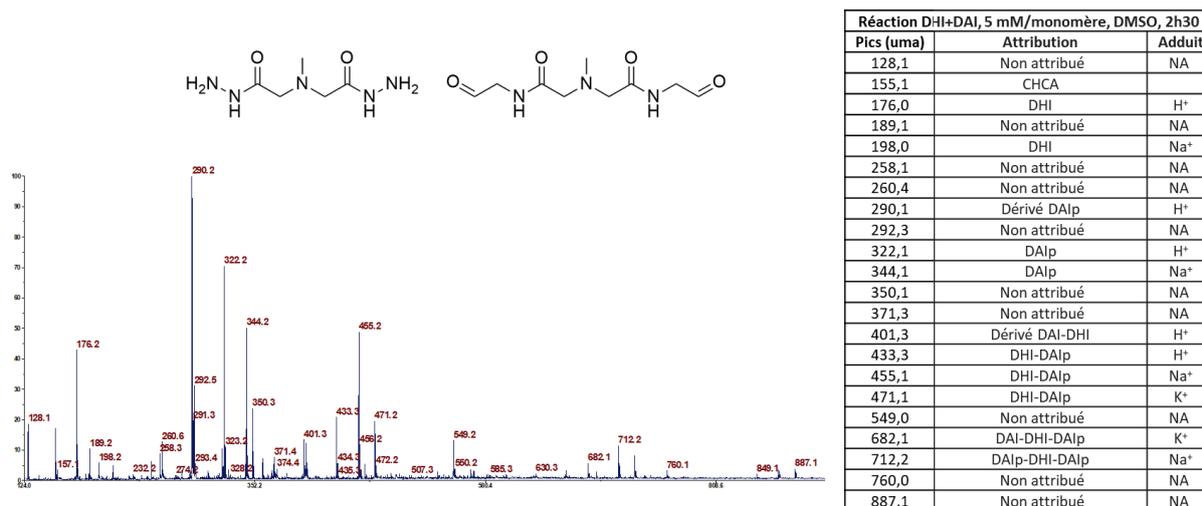


Figure 122 - Spectre de masse MALDI-TOF positif (matrice CHCA) de la réaction entre le DHI et le DAI (5 mM/monomère, DMSO). L'attribution des pics identifiés est donnée dans le tableau, à droite.

Similairement, la Figure 123 (attributions en Tableau 12) montre le spectre de masse de la réaction entre le DHI et le DAG après 2h30 de réaction dans le DMSO. Les espèces détectées dans l'eau sont aussi observées ici, à savoir des oligomères linéaires ou cycliques de faible DP, jusqu'à des composés contenant 7 unités de répétition.

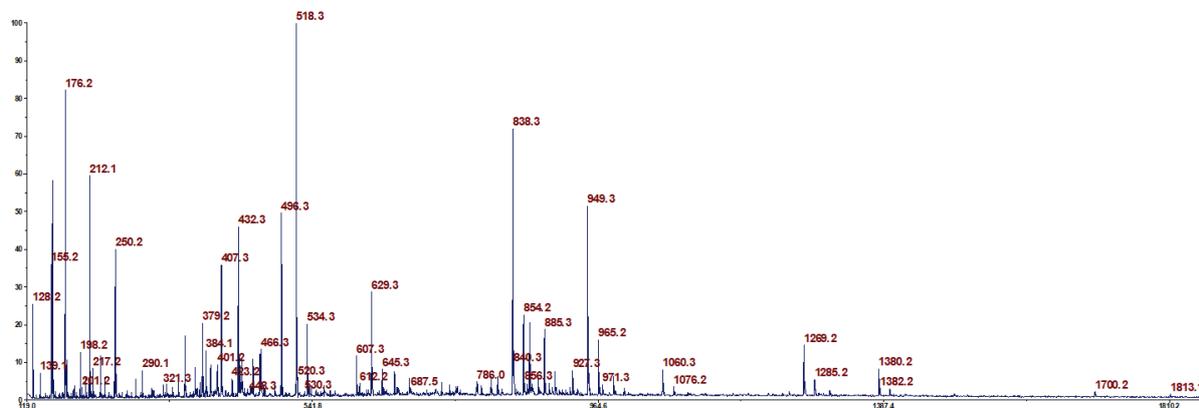
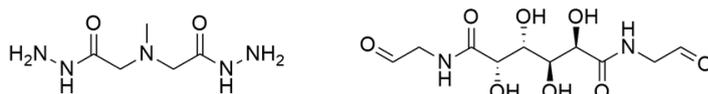


Figure 123 - Spectre de masse MALDI-TOF positif (matrice CHCA) de la réaction entre le DHI et le DAG (5 mM/monomère, DMSO). L'attribution des pics identifiés est donnée dans le Tableau 12.

Tableau 12 - Attribution des pics des spectres de masse de la Figure 123.

Réaction DHI+DAG, 5 mM/monomère, DMSO, 2h30		
Pics (uma)	Attribution	Adduit
128,1	Non attribué	NA
139,1	Non attribué	NA
155,1	CHCA	
176,0	DHI	H ⁺
198,0	DHI	Na ⁺
212,0	Non attribué	NA
250,0	Non attribué	NA
290,1	Non attribué	NA
379,0	Non attribué	NA
384,1	Non attribué	NA
407,2	DAGp	Na ⁺
432,2	DP=1 cycle	H ⁺
466,3	Non attribué	NA
496,2	DP=1 DHI-DAGp	H ⁺
518,2	DP=1 DHI-DAGp	Na ⁺
534,3	DP=1 DHI-DAGp	K ⁺
607,2	DP=1 DHI-DAG-DHI	H ⁺
629,2	DP=1 DHI-DAG-DHI	Na ⁺
645,2	DP=1 DHI-DAG-DHI	K ⁺
786,0	DP=1 PDAG-DHI-DAGp	H ⁺
838,3	DP=1 DAGp-DHI-DAGp	Na ⁺
854,2	DP=1 DAG-DHI-DAGp	K ⁺
885,3	DP=2 cycle	Na ⁺
927,3	DP=2 DHI-DAG-DHI-DAGp	H ⁺
949,0	DP=2 DHI-DAG-DHI-DAGp	Na ⁺
965,2	DP=2 DHI-DAG-DHI-DAGp	K ⁺
1060,3	DP=2 DHI-DAG-DHI-DAG-DHI	Na ⁺
1076,2	Non attribué	NA
1269,2	DAGp-DHI-DAG-DHI-DAGp	Na ⁺
1285,2	DAGp-DHI-DAG-DHI-DAGp	K ⁺
1380,2	DHI-DAG-DHI-DAG-DHI-DAGp	Na ⁺
1700,2	DAGp-DHI-DAG-DHI-DAG-DHI-DAGp	Na ⁺
1813,1	Non attribué	NA

En conclusion de ces analyses en spectrométrie de masse MALDI-TOF, les oligomères formés sont similaires à ceux observés avec les monomères « modèles », à savoir des oligomères (cycliques

ou linéaires) de très faible degré de polymérisation, constitués d'une grande diversité d'extrémités de chaîne. Cette diversité peut s'expliquer par une déprotection incomplète des dialdéhydes et/ou des réactions secondaires des monomères pouvant conduire à des fonctions réactives. Complémentairement, les réactions des couples DHI/DAI et DHI/DAG ont été analysées en LC-MS (Annexe 3) sans étude cinétique cette fois-ci, et il a été montré que certains pics correspondent à des oligomères (DP=1, DP=2, espèces cycliques).

d. Par RMN

La polymérisation a également été étudiée par RMN, avec les mêmes objectifs que ceux des analyses en RMN réalisées avec les polymères « modèles » : déterminer les taux de conversion des fonctions réactives mises en jeu, ainsi que le calcul d'un DP.

La réaction a d'abord été étudiée dans le D₂O, en déprotégeant les dialdéhydes à l'aide de 0,5 v% HCl pendant 12h, puis en mélangeant stœchiométriquement cette solution à une solution de DHI (concentration finale de 5 mM/monomère). La solution a ensuite été analysée à différents temps de réaction. La Figure 124 compile les spectres obtenus. Il est alors évident que la déprotection des terminaisons acétal des dialdéhydes n'est ici pas complète. Cependant, les signaux observés entre 7,5 et 9,0 ppm peuvent être caractéristiques de la formation de fonctions CHN, signe de la formation de fonctions acylhydrazone, d'après la littérature et les polymérisations réalisées avec les monomères « modèles » (cf Chapitre II). Or, un triplet est observé à 7,55 ppm ici, pouvant ainsi correspondre à ce signal attendu. Il y a ainsi probablement eu condensation de fonctions réactives en très faible proportion, donnant un taux de conversion en acylhydrazone inférieur à 4% (le taux de conversion étant défini comme l'intégrale de ce pic divisé par la somme des intégrales de ce pic et de celui du triplet caractéristique du proton de l'aldéhyde protégé). La faible conversion peut ainsi être expliquée par une déprotection lente et cinétiquement déterminante, qui libère ainsi peu de fonctions aldéhydes réactives.

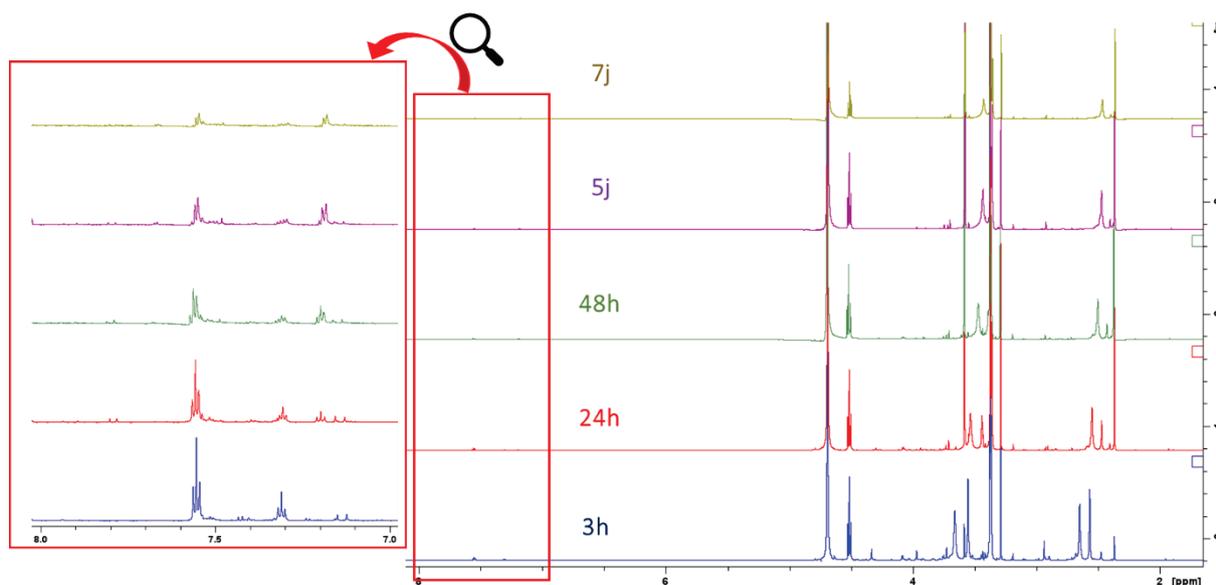


Figure 124 - Spectres RMN ^1H du milieu réactionnel entre le DHI et le DAI (D_2O , 5 mM/monomères, 0,5 v% de HCl dans la solution de dialdéhyde), à différents temps de réaction (3h, 24h, 48h, 5j, 7j). L'agrandissement correspond à la zone d'intérêt présentant les signaux caractéristiques de fonctions acylhydrazone.

Pour aller plus loin, la réaction a été réalisée et analysée dans les mêmes conditions, mais en utilisant du DMSO-d_6 à la place du D_2O , et en augmentant la concentration à 25 mM/monomère (Figure 125), tout en déprotégeant le dialdéhyde au préalable dans la solution de DMSO. La conclusion est la même : les spectres n'évoluent peu ou pas dans le temps.

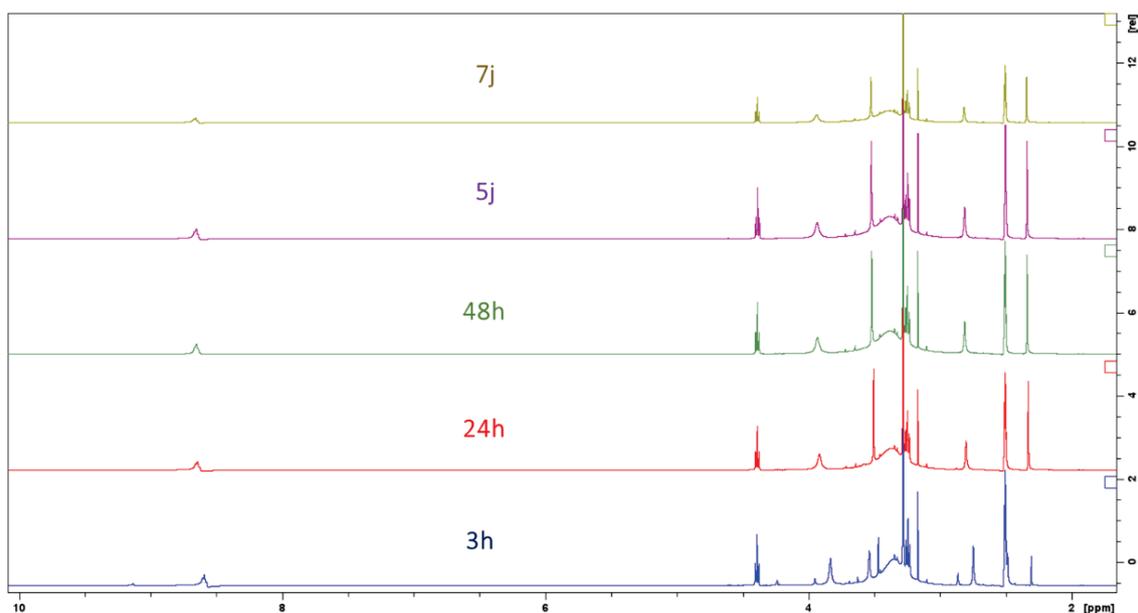


Figure 125 - Spectres RMN ^1H du milieu réactionnel entre le DHI et le DAI à 3h de réaction (DMSO , 25 mM/monomères, 0,5 v% de HCl dans la solution de dialdéhyde), à différents temps de réaction (3h, 24h, 48h, 5j, 7j).

D'une manière intéressante, l'intégrale du pic à 8,7 ppm est égale à celle du triplet à 4,4 ppm (correspondant au CH de l'acétal). Il n'est pas possible d'attribuer ce pic avec certitude, d'autant qu'il ne correspond pas à un carbone en utilisant les spectres HSQC et ^{13}C (spectres de faible rapport signal/bruit). La Figure 126 permet de comparer les spectres du DHI, du DAIp déprotégé (abrégié en DAI) et de la réaction entre ces deux monomères après 3h. Ainsi, il semble que le triplet à 8,7 ppm pour le DAI (proton « h » correspondant aux protons NH du DAIp) soit attribué aux mêmes protons pour le spectre de la réaction entre le DHI et le DAI, soit les protons NH du dialdéhyde protégé. En conclusion, il n'est malheureusement pas possible d'observer la polymérisation par RMN pour le couple DHI/DAI.

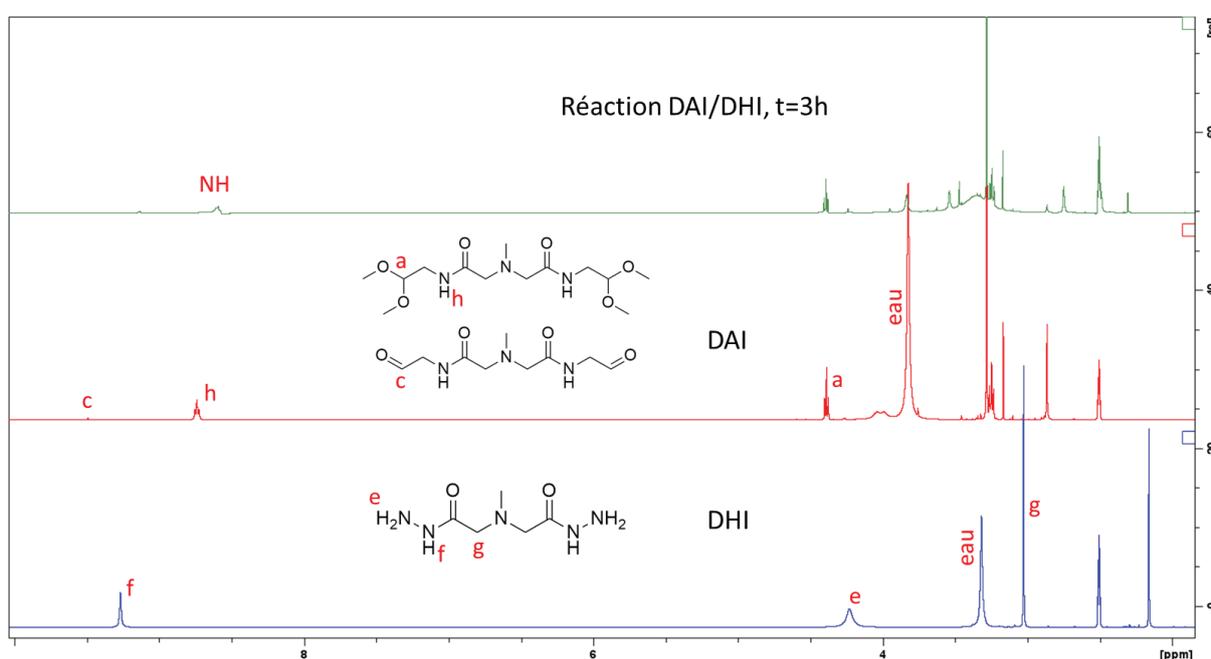


Figure 126 - Comparaison des spectres RMN ^1H (de bas en haut) du monomère DHI, du monomère DAIp déprotégé, et de la réaction entre le DHI et le DAI (DMSO, 25 mM/monomères, 0,5 v% de HCl dans la solution de dialdéhyde)

L'étude du couple DHI/DAG a également été réalisée, dans les mêmes conditions (25 mM/monomère, DMSO- d_6), et les spectres RMN ^1H du suivi cinétique sont présentés en Figure 127. Les conclusions sont, là aussi, identiques, car les intégrales des pics restent inchangées au cours du temps (certains pics ont une variation de déplacement chimique, mais ce phénomène est également observé pour le DAG seul). De plus, le triplet à 7,5 ppm est également attribué aux protons NH.

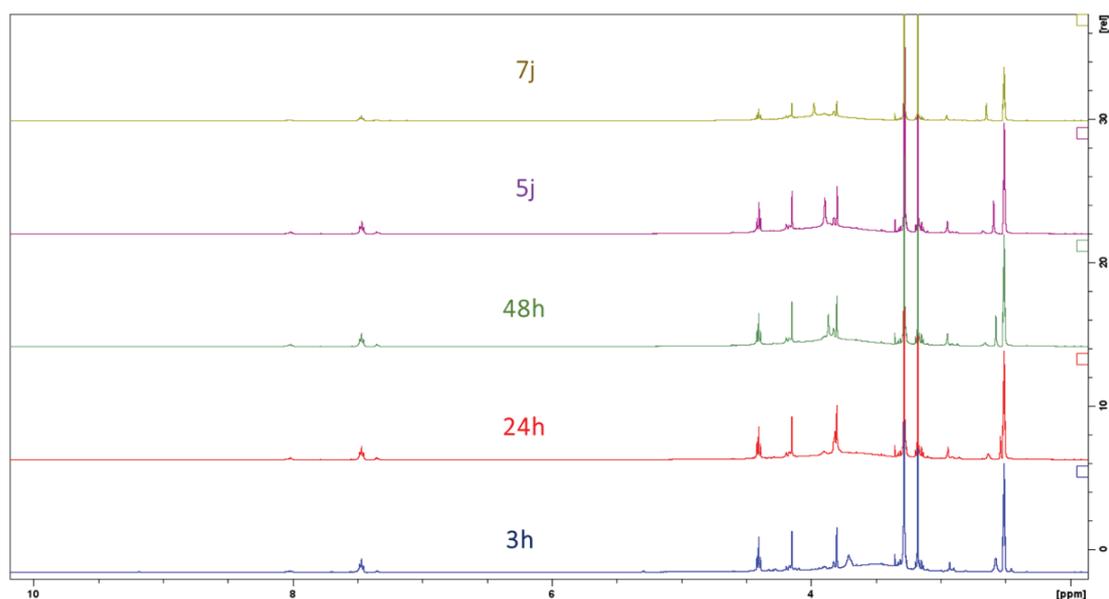


Figure 127 - Spectres RMN ^1H du milieu réactionnel entre le DHI et le DAG (DMSO, 25 mM/monomères, 0,5 v% de HCl dans la solution de dialdéhyde), à différents temps de réaction (3h, 24h, 48h, 5j, 7j).

En conclusion de ces analyses par RMN, il apparaît que la formation de liaisons acylhydrazone n'est pas détectée, ce qui va à l'encontre des conclusions des techniques de caractérisation précédentes qui indiquaient, elles, la présence d'oligomères de polyacylhydrazone. Une hypothèse pour expliquer cela pourrait être la déprotection plus difficile dans le DMSO et les conditions utilisées (il y a seulement 0,5 v% de HCl dans le milieu contre 1 v% pour les autres analyses). Toutefois, la polymérisation est très limitée même dans le D_2O , avec seulement 3,8% de conversion d'acétal en acylhydrazone (en utilisant les intégrales des signaux attribués au CHN et au CH de l'acétal du dialdéhyde). Une stratégie pour approfondir ces analyses en RMN serait de laisser la déprotection s'opérer plus longtemps, afin de faciliter la formation d'acylhydrazone.

2. Influence de différents paramètres sur la formation des polymères

La réaction des monomères « Lehn » étant mise en évidence par certaines techniques de caractérisation, les paragraphes suivants proposent d'étudier les influences du pH et de l'ajout d'un catalyseur sur les oligomères obtenus, ou encore l'aspect dynamique des liaisons acylhydrazone.

a. Influence du pH et de l'ajout d'un catalyseur

Pour analyser l'influence du pH et de l'ajout d'un catalyseur, le choix de la technique s'est porté sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Néanmoins, étant donné que les résultats obtenus ne seront pas quantitatifs, une appréciation qualitative de l'influence du pH sur la polymérisation sera seulement apportée. Les réactions ont été analysées après 24h de réaction dans deux tampons à 0,1 M (phosphate à pH = 7,0 ou acétate à pH = 4,5). Le dialdéhyde a été préalablement déprotégé à pH = 1 pendant 12h, avant d'être dilué dans un de ces deux tampons.

La comparaison des spectres de masse de la réaction entre le DHI et le DAI, ainsi que l'attribution d'une partie des pics détectés, sont données en Figure 128. Ceux-ci ne montrent pas de différence drastique, il n'est ainsi pas possible de conclure sur un quelconque effet du pH sur la réaction, tant sur le plan de la vitesse que du DP maximal.

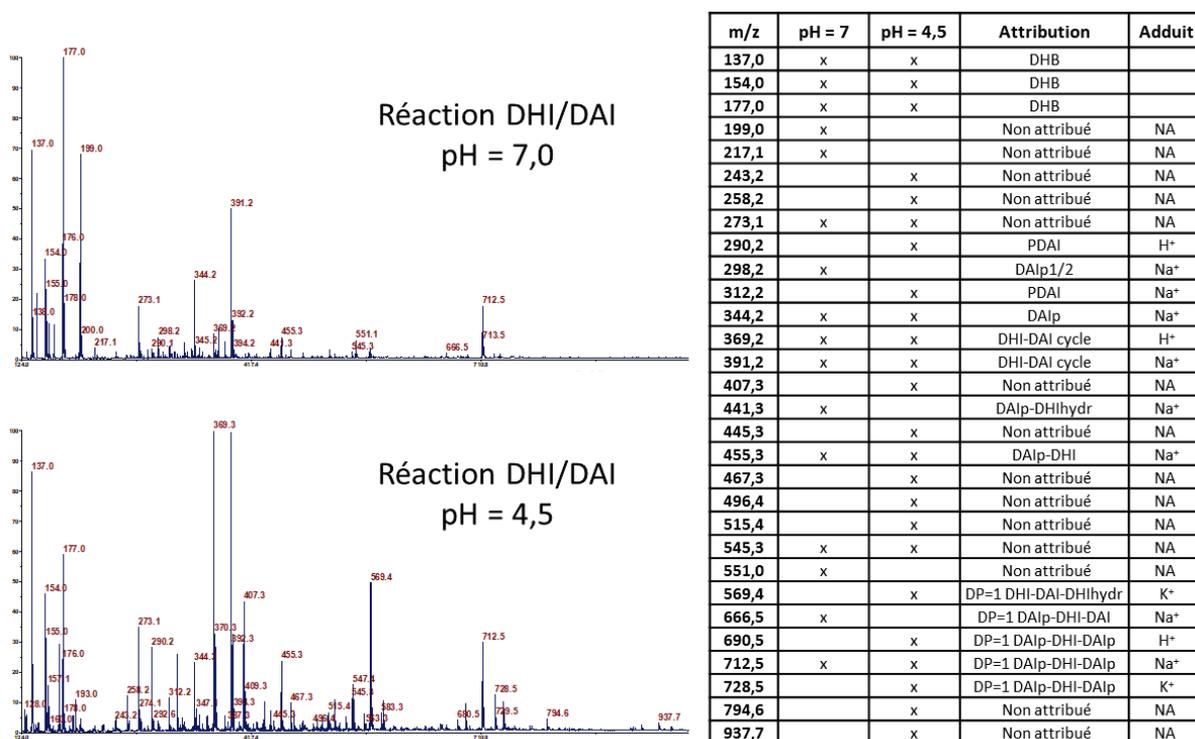


Figure 128 - Spectres de masse MALDI-TOF positifs (matrice DHB) de la réaction entre le DHI et le DAI (tampon 0,1 M phosphate à pH=7 en haut, ou acétate à pH=4,5 en bas, 1 mM/monomère, T_{amb} , $t = 24h$).

L'utilisation de catalyseurs moléculaires a été largement décrite dans la littérature pour catalyser la formation de fonctions acylhydrazone. La plupart des catalyseurs étudiés sont des dérivés de l'aniline, considérée comme peu efficace et trop toxique. Dans ce contexte, un catalyseur potentiellement intéressant pour le projet DynaSWEET a été développé par Blanden *et al.*¹²⁰ qui

proposent d'utiliser la 4-aminophénylalanine (abrévée en 4a-Phe), possédant l'avantage d'être biocompatible (Figure 129).

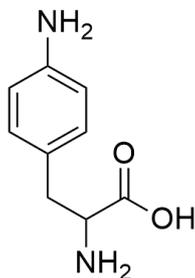
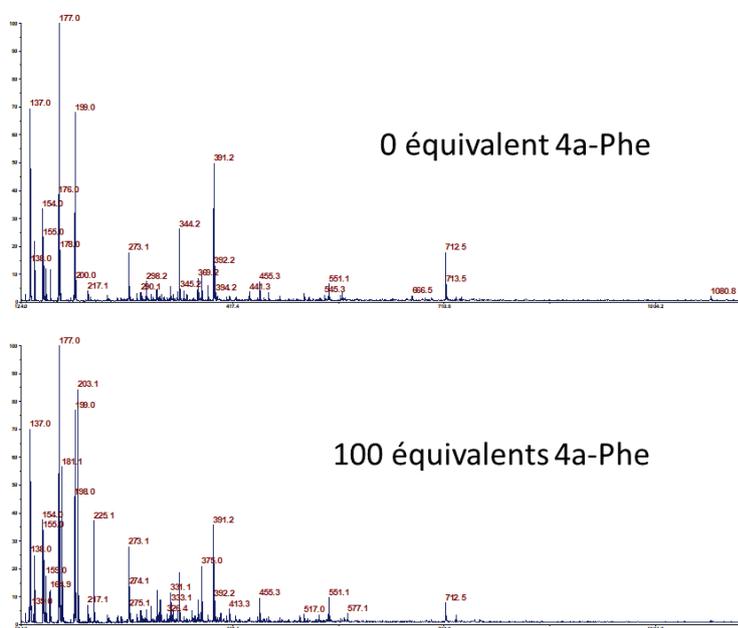


Figure 129 - Structure chimique de la 4-aminophénylalanine (abrévée en 4a-Phe).

Le principal intérêt d'utiliser ce catalyseur est la possibilité d'augmenter la vitesse de la réaction à un pH neutre. Ainsi, son effet sur celle-ci a été analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF, en comparant les spectres de masse de la réaction entre le DHI et le DAI (réalisée dans un tampon phosphate à pH = 7) en y ajoutant plusieurs quantités de 4a-Phe (0, 1, 10 ou 100 équivalents molaires). Cette technique n'étant pas quantitative, l'objectif était plutôt de comparer les oligomères existants en fonction de la proportion de catalyseur. La Figure 130, présentant cette comparaison, montre que l'ajout de 4a-Phe n'a malheureusement pas d'effet détectable.



m/z	Equivalents molaires du 4a-Phe par rapport aux monomères de la réaction DHI-DAI				Attribution	Adduit
	0 eq	1 eq	10 eq	100 eq		
137,0	x	x	x	x	DHB	
142,9		x		x	Non attribué	NA
154,0	x	x	x	x	DHB	
164,9		x		x	Non attribué	NA
177,0	x	x	x	x	DHB	
181,0			x	x	4a Phe	H ⁺
198,0		x	x	x	DHI	Na ⁺
199,0	x	x	x	x	Non attribué	NA
203,0				x	Non attribué	NA
217,1	x	x			Non attribué	NA
225,0			x	x	Non attribué	NA
273,1	x		x	x	Non attribué	NA
298,2	x	x			DAIp1/2	Na ⁺
313,0			x		Non attribué	NA
331,0			x	x	Non attribué	NA
333,1			x	x	Non attribué	NA
344,2	x	x	x		DAIp	Na ⁺
369,2	x				DP=1 cycle	H ⁺
375,0			x	x	Non attribué	NA
391,2	x	x	x	x	DP=1 cycle	Na ⁺
413,3				x	DP=1 DAI-DHIhydr	Na ⁺
441,3	x				DP=1 DAIp-DHIhydr	Na ⁺
445,3					Non attribué	NA
455,3	x	x	x	x	DP=1 DAIp-DHI	Na ⁺
517,0				x	Non attribué	NA
545,3	x				Non attribué	NA
551,0	x	x	x	x	Non attribué	NA
577,1				x	Non attribué	NA
666,5	x		x		DP=1 DAIp-DHI-DAI	Na ⁺
690,5					DP=1 DAIp-DHI-DAIp	H ⁺
712,5	x	x	x	x	DP=1 DAIp-DHI-DAIp	Na ⁺
1090,8			x		Non attribué	NA

Figure 130 - Spectres de masse MALDI-TOF positifs (matrice DHB) de la réaction entre le DHI et le DAI (tampon phosphate 0,1 M à pH=7, 1 mM/monomère, T_{amb} , $t=24h$), catalysé par différentes quantités de 4a-Phe (0, 1, 10 ou 100 équivalents molaires des monomères). Les attributions sont faites pour tous les spectres, mais seuls ceux correspondant à « 0 équivalent » et « 100 équivalents » sont représentés ici.

Cette absence de différence entre les spectres de masse pourrait être imputable (i) à des biais de la spectrométrie de masse MALDI-TOF (qui n'ionise pas de manière identique tous les oligomères présents), (ii) à une relative inefficacité du catalyseur (qui nécessiterait ainsi plus de 100 équivalents molaires pour augmenter de manière significative la vitesse de la réaction), (iii) au fait que les espèces en présence sont dans des puits thermodynamiques, et que l'augmentation de la vitesse de réaction ne changerait pas ainsi les espèces finales.

b. Influence de l'ajout de dialdéhydes supplémentaires

Le principal intérêt des polyacylhydrazones dans le projet est le caractère dynamique de leurs liaisons, et donc la capacité d'échanger des unités de répétition pour s'adapter à un *stimulus* extérieur. Il n'a cependant pas été possible de montrer ce caractère avec les monomères « modèles » dans le Chapitre II, car il n'y avait *in fine* qu'un seul dialdéhyde et qu'un seul dihydrazide permettant une synthèse homogène dans l'eau (et à des concentrations très faibles). Avec cette nouvelle bibliothèque de monomères (dits « Lehn »), il devient ainsi possible de prouver ce caractère dynamique *via* la réaction avec plusieurs dialdéhydes en simultané, ou l'ajout d'un dialdéhyde sur des oligomères déjà formés avec un autre dialdéhyde. Ceci pourrait ainsi permettre de comparer les distributions finales pour voir si l'équilibre atteint est identique dans les deux cas. La seule technique utilisée pour cette caractérisation a été la spectrométrie de masse MALDI-TOF.

La Figure 131 présente les spectres de masse MALDI-TOF correspondant à : (A) l'addition du monomère DAI dans une solution contenant des oligomères de « DHI + DAG » (temps de réaction de 2h30), (B) l'addition du monomère DAG dans une solution contenant des oligomères de « DHI + DAI » (temps de réaction de 2h30), (C) l'addition simultanée du DHI, DAI et DAG. L'attribution des pics (Tableau 13) montre la formation d'espèces mixtes (*i.e.*, contenant au moins une fois chaque monomère) dans la Figure 131A, B, et C. D'une manière intéressante, le DP maximal des oligomères détectables en Figure 131B est de 3, tandis qu'il est de 1 dans la Figure 131A, montrant que la distribution finale n'est pas symétrique selon l'ordre de l'ajout des monomères, dans cette expérience. De nombreux oligomères de DP 1 sont communs aux trois spectres de masse. Il est cependant difficile de conclure sur le caractère isoénergétique des combinaisons de monomères, car la quantification n'est pas possible.

Par ailleurs, une fois formés, les oligomères de faible DP sont toujours réactifs, et peuvent ainsi réagir avec d'autres monomères ajoutés dans la réaction. La détermination de l'agencement (*i.e.* la séquence des unités de répétition) des oligomères n'étant pas possible par spectrométrie de masse, il

ne peut pas être affirmé qu'il y a bien eu un « échange » d'unités de répétition car les dialdéhydes différents auraient pu réagir sur un dihydrazide en terminaison de chaîne. Pour examiner l'aspect dynamique de ces oligomères avec plus de certitude, des analyses quantitatives permettant de comparer les distributions finales à partir de différents ordres d'ajout seraient nécessaires.

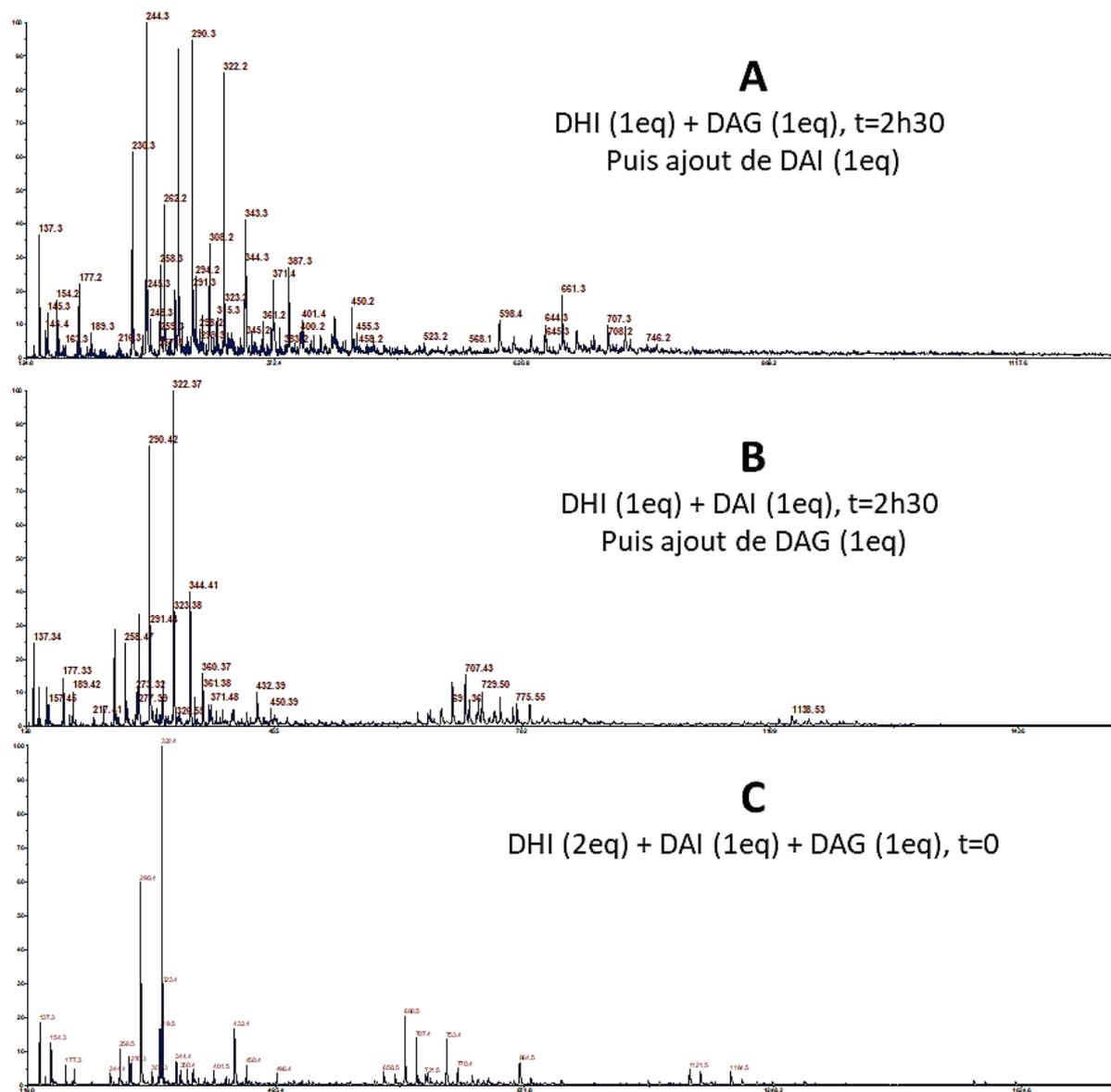


Figure 131 - Spectres de masse MALDI-TOF positifs (matrice DHB) de **(A)** la réaction entre le DHI (5 mM dans l'eau MilliQ, 1eq) et le DAG (1eq, déprotégé avec 1v% HCl pendant 12h) équilibrée pendant 2h30, dans laquelle a été ajouté le DAI (1eq, déprotégé avec 1v% HCl pendant 12h) juste avant analyse. **(B)** la réaction entre le DHI (5 mM dans l'eau MilliQ, 1eq) et le DAI (1eq, déprotégé avec 1v% HCl pendant 12h) équilibrée pendant 2h30, dans laquelle a été ajouté le DAG (1eq, déprotégé avec 1v% HCl pendant 12h) juste avant analyse. **(C)** la réaction entre le DHI (10 mM dans l'eau, 2eq), le DAI (1eq, déprotégé avec 1v% HCl pendant 12h) et le DAG (1eq, déprotégé avec 1v% HCl pendant 12h). L'attribution des pics est donnée dans le Tableau 13.

Tableau 13 - Attribution des pics des spectres de masse MALDI-TOF de la Figure 131.

m/z	A	B	C	Attribution	Adduit	m/z	A	B	C	Attribution	Adduit
137,3	x	x		DHB		482,2	x			DHIhydrolysé-DAGp	H ⁺
143,4	x			DHB		496,2			x	DHI-DAGp	H ⁺
145,3	x			DHB		504,2	x			DHIhydrolysé-DAGp	Na ⁺
154,3	x			DHB		523,3	x			Non attribué	NA
176,0			x	DHI	H ⁺	630,2	x			Non attribué	NA
177,3	x	x	x	DHB		636,3	x			DAI-DHI-DAI	K ⁺
189,1	x	x		Non attribué	NA	644,5	x	x		DAI-DHI-DAIp	H ⁺
217,4		x		Non attribué	NA	648,4		x		Non attribué	NA
230,3	x	x		DAI	H ⁺	658,6		x	x	DAI-DHI-PDAI	H ⁺
244,4	x	x	x	PDAI	H ⁺	661,3	x	x		Non attribué	NA
258,5	x	x		Non attribué	NA	666,3	x	x		DAI-DHI-DAIp	H ⁺
262,2	x			Non attribué	NA	675,6		x		Non attribué	NA
273,3	x	x		DHB		676,5	x	x		Non attribué	NA
276,4	x	x	x	DAIp1/2	H ⁺	690,5	x	x	x	DAIp-DHI-DAIp	H ⁺
290,1	x	x	x	PDAIp	H ⁺	693,2	x			Non attribué	NA
294,4	x			Non attribué	NA	698,6		x		Non attribué	NA
299,5	x			Non attribué	NA	707,3	x	x	x	DAIp-DHI-DAG ou DAI-DHI-DAGp	H ⁺
300,4	x	x		Non attribué	NA	712,6		x		DAIp-DHI-DAIp	Na ⁺
307,3	x	x		Non attribué	NA	715,3	x			Non attribué	NA
308,4	x	x		Non attribué	NA	721,5			x	PDAI-DHI-DAG	H ⁺
315,4	x			DAG	Na ⁺	724,3	x	x		DAG-DHI-DAG	H ⁺
322,1	x	x	x	DAIp	H ⁺	729,3	x	x		DAIp-DHI-DAG ou DAI-DHI-DAGp	Na ⁺
329,4		x		Non attribué	NA	739,3		x		Non attribué	NA
343,5	x			Non attribué	NA	746,2	x	x		DAG-DHI-DAG	Na ⁺
344,1	x	x	x	DAIp	Na ⁺	753,5		x	x	DAGp-DHI-DAIp	H ⁺
350,4			x	Non attribué	NA	770,3		x	x	DAG-DHI-DAGp	H ⁺
361,4	x	x		DAGp1/2	Na ⁺	775,6	x			Non attribué	NA
371,5	x	x		Non attribué	NA	792,4		x		DAG-DHI-DAGp	Na ⁺
387,5	x	x	x	DAI-DHI linéaire	H ⁺	809,5		x		Non attribué	NA
399,5	x	x		Non attribué	NA	838,3		x		DAGp-DHI-DAGp	Na ⁺
401,5	x	x	x	PDAI-DHI linéaire	H ⁺	863,4		x		DAG-DHI-DAG-DHI cycle	H ⁺
419,3		x		DAIp-DHIhydrolysé	H ⁺	1121,5			x	DAGp-DHI-DAI-DHI-DAIp	H ⁺
427,5	x			Non attribué	NA	1138,5		x		2DHI+2DAG+1DAI+p	H ⁺
432,4		x	x	DAG-DHI cycle	H ⁺	1506,6		x		3DHI+2DAG+2DAI+p	H ⁺
433,4	x		x	DAIp-DHI	H ⁺	1569,7		x		3DHI+3DAG+1DAI+p	H ⁺
450,4			x	DAG-DHI linéaire	H ⁺	1591,7		x		3DHI+3DAG+1DAI+p	Na ⁺
455,1			x	DHI-DAIp	Na ⁺	1654,6		x		3DHI+4DAG+p	Na ⁺
472,2	x		x	DAG-DHI linéaire	Na ⁺						

Similairement à la Figure 131C, la réaction simultanée des trois monomères (DHI, DAI et DAG), a été réalisée dans le DMSO (Figure 132, Tableau 14). Les espèces formées extemporanément sont majoritairement composées de DHI et de DAG, même si quelques oligomères mixtes contenant des motifs de répétition « DAI+DHI+DAG » sont détectés. L'absence de DAI dans la plupart des structures pourrait s'expliquer par une déprotection plus lente du DAIp dans le DMSO (réalisée ici comme dans l'eau, *i.e.* en ajoutant 1 v% HCl pendant 12h), ou d'un équilibre thermodynamique favorisant la réaction du DAG plutôt que celle du DAI. La première hypothèse semble la plus pertinente étant donné les résultats précédemment obtenus dans l'eau, même si la déprotection des dialdéhydes dans le DMSO n'a pas été réalisée dans ce travail.

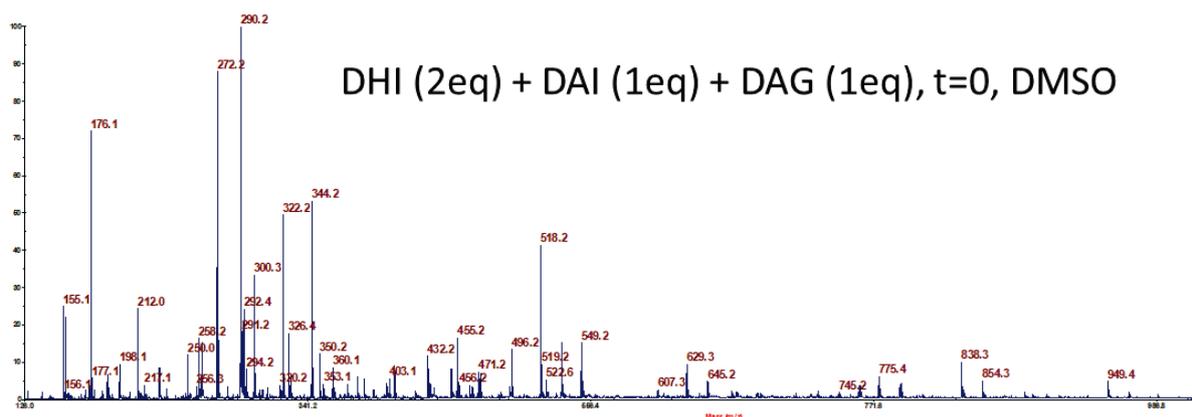


Figure 132 - Spectre de masse MALDI-TOF de la réaction entre le DHI (5 mM dans le DMSO, 2eq), le DAG (1eq, déprotégé avec 1 v% HCl pendant 12h) et le DAI (1eq, déprotégé avec 1 v% HCl pendant 12h). L'attribution des pics selon la combinaison de monomères formant les oligomères est donné dans le Tableau 14.

Tableau 14 - Attribution des pics du spectre de masse MALDI-TOF de la Figure 132.

m/z	Attribution	Adduit
155,1	CHCA	
157,0	CHCA	
176,0	DHI	H ⁺
189,1	Non attribué	NA
250,0	Non attribué	NA
260,4	Non attribué	NA
290,1	PDAlp	H ⁺
322,1	DAIp	H ⁺
344,1	DAIp	Na ⁺
379,0	Non attribué	NA
407,2	DAGp	Na ⁺
455,1	DHI-DAIp	Na ⁺
496,2	DHI-DAGp	H ⁺
518,2	DHI-DAGp	Na ⁺
607,2	DHI-DAG-DHI	H ⁺
629,2	DHI-DAG-DHI	Na ⁺
645,2	DHI-DAG-DHI	K ⁺
755,4	DHI-DAI-DHI-DAI	H ⁺
791,4	Non attribué	NA
838,3	DAGp-DHI-DAGp	Na ⁺
886,4	DHI-DAI-DHI-DAGp	Na ⁺
949,0	DHI-DAG-DHI-DAGp	Na ⁺
965,2	DHI-DAG-DHI-DAGp	K ⁺
1060,3	DHI-DAG-DHI-DAG-DHI	Na ⁺
1076,4	DHI-DAG-DHI-DAG-DHI	K ⁺
1206,5	2DHI + 1DAI + 2DAG + 2p	Na ⁺
1269,2	DAGp-DHI-DAG-DHI-DAGp	Na ⁺
1317,5	3DHI + 1DAI + 2DAG + p	Na ⁺
1380,2	3DHI + 3DAG + 2p	Na ⁺
1491,5	4DHI + 3DAG	Na ⁺

L'étude du caractère dynamique des oligomères par spectrométrie de masse MALDI-TOF reste limitée à la seule détection d'espèces mixtes ou non. Une tentative d'utiliser le changement de pH pour accentuer ce caractère réversible des liaisons acylhydrazone a été réalisée (Figure 133, Tableau 15), en neutralisant la réaction entre le DHI et le DAI (après 24h de réaction dans l'eau), puis en y ajoutant le DAG dans des conditions acides ou basiques (grâce à l'ajout d'excès de HCl ou de NEt₃). L'objectif de cette expérience est de contrôler la réaction sous une forme *on/off* pour arrêter la

polymérisation (par un excès de NEt_3) ou la relancer (par un excès de HCl). D'une manière intéressante, et attendue du fait de la dépendance au pH des fonctions acylhydrazones, les espèces oligomériques détectées après l'ajout de DAG en condition basique ne contiennent que les monomères DHI et DAI, alors que l'ajout de DAG en condition acide permet d'obtenir quelques oligomères contenant ce dernier. En revanche, le DP maximal des espèces détectées reste faible, comparé à ce qui a pu être observé au cours des autres analyses en spectrométrie de masse. De fait, il a peu de pics attribués d'écart entre les expériences, ce qui amène une certaine prudence vis-à-vis des conclusions tirées.

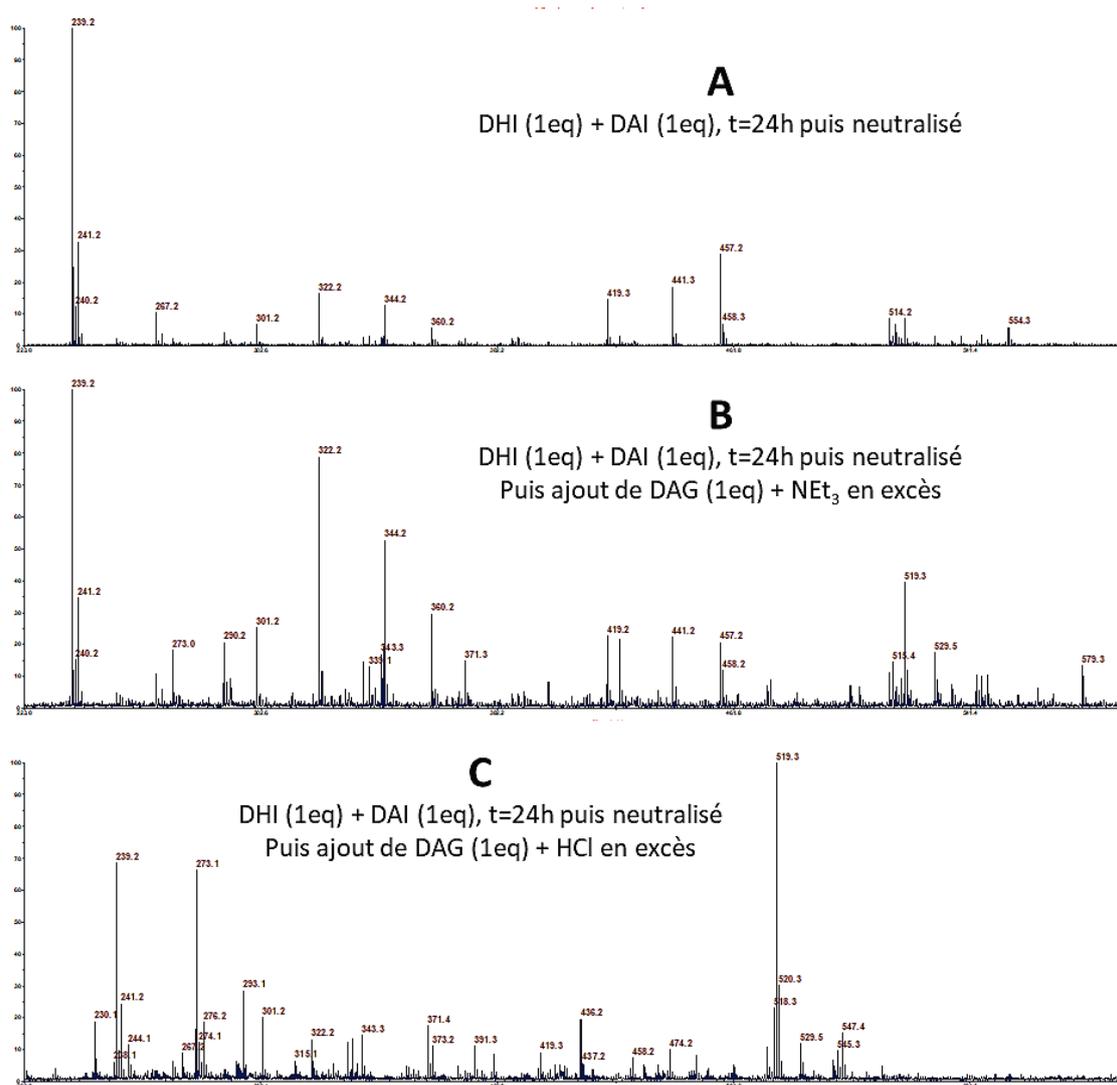


Figure 133 - Spectres de masse MALDI-TOF positifs (matrice DHB) de **(A)** la réaction entre le DHI (5 mM dans l'eau MilliQ, 1eq) et le DAG (1eq, déprotégé avec 1v% HCl pendant 12h) équilibrée pendant 24h avant d'être neutralisé à un pH de 7,3. **(B)** la réaction entre le DHI (5 mM dans l'eau MilliQ, 1eq) et le DAI (1eq, déprotégé avec 1v% HCl pendant 12h) équilibrée pendant 24h avant d'être neutralisé à un pH de 7,3, dans laquelle a été ajouté le DAG (1eq, déprotégé avec 1v% HCl pendant 12h) puis basifié avec un ajout de triéthylamine en excès) juste avant analyse. **(C)** la réaction entre le DHI (5 mM dans l'eau MilliQ, 1eq) et le DAI (1eq, déprotégé avec 1v% HCl pendant 12h) équilibrée pendant 24h avant d'être neutralisé à un pH de 7,3, dans laquelle a été ajouté le DAG (1eq, déprotégé avec 1v% HCl pendant 12h puis acidifié avec un ajout de HCl en excès) juste avant analyse. L'attribution des pics selon la combinaison de monomères formant les oligomères est donné dans le Tableau 15.

Tableau 15 - Attribution des pics des spectres de masse MALDI-TOF de la Figure 133.

m/z	A	B	C	Attribution	Cation
128,1	x			DHB	
130,1	x	x	x	DHB	
137,0			x	DHB	
155,0			x	DHB	
177,0		x	x	DHB	
230,1			x	DAI	H
239,2	x	x	x	Non attribué	NA
241,2	x	x	x	Non attribué	NA
244,1			x	PDAI	
267,2	x		x	Non attribué	NA
273,1		x	x	DHB	
276,2			x	DAIp1/2	H
290,2		x		PDAIp	H
293,1			x	DAG	H
301,2	x	x	x	Non attribué	NA
315,1			x	DAG	Na
322,2	x		x	DAIp	H
339,1		x		DAGp 1/2	H
343,3		x	x	Non attribué	NA
344,2	x	x		DAIp	Na
360,2	x	x		Non attribué	NA
371,4			x	Non attribué	NA
373,2			x	Non attribué	NA
391,3			x	DHI-DAI cycle	Na
419,3	x	x	x	Non attribué	NA
436,2			x	Non attribué	NA
441,3	x	x		PDAI-DHI	Na
457,2	x	x		Non attribué	NA
458,2			x	Non attribué	NA
474,2			x	Non attribué	NA
514,2	x			Non attribué	NA
515,4		x		Non attribué	NA
518,3			x	DP=1 DHI-DAGp	Na
519,3		x	x	Non attribué	NA
529,5		x	x	Non attribué	NA
545,3			x	Non attribué	NA
547,4			x	Non attribué	NA
554,3	x			Non attribué	NA
579,3		x		Non attribué	NA

3. Conclusion

En conclusion, la polymérisation des monomères dits « Lehn » a été mise en évidence par spectroscopie UV et par spectrométrie de masse MALDI-TOF, en prouvant la formation de liaisons acylhydrazone entre le DHI et les dialdéhydes DAI et DAG. Cependant, les suivis cinétiques réalisés par RMN ^1H n'ont pas permis de confirmer l'apparition de signaux caractéristiques de la fonction acylhydrazone. Cette contradiction n'a pas été entièrement comprise, d'autant que les analyses en SEC n'ont malheureusement pas permis de mesurer de masse molaire moyenne pour ces oligomères en raison d'interactions avec la phase stationnaire des colonnes testées. En outre, le DP des oligomères est probablement très faible (DP maximal de 7 en spectrométrie de masse MALDI-TOF). Le choix du solvant (eau et DMSO) n'exerce pas d'influence significative sur la longueur de ces oligomères. La faible déprotection des dialdéhydes pourrait être en partie responsable de cette limitation en DP. Cependant, des oligomères avec une fonction aldéhyde libre en extrémité de chaîne ont été détectés, prouvant que la déprotection ne peut pas être l'étape déterminante de la polymérisation.

Enfin, l'aspect dynamique des fonctions acylhydrazones formées a été analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Il a été démontré que l'ajout d'un dialdéhyde sur des oligomères préalablement formés à partir d'un autre dialdéhyde permettait l'obtention d'oligomères mixtes, et que le pH de la solution réactionnelle pouvait être un interrupteur *on/off* de la réaction. En revanche, la distribution des oligomères finale est différente selon l'ordre d'ajout des dialdéhydes d'après la spectrométrie de masse. Cependant, le caractère non quantitatif de cette technique et la faible différence entre les spectres de masses obtenus empêchent d'avancer avec certitude que ces polyacylhydrazones répondent ou pas à la chimie combinatoire dynamique.

IV. Conclusion sur les polyacylhydrazones à partir de monomères d'intérêt

L'objectif de ce Chapitre III était la description de l'étude des polyacylhydrazones formés à partir de monomères d'intérêt pour le projet DynaSWEET. Ceux-ci ont été synthétisés au laboratoire ICBMS à partir de travaux issus du groupe de Jean-Marie Lehn,^{163,213} et avaient pour principal intérêt d'être plus soluble dans l'eau (50 mM/monomère maximum) que les monomères commerciaux précédemment examinés (2 mM/monomère maximum) dans le Chapitre II. Après une étude de la solubilité dans l'eau, il apparaît qu'un seul des dihydrazides est effectivement hydrosoluble, le DHI. Quant aux dialdéhydes, ils sont tous hydrosolubles (sauf le DAG protégé qui ne l'est qu'en milieu acide, et pour quelques jours seulement). La réaction entre le DHI et, soit le DAG, soit le DAI, ne conduit pas à une précipitation, même à des concentrations de 50 mM/monomère, montrant donc l'influence de la solubilité initiale des monomères sur la précipitation des polyacylhydrazones finaux.

Les dialdéhydes sont stockés sous leur forme protégée (par acétalisation), et nécessitent donc une étape de déprotection avant leur utilisation. Cette déprotection a été prouvée par RMN ¹H, LC-MS, spectrométrie de masse MALDI-TOF et spectroscopie UV, en ajoutant 1% (v/v) d'acide chlorhydrique (37%, soit environ 10 M) dans la solution pendant 12h. Les espèces aldéhydes déprotégées ont été démontrées par RMN ¹H, spectrométrie de masse MALDI-TOF, et par LC-MS. Par ailleurs, des espèces secondaires provenant de la déprotection ont été observées, mais la structure de ces derniers n'a pas été identifiée. Ces espèces possèdent encore au moins une fonction aldéhyde, car elles ont été détectées en extrémité de chaîne des oligomères acylhydrazone par spectrométrie de masse MALDI-TOF et LC-MS.

Ces recherches ont également démontré une hydrolyse d'une des fonctions du dihydrazide DHI dans l'eau. Le mécanisme de cette hydrolyse a été avancé par des études en RMN ¹H, spectrométrie de masse MALDI-TOF et LC-MS. La première étape est une attaque d'une fonction hydrazide sur une autre, formant une liaison C(=O)NHNHC(=O) avec élimination d'hydrazine. La seconde étape correspond ensuite à l'addition nucléophile d'eau sur cette fonction, menant à la formation d'un acide carboxylique. La réaction entre ces deux hydrazides peut être intramoléculaire (formant un cycle) ou intermoléculaire, et catalysée en milieu acide. Le DHI semi-hydrolysé a été observé en extrémité de chaîne sur certains oligomères acylhydrazone par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

La polymérisation a été mise en évidence par spectroscopie UV et par spectrométrie de masse MALDI-TOF. En revanche, les analyses en SEC ont été infructueuses, du fait que les espèces

(monomères comme polymères) présentaient des interactions enthalpiques avec la phase stationnaire des colonnes, à l'instar des polymères « modèles ». La polymérisation avec plusieurs dialdéhydes a été caractérisée par spectroscopie de masse MALDI-TOF, et de nombreux oligomères contenant tous les types de monomères ont été détectés démontrant ainsi un aspect pseudo-dynamique des polyacylhydrazones, qui devra être validé par des techniques d'analyse quantitatives par la suite.

En comparaison avec la polymérisation utilisant les monomères commerciaux du chapitre précédent, les polyacylhydrazones sont ici plus solubles dans l'eau, ce qui a permis de les analyser par RMN dans le D₂O sans utiliser de DMSO. En revanche, les différentes caractérisations montrent que les oligomères formés sont toujours limités en masse molaire, atteignant des DP maximaux de 3. La diversité des dialdéhydes utilisables permet cependant de copolymériser plusieurs monomères différents.

Chapitre IV :

Synthèse et caractérisation de polyacylhydrazone à partir d'un monomère d'intérêt auto-associatif

Sommaire du chapitre

I.	INTRODUCTION	182
II.	POLYMERISATION DU DIHYDRAZIDE D'INTERET AVEC UN DIALDEHYDE « MODELE »	184
1.	<i>Solubilité des produits de la réaction de polymérisation</i>	<i>184</i>
a.	Dans l'eau.....	184
b.	Dans un mélange eau/DMSO	185
2.	<i>Analyse du précipité de la réaction.....</i>	<i>186</i>
3.	<i>Mise en évidence de la polymérisation.....</i>	<i>188</i>
a.	Par spectroscopie UV	188
b.	Par spectrométrie de masse MALDI-TOF	192
c.	Par chromatographie liquide.....	193
4.	<i>Conclusion.....</i>	<i>193</i>
III.	CARACTERISATION DU CARACTERE AUTO-ASSOCIATIF DU DIHYDRAZIDE D'INTERET.....	194
1.	<i>Détermination de la taille, de la distribution en taille et de la charge de surface des auto-assemblages de DHU</i>	<i>194</i>
2.	<i>Détermination de la concentration critique et des constantes thermodynamiques d'auto-association du DHU</i>	<i>196</i>
3.	<i>Détermination de la morphologie des autoassemblages de DHU</i>	<i>199</i>
4.	<i>Séparation des auto-assemblages du DHU en solution</i>	<i>202</i>
5.	<i>Influences de l'agitation et du pH de la phase continue sur les auto-assemblages de DHU</i>	<i>203</i>
a.	Influence de l'agitation des suspensions de DHU	203
b.	Influence du pH de la phase continue.....	204
i.	Sur la taille et la charge de surface des autoassemblages.....	204
ii.	Sur la turbidité.....	205
iii.	Sur l'auto-association par ITC.....	206
6.	<i>Conclusion.....</i>	<i>207</i>
IV.	ANALYSE DE L'HYDROLYSE DU DHU	209
1.	<i>Par spectrométrie de masse MALDI-TOF</i>	<i>210</i>
2.	<i>Par LC-MS</i>	<i>211</i>
3.	<i>Conclusion.....</i>	<i>213</i>
V.	CONCLUSIONS SUR LA CARACTERISATION DU DIHYDRAZIDE D'INTERET AUTO-ASSOCIATIF	214

I. Introduction

Ce quatrième chapitre s'intéresse à la polymérisation d'un monomère dihydrazide d'intérêt particulier, avec un monomère dialdéhyde « modèle ». Le choix de présenter cette polymérisation et l'analyse du comportement physico-chimique de ce monomère d'intérêt dans un chapitre indépendant s'est justifié par les difficultés rencontrées lors de la caractérisation des PACH obtenus avec celui-ci. Ainsi, ce chapitre a pour but de décrire sa polymérisation avec un monomère dialdéhyde « modèle », ses problèmes de caractérisation, et d'y associer une étude approfondie de la physico-chimie de ce monomère d'intérêt en solution aqueuse.

Ce dihydrazide d'intérêt a été synthétisé par Fanny Demontrond (doctorante au laboratoire ICBMS, partenaire de l'ANR DynaSWEET), qui s'est inspirée du protocole de synthèse décrit dans un article de Bouillon *et al.*¹⁸², issu du groupe de recherche du Dr Sébastien Ulrich (du laboratoire IBMM, Montpellier). Afin de simplifier sa dénomination dans ce manuscrit, il a été choisi de l'intituler « DHU » pour « Dihydrazide d'Ulrich ». Sa structure chimique est présentée en Figure 134.

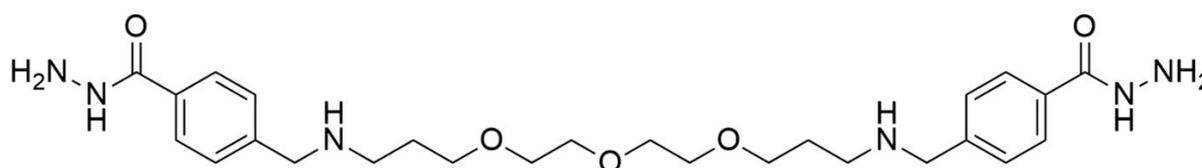


Figure 134 - Structure chimique du DHU, de masse molaire 516,64 g/mol.

Dans cet article, cette molécule dihydrazide est utilisée pour copolymériser avec un monomère dialdéhyde cationique (comportant une fonction guanidium, Figure 135) et former un PACH cationique capable de complexer de l'ADN double brin. Le copolymère final est ainsi dynamique et sensible à un ajout d'acide. En effet, un pH acide conduit à sa dégradation et donc à la libération de l'ADN double brin complexé, tout en permettant l'échappement endosomal de ce dernier. Les tests de complexation avec l'ADN ont été réalisés dans des tampons, alors que les synthèses du copolymère ont été réalisées dans le méthanol.

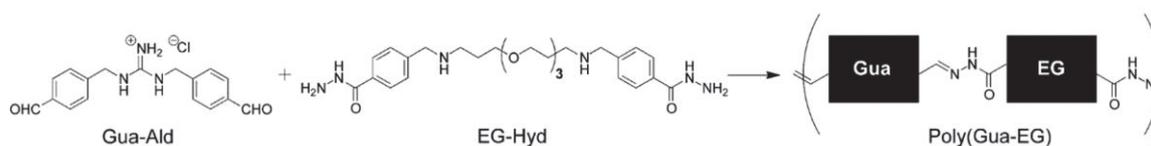


Figure 135 - Copolymérisation du DHU (dénommé « EG-Hyd » ci-dessus) avec un monomère dialdéhyde comportant une fonction guanidium, issue de l'article de Bouillon *et al.*¹⁸².

L'intérêt de ce monomère dihydrazide DHU pour le projet ANR DynaSWEET est que les polymères formés avec lui sont attendus pour être hydrosolubles, et qu'il comporte en son centre des unités d'éthylène glycol dont le nombre peut être variable. Ainsi, la distance entre les deux extrémités réactives, soit le « bras espaceur » peut être modulable, ce qui en fait un atout dans le projet DynaSWEET, comme mentionné dans l'introduction et le Chapitre I.

La première partie de ce chapitre présentera les résultats de polymérisation de ce monomère DHU avec un monomère dialdéhyde modèle, le glutaraldéhyde (GA). Ce dernier a été sélectionné car, comme montré en Chapitre II, c'est le dialdéhyde « modèle » menant aux concentrations en polymère les plus élevées dans l'eau sans précipitation. La seconde partie détaillera, quant à elle, l'étude physico-chimique du monomère DHU qui a été nécessaire pour tenter de mieux comprendre les problèmes rencontrés lors de la caractérisation des polymères résultants, en raison notamment de son comportement en solution aqueuse qui le conduit à s'auto-assembler.

II. Polymérisation du dihydrazide d'intérêt avec un dialdéhyde « modèle »

Avant de considérer la polymérisation du couple DHU/GA et sa caractérisation, les évaluations de la solubilité, dans l'eau et dans un mélange eau/DMSO, seront présentées. Puis, les produits de la réaction de la polymérisation entre le DHU et le GA, ainsi que les caractérisations des éventuels précipités, seront discutés.

1. Solubilité des produits de la réaction de polymérisation

Comme indiqué dans les Chapitres II et III, la solubilité des PACh est un paramètre clé pour leur caractérisation. Afin d'évaluer cette solubilité, des tests déterminant les concentrations limites en monomères ne conduisant pas à une précipitation après réaction ont été effectués. Cette solubilité a été déterminée dans l'eau pure, ou tamponnée à différents pH, ou en co-solvant avec le DMSO à différentes proportions volumiques.

a. Dans l'eau

La solubilité de la réaction de polymérisation entre le DHU et le GA dans l'eau a été évaluée visuellement, selon l'aspect de la solution. Les concentrations testées sont regroupées dans le Tableau 16. Ce tableau montre que la réaction entre le DHU et le GA ne permet pas d'avoir une concentration limite sans précipitation plus élevée que la réaction entre le DHS et le GA (qui était de 0,5 mg/mL, cf Chapitre II).

Tableau 16 - Aspect visuel de la réaction de polymérisation entre le DHU et le GA dans l'eau en fonction de la concentration des monomères.

Concentration massique totale en DHU + GA (mg/mL)	Concentration molaire en DHU ou GA (mM)	Aspect de la réaction
10,5	23,4	Opaque et laiteux immédiatement
1,14	2,54	Opaque et laiteux après quelques minutes
0,50	1,16	Apparition de précipité après environ 2h
0,21	0,46	Apparition de précipité après environ 6h

L'influence du pH de la solution a également été examinée sur l'apparition de précipitation dans la solution, pour une concentration totale fixée à 0,5 mg/mL (Tableau 17). Pour cela, la valeur de pH a été fixée juste après la mise en contact des solutions de monomères, par ajout de faibles volumes d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium, à différentes concentrations. L'aspect de la solution finale a ensuite été évalué visuellement après 2h, 24h, et 48h de mise en contact des solutions de monomères. Le Tableau 17 révèle qu'à pH 3, 4, ou 8, la précipitation est plus tardive. En revanche, une solution trop acide (pH 2) semble provoquer la précipitation de la réaction, comme à pH 4,9. Ces résultats montrent que la polymérisation est sensible au pH, probablement en raison des nombreuses fonctions pouvant servir de base ou d'acide de Brønsted (fonctions hydrazide et amine secondaire).

Tableau 17 - Aspect visuel de la réaction de polymérisation entre le DHU et le GA (concentration massique totale de 0,5 mg/mL) en fonction du pH de la solution. Le pH de 4,9 correspond au pH obtenu sans ajouter d'acide ni de base.

pH	ASPECT DE LA SOLUTION		
	Après 2h	Après 24h	Après 48h
2,0	Légère précipitation	Légère précipitation	Précipitation
3,0	Soluble	Légère précipitation	Légère précipitation
4,0	Soluble	Soluble	Légère précipitation
4,9	Légère précipitation	Légère précipitation	Précipitation
8,0	Soluble	Soluble	Légère précipitation

b. Dans un mélange eau/DMSO

Pour atteindre des concentrations en monomères supérieures, de la même façon que pour le dihydrazide « modèle », le DHS dans le Chapitre II, l'étude de la solubilité de la réaction entre le DHU et le GA a été menée dans un mélange d'eau et de DMSO (Figure 136). L'état de la solution est ainsi reporté en fonction de la proportion volumique en DMSO dans le solvant (ordonnée), et de la concentration molaire totale en monomères (abscisse).

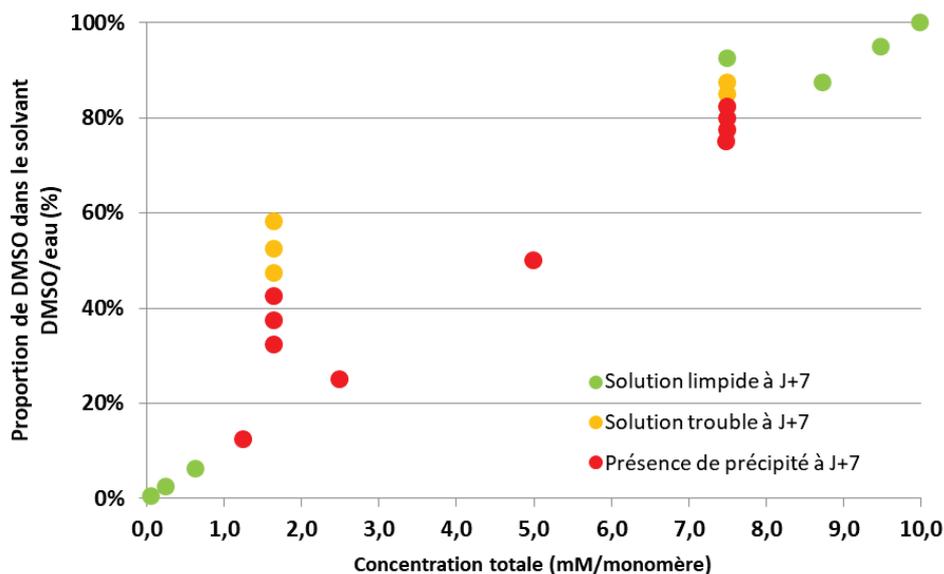


Figure 136 - État visuel de la solution de réaction de polymérisation du couple DHU/GA, en fonction de la concentration totale en monomères, et de la proportion volumique de DMSO dans l'eau.

Cette figure montre que les concentrations atteignables sans précipitation dans un solvant majoritairement aqueux sont inférieures à 1,0 mM/monomère, et que les concentrations plus élevées (> 7,5 mM/monomère) ne sont atteintes qu'en ayant plus de 85% de DMSO dans le solvant. Ainsi, les concentrations ne conduisant pas à une précipitation ne sont pas meilleures qu'avec les monomères « modèles ».

2. Analyse du précipité de la réaction

À l'instar du précipité obtenu par la polymérisation des monomères « modèles » à trop haute concentration, celui obtenu par la réaction entre le DHU et le GA a été isolé (par lyophilisation), et des tests de resolubilisation ont été menés dans différents solvants (choisis pour leurs polarité et leur caractère protique variés), à température ambiante, sous agitation et à une concentration massique totale de 1 mg/mL (Tableau 18).

Tableau 18 - Aspect visuel de solubilisation du précipité de la réaction DHU+GA (concentration massique totale de 1 mg/mL) dans différents solvants, à température ambiante, sous agitation. Observations après 3 jours.

Solvant	Aspect visuel
CHCl ₃	Non solubilisé
DMSO	Présence de fines particules, coloration jaune
DMF	Trouble, présence de fines particules
Ether diéthylique	Non solubilisé
AcOH glacial	Présence de grosses particules et dépôt jaune
Eau permutée	Non solubilisé

Ce tableau montre que le précipité n'est pas solubilisable dans aucun des solvants testés. Cette difficulté à solubiliser le précipité est compatible avec le fait que celui-ci soit du PAcH formé à partir du DHU et du GA, en effet ce type de polymère est connu pour être difficilement soluble dans les solvants usuels, et les solvants polaires aprotiques (tels que le DMSO et le DMF) sont connus pour être les meilleurs candidats.⁵⁶

Une analyse par ATR infra-rouge a été menée sur ce précipité. Le spectre (Figure 137) montre une large bande entre 3 200 et 3 400 cm⁻¹, qui pourrait correspondre à la fonction amine -NH₂ ou alcool -OH. Les faibles bandes à 2 900 cm⁻¹ pourraient être attribuées aux liaisons -NH ou -CH. La bande intense à 1 640 cm⁻¹ correspondrait aux liaisons C=C (présentes sur le cycle benzénique) ou C=O (amide) ou encore C=N. D'autres bandes peuvent également être attribuées : à 1 550 cm⁻¹ aux liaisons C=C ou NH, à 1 100 cm⁻¹ aux liaisons C-O éther ou C-N. Même si à partir de ce spectre, il est difficile de prouver avec certitude que le précipité soit bien du PAcH, la bande présente à 1 640 cm⁻¹ (bande grisée sur le spectre) permet l'hypothèse que cela en soit. Par ailleurs, notons que ce spectre ne révèle pas de fonctions aldéhyde, dont la liaison C=O est attendue vers 1 685 cm⁻¹, laissant à penser qu'il pourrait s'agir du polymère ou du DHU seul.

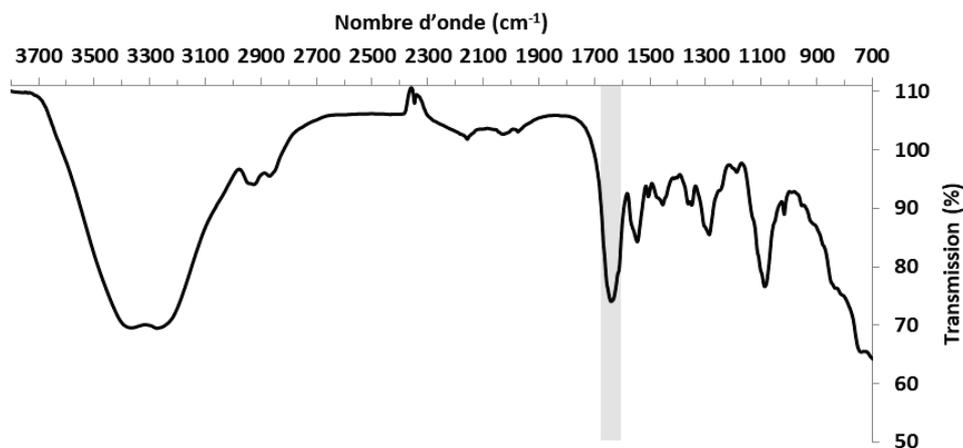


Figure 137 - Spectre infra-rouge ATR à froid du précipité issu de la réaction entre le DHU et le GA (1 mg/mL au total, dans l'eau). La zone grisée correspond à la bande à 1640 cm⁻¹.

3. Mise en évidence de la polymérisation

Pour mettre en évidence la polymérisation entre le DHU et le GA, les mêmes outils d'analyse qu'en Chapitres II et III ont été utilisés, à savoir la spectroscopie UV-Visible, la spectrométrie de masse MALDI-TOF, ainsi que la chromatographie liquide (HPLC et SEC). Afin de mener à bien ces analyses, des concentrations et des temps d'analyses permettant de ne pas avoir de précipitation ont été sélectionnés.

a. Par spectroscopie UV

La cinétique de polymérisation entre le DHU et le GA a été étudiée par spectroscopie UV en accumulant des spectres successifs à température ambiante et sans agitation. Dans un premier temps, seul le DHU a été analysé à plusieurs concentrations différentes (les concentrations de 0,05 et 0,10 mM sont présentées en Figure 138) en diluant une solution de DHU fraîchement préparée de 1 mM. Les superpositions des spectres réalisées entre 230 (limite basse de mesure de l'appareil) et 400 nm pour ces deux concentrations montrent une augmentation avec le temps de l'absorbance (entre 230 et 300 nm, atteignant un maximum d'absorbance), inexpliquée à ce jour. Il a été vérifié que cette augmentation n'était pas due à une évaporation partielle de l'eau avec le temps en réalisant des expériences contrôles. L'absorbance est ensuite constante avec le temps.

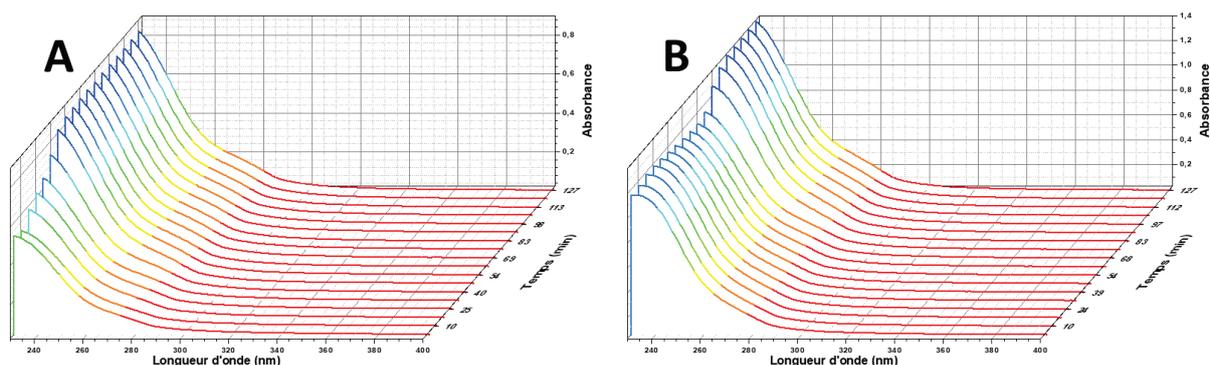


Figure 138 - Superpositions des spectres UV d'une solution de DHU dans l'eau **(A)** à 0,05 mM et **(B)** à 0,10 mM, sans agitation et à température ambiante.

Étonnamment, le temps pour lequel la variation d'absorbance débute est variable selon la concentration en DHU sans toutefois y être corrélé (Tableau 19). Il est important de noter qu'aucune précipitation n'a été observée durant ces intervalles de temps. Ces changements semblent donc bien liés à une modification chimique, sans être capables de l'identifier à l'heure actuelle.

Tableau 19 - Évolution du temps de début de variation d'absorbance (entre 230 et 300 nm) d'une solution de DHU dans l'eau.

Concentration molaire en DHU dans l'eau (mM)	Temps auquel la variation d'absorbance débute (min)
0,30	37
0,20	52
0,10	68
0,05	10

L'accumulation des spectres de la réaction entre le DHU et le GA (Figure 139) montre, comme pour la solution de DHU, une variation d'absorbance encore inexpiquée. Néanmoins, cette variation débute plus tôt lors de l'ajout de GA (environ 68 min pour une solution de DHU, alors qu'elle est à environ 20 min pour la solution de DHU + GA, à une concentration de 0,1 mM en DHU). À ce stade du manuscrit, les raisons de ces variations, dont le temps de début est fonction de s'il y a ajout ou pas de GA, ne sont pas encore élucidées.

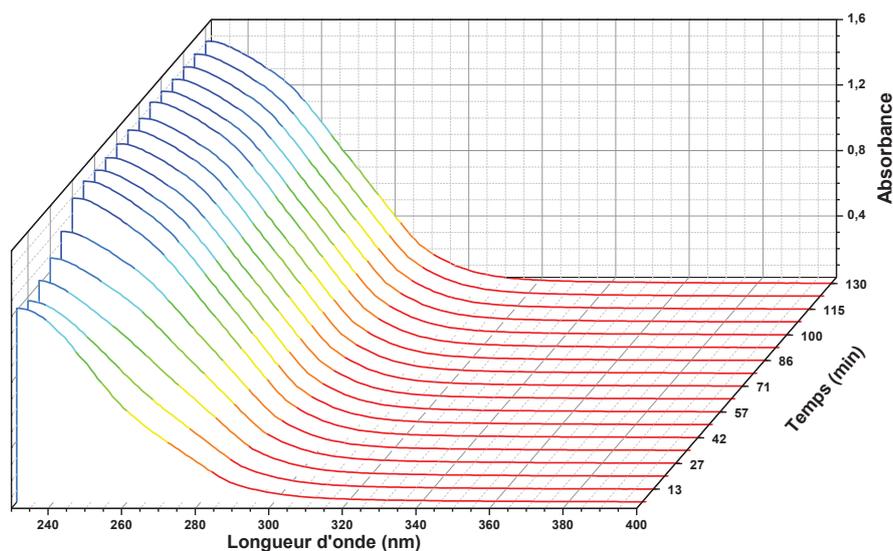


Figure 139 - Superposition de spectres UV de la réaction entre le DHU et le GA (0,5 mM/monomère) dans l'eau, diluée dans l'eau dès la mise en contact des monomères à une concentration finale de 0,1 mM/monomère sans agitation et à température ambiante.

Par ailleurs, l'évolution de l'absorbance à 230 nm en fonction du temps montre que la polymérisation est difficilement détectable (Figure 140). En effet, un palier est atteint après la variation brusque d'absorbance alors qu'on s'attendrait à ce que cette courbe ressemble à ce qui a été observé pour les autres monomères dans les Chapitre II et III (à savoir une augmentation de l'absorbance à cette longueur d'onde).

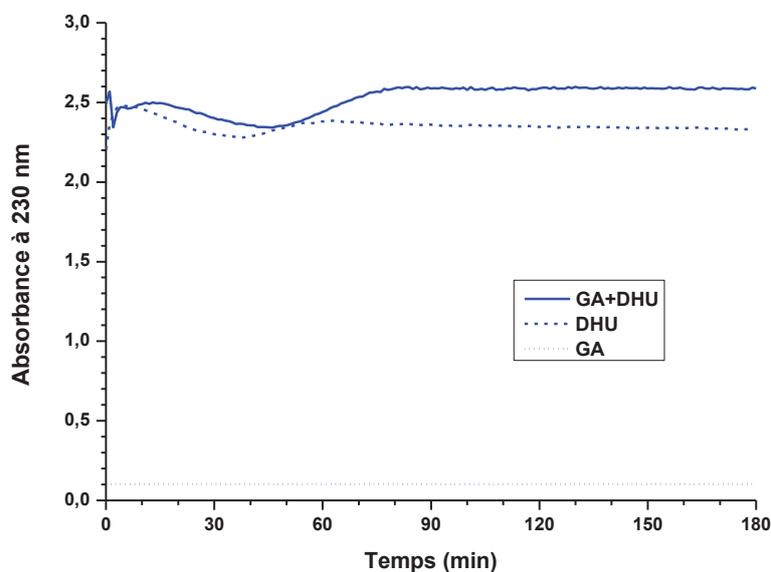


Figure 140 - Évolution de l'absorbance à 230 nm de solutions contenant 0,2 mM/monomère (trait continu : réaction entre le GA et le DHU, tirets : DHU, pointillés : GA), diluées dans l'eau, sans agitation et à température ambiante.

Ensuite, l'influence d'un ajout d'acide chlorhydrique sur cette cinétique a été analysée. La superposition des spectres obtenue (Figure 141) montre une variation de l'absorbance entre 230 et 300 nm bien différente de l'étude cinétique réalisée sans acide. Différentes variations au cours des 180 premières minutes ont lieu avec majoritairement une diminution de l'absorbance au cours du temps. Comme pour la cinétique sans acide, cette variation est contre-intuitive puisqu'on s'attendrait plutôt à une augmentation d'absorbance étant donné l'absorbance élevée connue de la fonction acylhydrazone à des longueurs d'ondes inférieures à 250 nm.

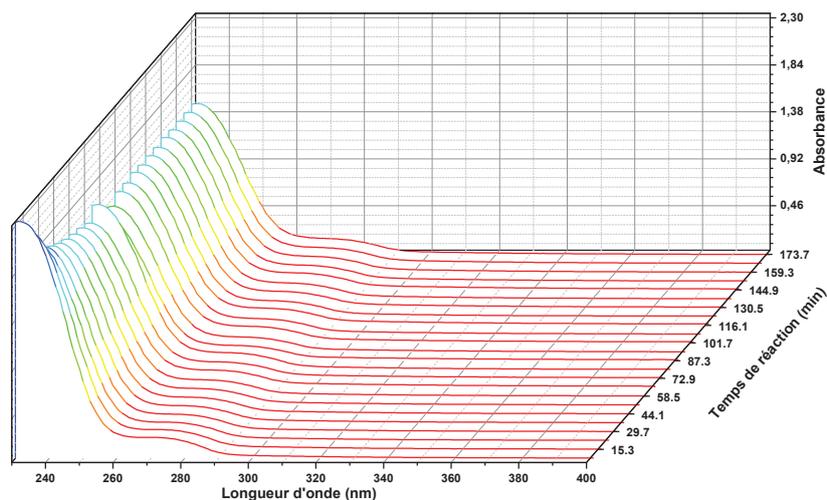


Figure 141 - Superposition de spectres UV de la mise en contact d'une solution de DHU avec une solution de GA (0,1 mM/monomère), catalysé par du HCl (0,5 M), sans agitation et à température ambiante.

En conclusion, cette analyse par spectroscopie UV de la mise en contact d'une solution de DHU avec une solution de GA n'apporte aucune information permettant de montrer qu'il y a réaction entre les deux monomères. Elle apporte, en revanche, de nombreuses interrogations. Afin d'obtenir des informations complémentaires, et de mieux comprendre ce qui se passe, une caractérisation en spectrométrie de masse MALDI-TOF a été ensuite réalisée.

b. Par spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'analyse de la polymérisation par spectrométrie de masse MALDI-TOF a été effectuée sur un mélange de solutions de DHU et GA extemporané (concentration finale de 1 mM/monomère, Figure 142). De la même façon que pour les PACH formés à partir des monomères « modèles » en Chapitre II, les espèces polymérisées observées ne sont que des macrocycles (DP = 1 ; 2 et 3), sans que des espèces linéaires ne soient détectées. Un changement de matrice (CHCA contre DHB) a permis de vérifier que les mêmes espèces étaient visibles, confirmant ainsi que la détection de ces dernières n'était pas dépendante de la matrice utilisée.

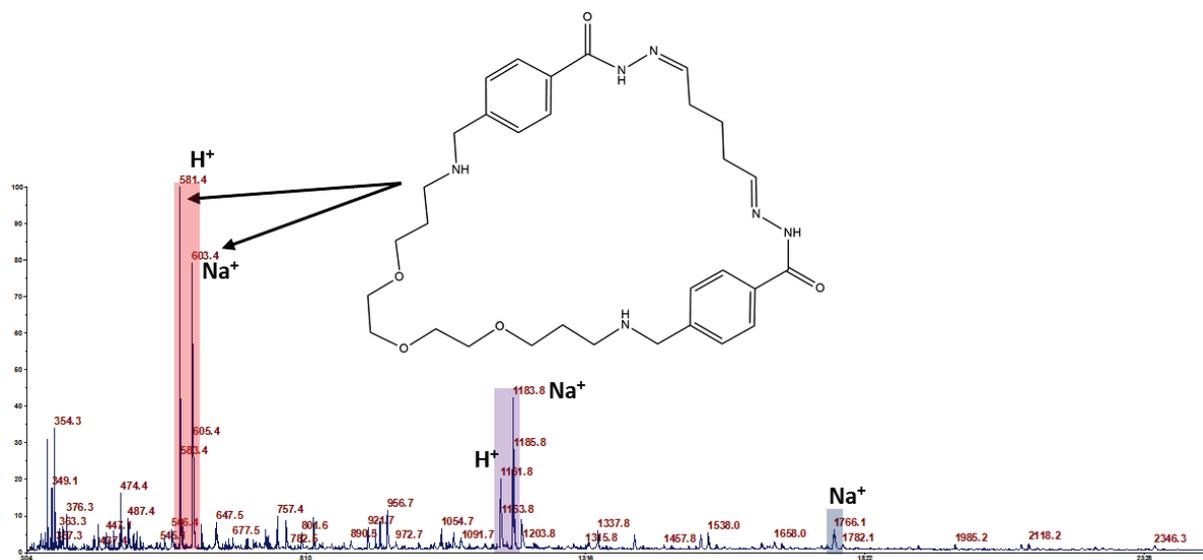


Figure 142 - Spectre de masse MALDI-TOF positif (matrice DHB) d'un mélange extemporané de DHU et de GA (1 mM/monomère). Les zones colorées correspondent aux valeurs de m/z des macrocycles (avec un adduit H⁺ ou Na⁺). La composition des macrocycles est : 1 DHU + 1 GA pour la zone rouge, 2 DHU + 2 GA pour la zone violette, 3 DHU + 3 GA pour la zone bleue.

En conclusion, contrairement à l'analyse par spectroscopie UV, celle-ci par spectrométrie de masse MALDI-TOF a permis de montrer l'existence de fonctions acylhydrazone. Le fait que les oligomères soient des macrocycles pourrait être relié à la faible concentration des monomères utilisée (sinon il y a une précipitation pour des concentrations plus élevées), en accord avec la théorie de Jacobson-Stockmayer⁷¹, comme expliqué en Chapitre II.

La même analyse a été menée sur ce mélange extemporané de monomères mais avec un ajout d'acide acétique (1 % v/v). Un spectre de masse similaire a été obtenu (Annexe 4), confirmant là aussi que ces macrocycles peuvent provenir d'un puits thermodynamique, les rendant peu réactifs et prompts à former des espèces de chaînes linéaires et de masse molaire plus élevée.

c. Par chromatographie liquide

Différentes analyses chromatographiques ont été réalisées, par HPLC puis par SEC, pour séparer les oligomères des monomères. Cependant, les chromatogrammes obtenus, tant ceux du mélange DHU/GA que ceux du DHU seul en solution, n'étaient ni répétables sur une même colonne, ni reproductibles d'une colonne à l'autre, et ce pour plusieurs types d'éluants testés.

4. Conclusion

L'analyse du mélange des monomères DHU et GA s'est révélée plus difficile que pour les monomères « modèles », notamment par HPLC et SEC. Ces difficultés paraissent cohérentes avec les incompréhensions observées par spectroscopie UV. La preuve de l'oligomérisation en macrocycles de DP faibles a cependant été apportée par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Tout ceci, additionné au fait que le comportement du DHU en solution était particulier (notamment, par l'apparition d'un moussage de la solution de DHU après agitation), nous a conduit à mener un examen approfondi du monomère DHU dans l'eau. Des recherches ont en effet été réalisées pour prouver l'existence d'objets issus de l'auto-association du DHU en solution aqueuse. La description de ces recherches fait l'objet des paragraphes qui suivent.

III. Caractérisation du caractère auto-associatif du dihydrazide d'intérêt

Le caractère tensioactif du DHU, mis en évidence simplement par le moussage de sa solution aqueuse, a donc été étudié en essayant de démontrer l'apparition d'objets après sa dissolution dans l'eau. Pour cela, des analyses par (i) diffusion dynamique de la lumière, pour mesurer la taille et la distribution en taille de ces objets, (ii) zétamétrie, afin de déterminer leur charge de surface, (iii) titration calorimétrique isotherme, pour mesurer la concentration critique d'auto-association du DHU et ses constantes thermodynamiques, et (iv) microscopie électronique, pour observer leur morphologie, ont été effectuées. Ces différentes analyses et leurs résultats vont être successivement présentés ci-après.

1. Détermination de la taille, de la distribution en taille et de la charge de surface des auto-assemblages de DHU

En utilisant le Zetasizer de la société Malvern, la taille des objets formés par l'auto-association du monomère DHU a été analysée par diffusion dynamique de la lumière (DLS). L'influence de la concentration en DHU (de 0,5 à 10 mM dans de l'eau permutée à 25°C) sur le diamètre hydrodynamique moyen D_z des objets et sa distribution (révélée par l'indice de polydispersité Pdl) a été examinée (Figure 143). Les valeurs données sont des moyennes de triplicats.

Pour une concentration supérieure ou égale à 2 mM en DHU, le diamètre moyen des objets est constant et égal à 100 nm, avec une valeur de Pdl proche de 0,20 (reflétant une distribution en taille relativement resserrée et monomodale). Pour une concentration inférieure à 2 mM en DHU, le signal diffusé par les objets étant trop faible, il conduit à des erreurs sur la mesure, très influencée par la présence de poussières dans la suspension.

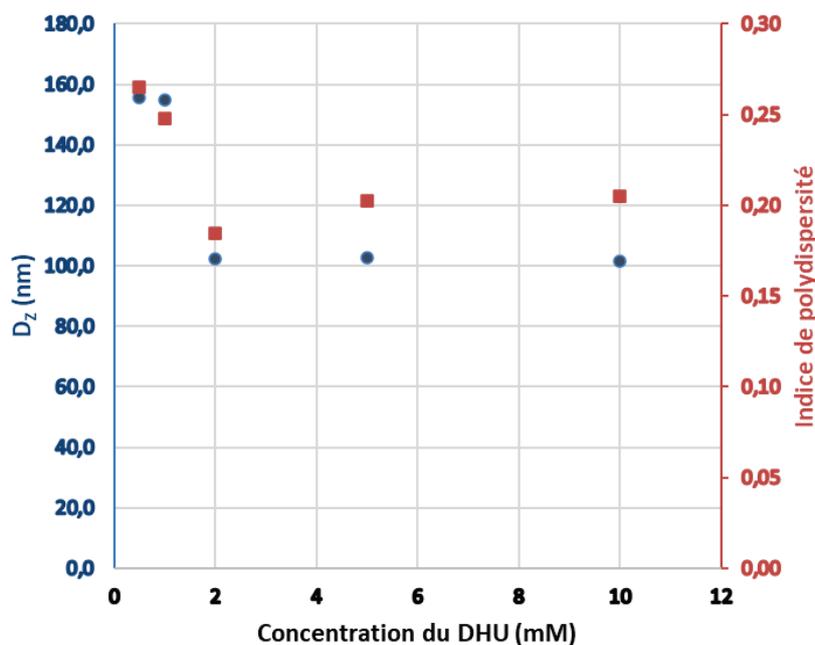


Figure 143 - Évolution du diamètre hydrodynamique moyen D_z (points bleus) et de l'indice de polydispersité Pdl (carrés rouges) mesurés en DLS en fonction de la concentration en DHU dans l'eau.

La charge de surface de ces objets a été ensuite mesurée grâce au même appareil. Ces analyses, réalisées en triplicatas, ont été effectuées à une concentration en DHU de 5 mM dans l'eau, à 25°C. La transformation de la vitesse électrophorétique mesurée en potentiel zêta a été possible en suivant l'équation de Smoluchowski.

Un potentiel zêta négatif de $34,3 \pm 1,5$ mV pour ces objets a été ainsi déterminé. Cette valeur négative n'était pas du tout attendue puisque le DHU ne présente pas de fonctions anioniques dans sa structure chimique, rappelée ci-dessous (Figure 144). Cette valeur négative sera discutée plus tard dans cette partie.

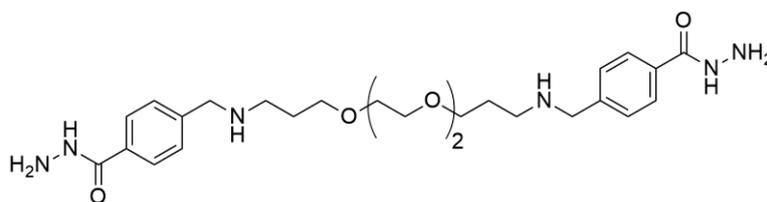


Figure 144 - Rappel de la structure chimique du DHU.

2. Détermination de la concentration critique et des constantes thermodynamiques d'auto-association du DHU

La concentration critique d'auto-association du DHU a été ensuite déterminée par titration calorimétrique isotherme (ITC), en utilisant les protocoles analytiques et de calculs basés sur la littérature^{223,224} et décrits dans la partie expérimentale. La Figure 145 présente schématiquement le principe de cette analyse. Brièvement, une solution de DHU de 1 mM dans l'eau est injectée par une seringue à une cellule contenant de l'eau (950 μL) à 25°C. L'injection est effectuée avec un volume fixe toutes les 500 secondes.

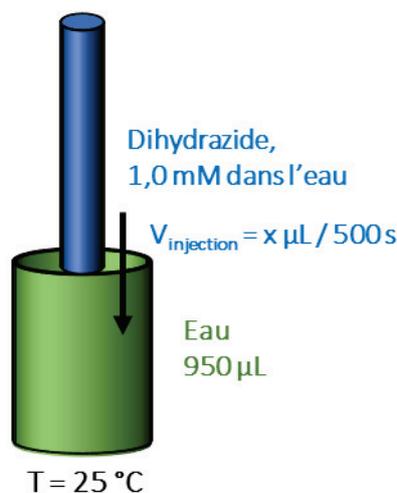


Figure 145 - Schéma présentant les conditions expérimentales des analyses ITC. Le volume d'injection est de 1,14 μL ou de 1,99 μL .

Le choix du volume d'injection et de la concentration de DHU, *i.e.* de la quantité de DHU ajoutée à chaque injection, a été réalisé empiriquement en utilisant une concentration de 1,0 mM, et des volumes d'injections de 1,14 μL et 1,99 μL (volumes minimaux acceptés par l'appareil). Le choix d'utiliser deux volumes différents a permis d'obtenir les paramètres thermodynamiques à partir de deux configurations différentes, et de pouvoir ainsi examiner leur reproductibilité. Les valeurs de chaleur molaire libérée et mesurée en fonction de la concentration en DHU dans la cellule sont présentées en Figure 146. Celles-ci, conformément à la théorie, ont été ensuite modélisées par une sigmoïde de Boltzmann.

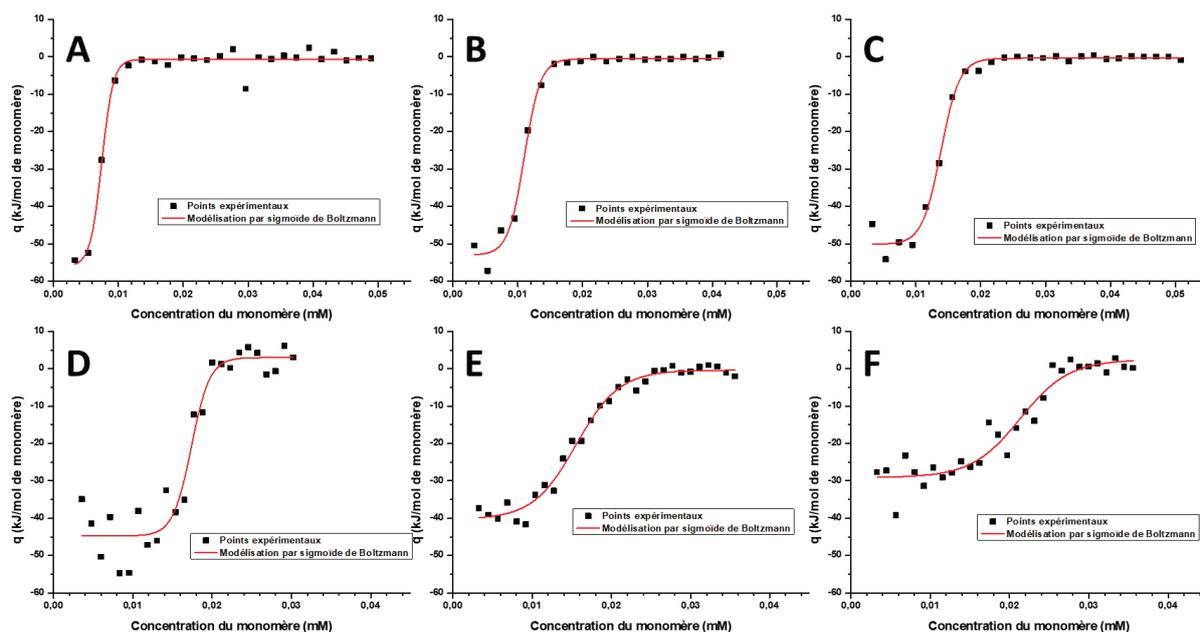


Figure 146 - Thermogrammes représentant les valeurs de la chaleur molaire échangée en fonction de la concentration en DHU dans la cellule d'eau, modélisées par une fonction sigmoïdale. (A), (B), (C) : volume d'injection de 1,99 μL . (D), (E), (F) : volume d'injection de 1,14 μL .

Selon le protocole de calcul décrit dans la partie expérimentale, il est alors possible de tirer de ces modélisations la concentration d'agrégation ou d'auto-association critique (CAC) en déterminant le point d'inflexion de la courbe (en dérivant la sigmoïde). De plus, la CAC permet de remonter à la différence d'enthalpie libre d'agrégation, en faisant l'hypothèse que les objets formés sont composés d'un grand nombre de molécules (*i.e.* que la molalité d'objets à N molécules est égale à la molalité d'objets à N-1 molécules). Parallèlement, la différence d'enthalpie d'agrégation ou d'auto-association est calculable à partir des paramètres de la sigmoïde, correspondant graphiquement à l'écart entre les deux plateaux. Enfin, l'entropie d'agrégation ou d'auto-association est déterminable à partir des deux fonctions d'états déjà calculées. Le Tableau 20 regroupe ces paramètres calculés pour chaque expérience (correspondant aux lettres de la Figure 146).

Tableau 20 - Valeurs des paramètres thermodynamiques déterminés par ITC (à 25°C). Ces valeurs sont obtenues à partir de la modélisation sigmoïdale décrite dans la partie expérimentale.

Lettre sur Figure 146	Volume injecté (μL)	R ² de la modélisation sigmoïde	CAC (mM)	ΔH_{agg} (kJ/mol)	ΔG_{agg} (kJ/mol)	ΔS_{agg} (kJ/K/mol)
A	1,99	0,98	0,007	55,6	-29,4	0,29
B	1,99	0,991	0,011	53,0	-28,3	0,30
C	1,99	0,991	0,014	50,5	-27,7	0,29
D	1,14	0,94	0,017	48,6	-27,2	0,28
E	1,14	0,98	0,015	40,5	-27,5	0,25
F	1,14	0,92	0,021	32,2	-26,7	0,22

Ces résultats ont ensuite été moyennés, pour donner des valeurs moyennes de CAC, ΔH_{agg} , ΔG_{agg} et ΔS_{agg} (Tableau 21). L'écart-type a été déterminé sur six analyses différentes et est relativement satisfaisant puisque inférieur à 20% (excepté pour le CAC où il représente 35% de différence).

Tableau 21 - Valeurs des paramètres thermodynamiques de l'auto-association du DHU dans l'eau moyennés sur six analyses en ITC (à 25 °C).

Paramètres thermodynamiques	Moyenne de 6 mesures \pm Écart-type
CAC (mM)	0,014 \pm 0,005
ΔH_{agg} (kJ/mol)	47 \pm 9
ΔG_{agg} (kJ/mol)	-27,8 \pm 0,9
ΔS_{agg} (kJ/K/mol)	0,27 \pm 0,03

On peut noter que la valeur de CAC est d'un ordre de grandeur comparable à celle d'un tensioactif (plus exactement, à la concentration micellaire critique, CMC) bien décrit dans la littérature, le Tween-80 (structure chimique en Figure 147). Sa CMC est de 0,012 mM à 25 °C.

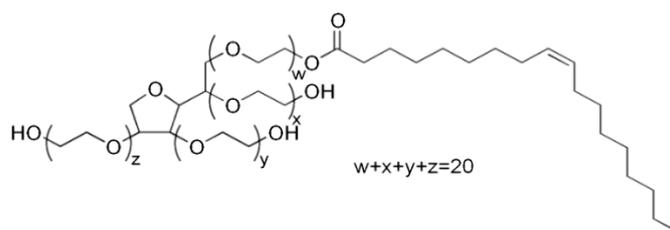


Figure 147 - Structure chimique du Tween-80.

Suite à la mise au point de cette méthodologie d'analyse pour l'examen de l'auto-association du DHU, il a été tenté de la mettre à profit pour caractériser la mise en contact d'une solution de DHU avec une solution de GA. Pour cela, l'injection d'une solution de DHU (1,0 mM) dans une solution de GA (0,1 mM), à 25 °C a été réalisée. Ainsi, l'idée de base était de comparer le thermogramme obtenu dans ces conditions avec celui provenant de la dissociation seule du DHU dans l'eau. Cependant, les points expérimentaux ont été trouvés erratiques et ne décrivant pas la réaction de polymérisation, ni la dissociation du DHU (Figure 148). Faute de temps, ces analyses n'ont pas été poursuivies.

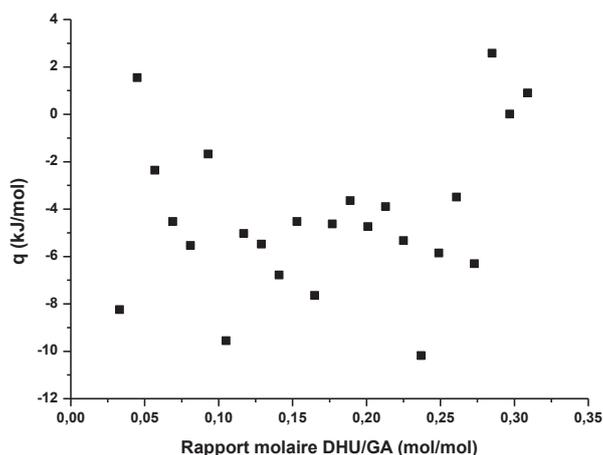


Figure 148 - Thermogramme représentant la chaleur molaire échangée en fonction du rapport molaire entre le DHU injecté (1 mM dans l'eau) et le GA dans la cellule (0,1 mM dans l'eau).

3. Détermination de la morphologie des autoassemblages de DHU

Les objets formés par le DHU ont été ensuite observés par microscopie électronique à transmission (MET), en collaboration avec Pierre Alcouffe (IE CNRS, IMP) au Centre Technique des Microstructures (CT μ , Villeurbanne). À cette fin, une solution de DHU à 10 mM a été observée au MET à température ambiante. Cette concentration a été sélectionnée car elle correspond à la plus élevée étudiée par DLS et qui montrait des objets de 100 nm. La Figure 149 montre deux clichés MET, sans contrastant, en séchant une goutte de solution à l'air libre sur un film de carbone hydrophilisé. On y distingue quelques formes sphériques, d'un diamètre proche de celui détecté par DLS (environ 100 nm).

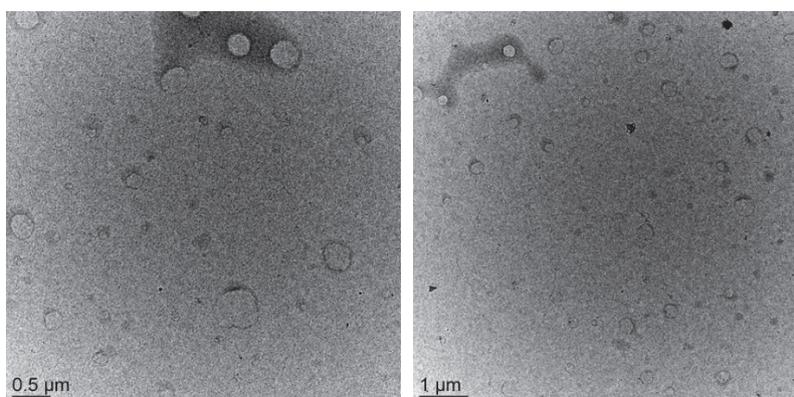


Figure 149 - Clichés MET (à 80 kV) d'une solution de DHU (10 mM), séchée sur film de carbone hydrophilisé, sans contrastant.

Afin d'augmenter le contraste entre ces objets et l'arrière-plan, un contrastant négatif au silicotungstate de sodium a été réalisé, et la Figure 150 présente trois clichés obtenus dans ces conditions. Des objets sphériques, similaires à ceux observés sans marqueur sont détectés avec plus de netteté. Il est difficile d'avancer une architecture à ces objets, qui pourrait potentiellement être des vésicules.

Par ailleurs, ces clichés présentent des artefacts entre ces objets sphériques, de plus faible taille et de formes irrégulières, qu'il est difficile d'attribuer (ils ne proviennent pas du contrastant seul). Notons que ces objets ne semblent pas avoir été observés en DLS.

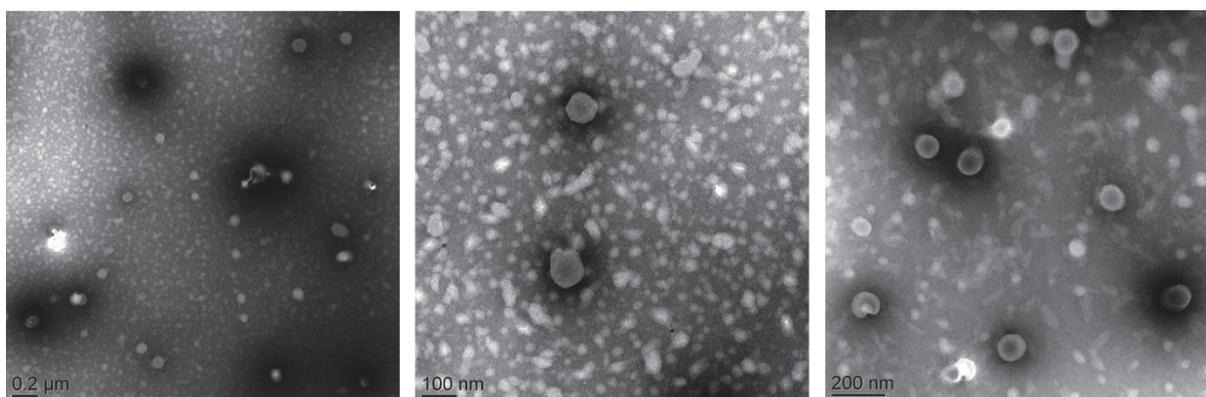


Figure 150 - Clichés MET (à 80 kV) après contraste négatif d'une solution de DHU (10 mM), séchée sur film de carbone hydrophilisé.

À partir de 159 objets observés sur une vingtaine de clichés, il a été possible d'effectuer une étude statistique de leur diamètre grâce au logiciel Image J®. La Figure 151 représente la distribution en taille de ces objets, ainsi que la loi normale associée.

Le diamètre moyen en nombre calculé est de $D_n = 85,5$ nm. Afin de comparer cette valeur à celle obtenue en DLS, qui est un diamètre moyen en z (D_z), les données acquises par Image J® ont été traitées par cette équation : $D_z \approx \Sigma D_i^6 / \Sigma D_i^5$, permise par l'approximation que les particules sont petites (diffuseurs de Rayleigh, où $\lambda > 2\pi r$). La valeur de D_z déterminée par MET est trouvée ainsi égale à 108,9 nm (Pdl de 0,17), tandis que celle mesurée pour une solution de même concentration en DHU par DLS est de 102,7 nm (Pdl de 0,21). Ces valeurs sont donc similaires.

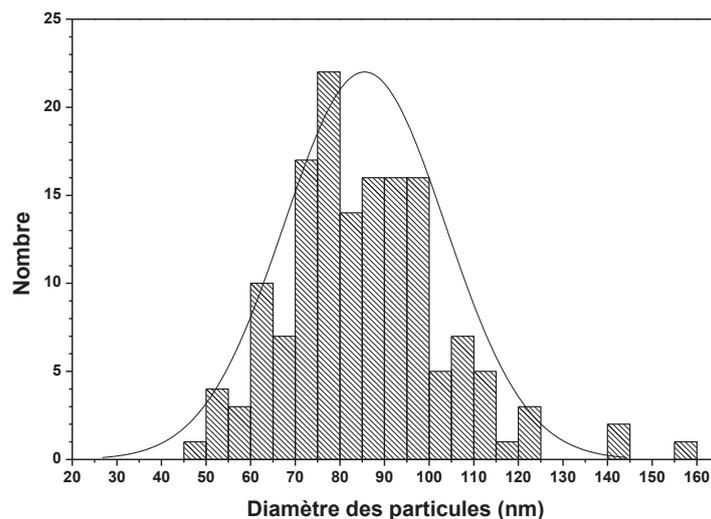


Figure 151 - Distribution des diamètres des objets selon les clichés MET (159 objets). La courbe correspond à la distribution selon une loi normale.

Afin de se rapprocher le plus possible des conditions de la suspension en objets de DHU, une observation en cryo-MET a été ensuite effectuée. En effet, la MET, qui nécessite un séchage de l'échantillon avant son observation, peut éventuellement entraîner la déstructuration des objets, contrairement à la cryo-MET qui fige l'échantillon à un état congelé. Pour cela, une goutte de solution de DHU déposée sur un film de carbone a été congelée dans de l'éthane liquide. Une première analyse, menée sur une solution de DHU de 10 mM, a donné peu de résultats satisfaisants, en effet les objets n'étaient pas identifiables sur les clichés (Figure 152A et B). La concentration a alors été augmentée à 40 mM (Figure 152C et D). Quelques objets sphériques ont ainsi pu être observés (les larges « tâches » correspondent à des trous du film de carbone). La faible concentration de ces objets dans les clichés par rapport à ceux effectués par MET classique pourrait indiquer que le processus de préparation de l'échantillon a un impact sur les auto-assemblages, par exemple en provoquant une migration de ceux-ci vers des zones où la différence de contraste est faible. Malheureusement, cette analyse par cryo-MET n'a pas apportée d'informations supplémentaires. Faute de temps, les observations par cryo-MET n'ont pas été poursuivies.

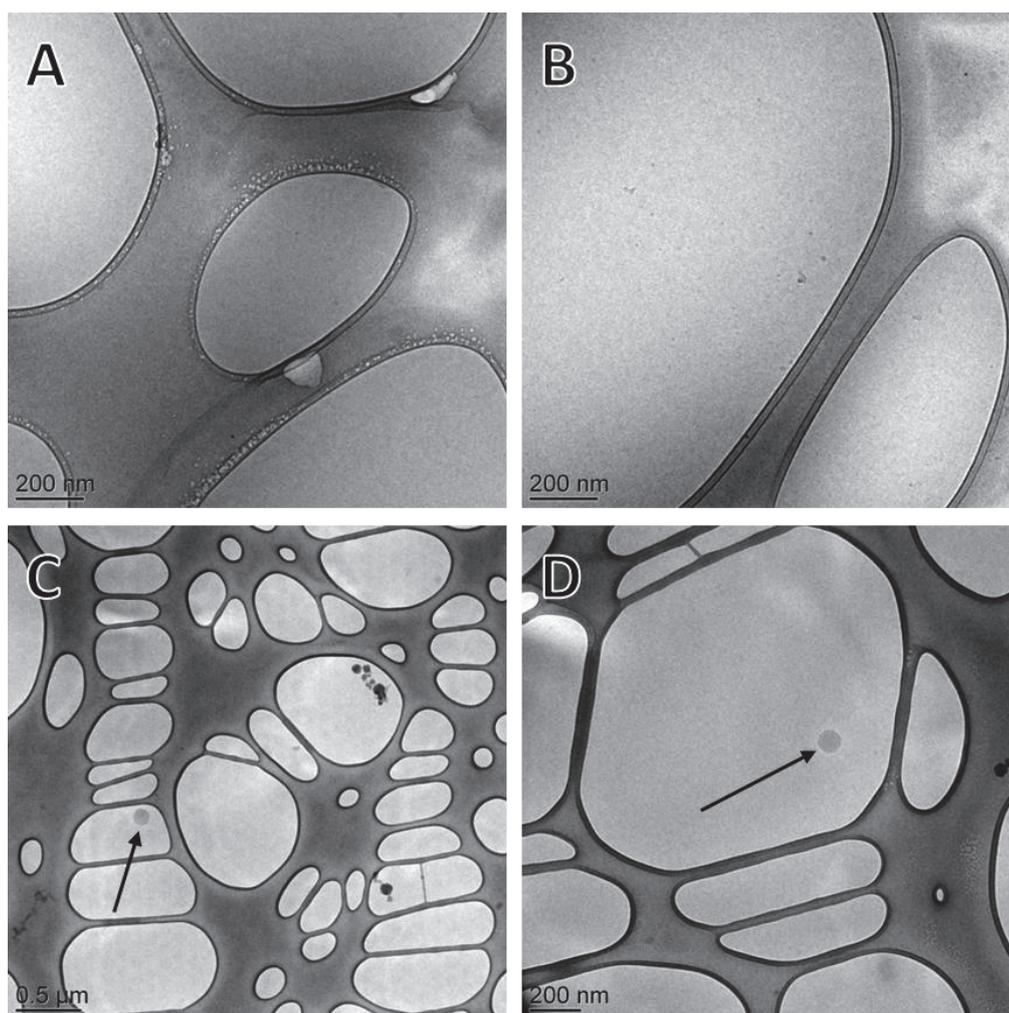


Figure 152 - Clichés en cryo-MET (120 kV) d'une solution de DHU (10 mM pour A et B ; 40 mM pour C et D). Les flèches noires montrent les objets de DHU.

4. Séparation des auto-assemblages du DHU en solution

Plusieurs analyses par SEC ont été réalisées pour séparer les auto-assemblages de DHU des monomères DHU en solution. Cependant, comme pour l'étude de la polymérisation, les chromatogrammes obtenus (par détection UV ou RI) n'ont pas été exploitables. Suite à ces analyses infructueuses, des essais ont été menés en *asymmetrical flow field flow fractionation* (AF4). Cette technique de séparation selon la taille des colloïdes est sensée diminuer les interactions de l'analyte avec la phase stationnaire qui est dans ce cas une membrane en cellulose, supposée inerte. Malheureusement, les fractogrammes obtenus n'ont présenté aucun signal en UV, RI ou MALS. Ceci pourrait être expliqué par une affinité des objets pour la membrane du canal de l'AF4, allant à l'encontre du principe de cette technique d'analyse. En effet, un test de filtration de ces objets sur des

filtres en CME (*cellulose mixed esters*) de porosité de 0,8 μm a confirmé que l'absorbance UV de la solution de DHU diminuait après sa filtration sur ce type de filtre (perte sur le filtre par adsorption).

5. Influences de l'agitation et du pH de la phase continue sur les auto-assemblages de DHU

Les techniques précédemment présentées ont permis de caractériser les objets formés dans l'eau par le DHU, mais il existe de nombreux points d'ombre quant à leur architecture et les raisons de leur formation. Dans le but de mieux les comprendre, une étude des influences de l'agitation et du pH de la phase continue sur ces objets a été réalisée grâce à ces techniques de caractérisation : DLS, zétamétrie, turbidimétrie et ITC.

a. Influence de l'agitation des suspensions de DHU

L'influence de l'agitation magnétique des suspensions des objets de DHU a été analysée en suivant le diamètre hydrodynamique moyen D_z , l'intensité diffusée (correspondant au *Mean Count Rate*, proportionnel à la concentration et au diamètre des objets à la puissance six) et le potentiel zêta, ζ . Ainsi, une suspension de 5 mM de DHU a été caractérisée au cours du temps, (i) soit dans une même cuvette de DLS analysée plusieurs fois, sans agitation, (ii) soit dans un flacon sous agitation (à 250 rpm) dans lequel un prélèvement est régulièrement effectué pour être analysé. Les mesures ont été réalisées en triplicats. La Figure 153 regroupe les résultats de ces études cinétiques.

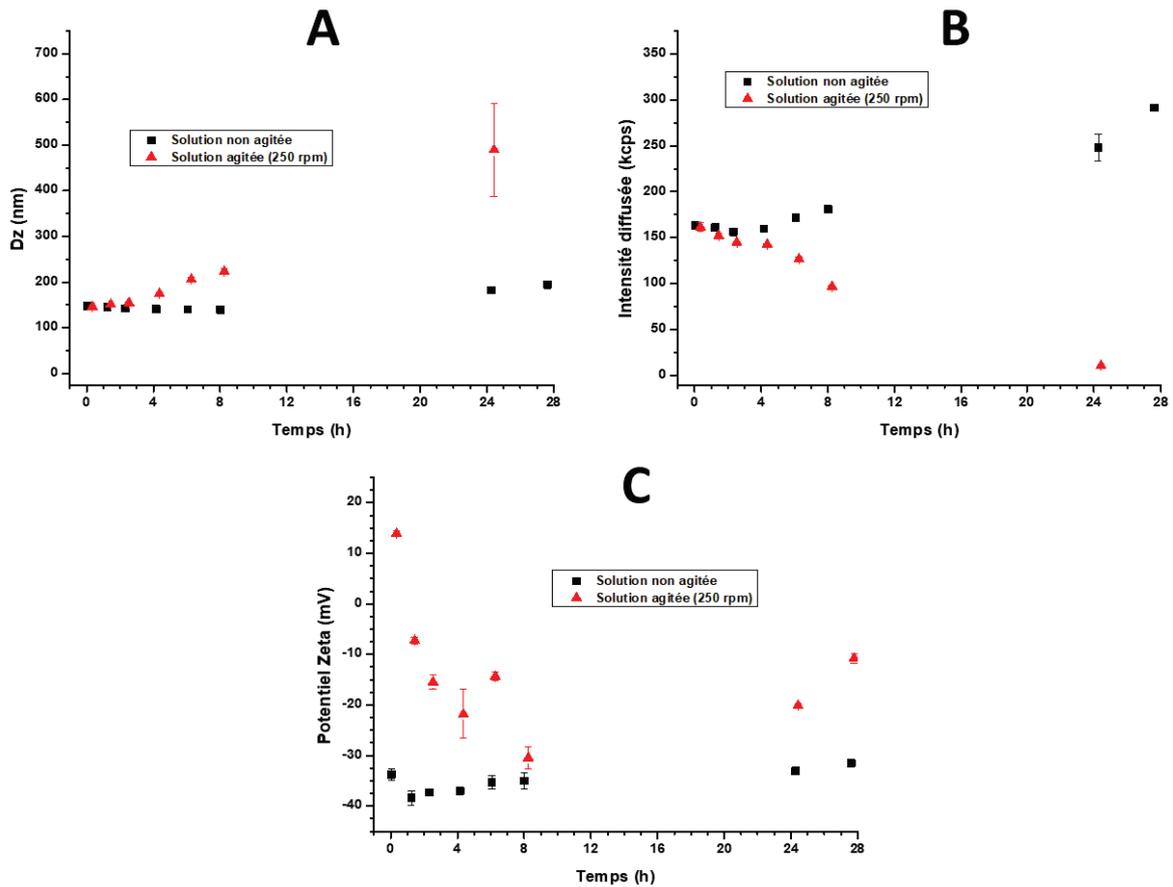


Figure 153 - Influence de l'agitation des suspensions de DHU au cours du temps sur le diamètre hydrodynamique moyen D_z (A), l'intensité diffusée (*Mean Count Rate*) (B), et le potentiel zêta ζ (C).

Cette figure révèle que, en comparaison de la solution non agitée (points noirs), l'agitation (points rouges) provoque une augmentation de la valeur de D_z , une diminution de l'intensité diffusée, ainsi qu'une variabilité importante du potentiel zêta. Une hypothèse pour expliquer ce comportement pourrait être une solubilisation des auto-assemblages (diminution de l'intensité diffusée par diminution du nombre d'objets) corrélée à la coalescence de certains objets (augmentation de la valeur de D_z). En revanche, sans agitation, on observe une légère augmentation de la valeur de D_z et une augmentation plus importante de l'intensité diffusée, ainsi qu'une valeur de potentiel zêta stable.

b. Influence du pH de la phase continue

i. Sur la taille et la charge de surface des autoassemblages

L'influence du pH de la phase continue a été évaluée sur la taille et la charge de surface des auto-assemblages. Pour cela, les suspensions ont été préparées dans différentes solutions tampons à

0,1 M, à pH = 5 (acétate), pH = 7 (phosphate) et pH = 9 (carbonate), et analysées au cours du temps dans une cuvette de DLS non agitée. La Figure 154 montre les résultats obtenus. Sa comparaison avec la Figure 153, réalisée dans l'eau, révèle que la présence de sels conduit à des auto-assemblages de taille plus grande à des temps faibles, qui se coalescent rapidement ensuite pour se solubiliser, quelle que soit la valeur de pH. En revanche, le pH a une influence sur la vitesse de solubilisation qui, comme il est possible de le voir sur la Figure 154B, augmente avec la diminution du pH. Concernant la variation du potentiel zêta ζ en fonction du temps et du pH, il est intéressant de noter qu'il est plus négatif à pH 9 qu'à pH 5 et 7.

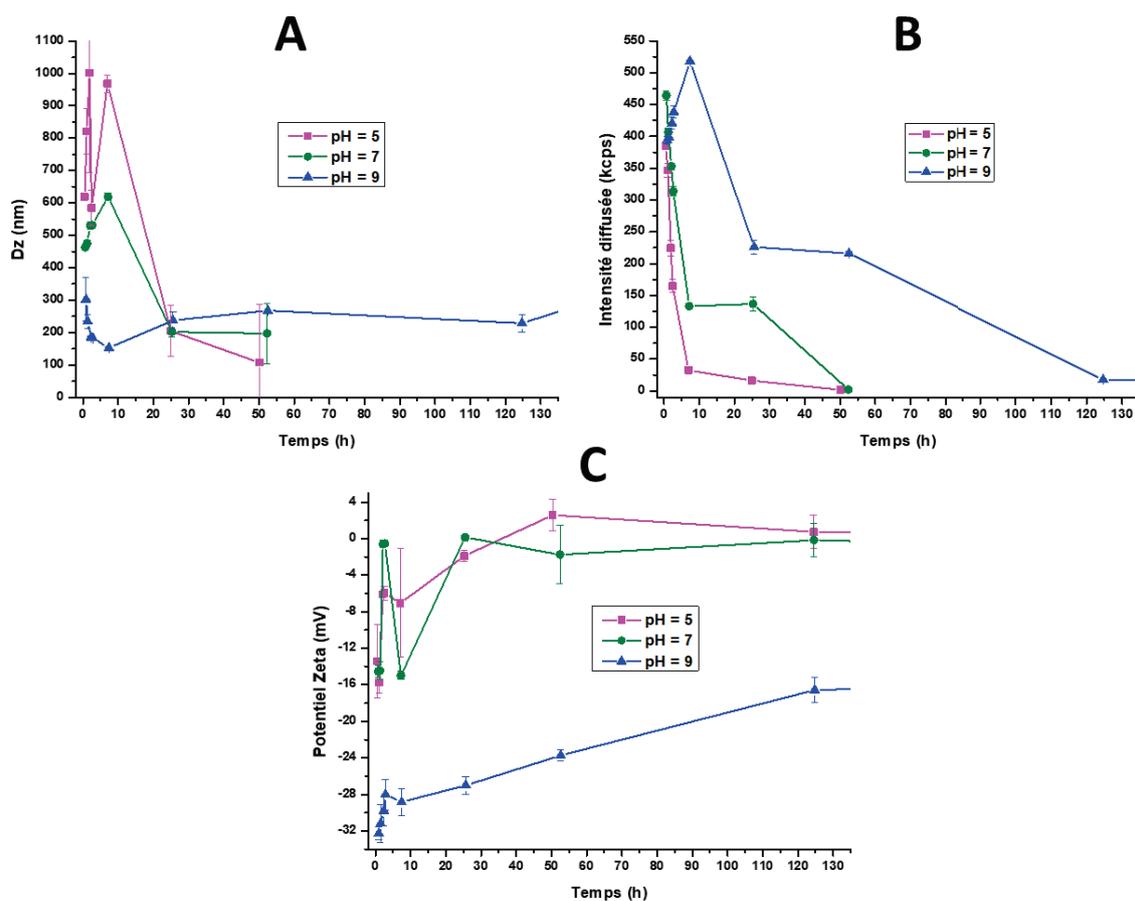


Figure 154 - Influence du pH sur (A) le diamètre hydrodynamique moyen D_z , (B) l'intensité diffusée (*Mean Count Rate*), et (C) le potentiel zêta ζ des suspensions de DHU au cours du temps dans des tampons à 0,1 M : pH = 5 (acétate), pH = 7 (phosphate) et pH = 9 (carbonate).

ii. Sur la turbidité

L'influence du pH a également été analysée par turbidimétrie, en utilisant le Turbiscan Classic MA 2000. Cette technique a l'avantage d'être plus précise et plus sensible qu'une simple inspection visuelle du caractère trouble des solutions. Ainsi, en préparant trois solutions tampons à 0,1 M (acétate à pH = 5, phosphate à pH = 7 et carbonate à pH = 9), la transmission a été observée au cours du temps,

dans un tube en verre sans agitation. Comme aucun phénomène de sédimentation n'a été détecté (la transmission est mesurée sur l'intégralité du tube vertical), les valeurs ont été moyennées afin de gommer les aspérités du verre. La Figure 155 représente donc la transmission moyenne de la solution au cours du temps, pour chaque pH.

La transmission relative diminue avec le pH, indiquant la présence d'espèces plus volumineuses. Les courbes semblent converger au cours du temps. Ces observations sont en accord avec ce qui a été observé en DLS, *i.e.* une coalescence plus importante pour des valeurs de pH faibles, et une solubilisation au cours du temps. Cependant, les échelles de temps sont ici bien plus longues pour ce phénomène, alors que les solutions tampons utilisées sont identiques, et les suspensions ne sont pas agitées dans tous les cas. Cette différence de vitesse de coalescence et de solubilisation reste inexpliquée pour l'instant.

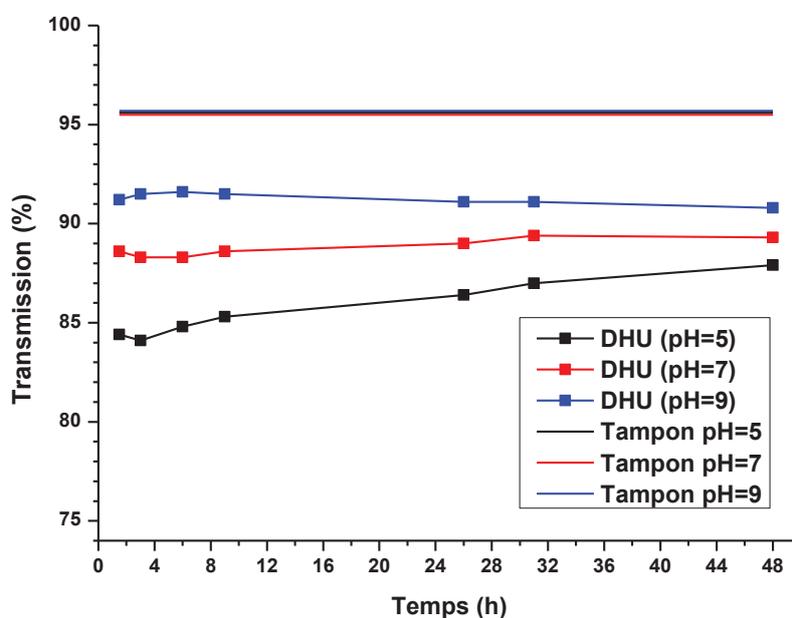


Figure 155 - Transmission de solutions de DHU en fonction du temps (5 mM, tampons 0,1 M, acétate pH=5, phosphate pH=7, carbonate pH=9). Les valeurs sont obtenues avec le Turbiscan Classic MA 2000, et moyennées sur l'ensemble du tube vertical contenant la solution.

iii. Sur l'auto-association par ITC

À la suite de ces expériences montrant l'influence du pH sur les auto-assemblages, il a été décidé de compléter ces analyses avec l'ITC, en reprenant le même protocole que celui utilisé pour déterminer les paramètres thermodynamiques des objets formés par le DHU dans l'eau. Ainsi, une suspension de 5 mM de DHU dans l'eau permutée a été injectée dans la cellule de mesure contenant 1% (v/v) d'acide acétique glacial dans l'eau, soit un pH \approx 3 (à 25°C, avec un volume d'injection de 1,14

μL). La chaleur échangée en fonction de la concentration du DHU dans la cellule est présentée en Figure 156. Contrairement à ce qui avait été observé dans l'eau pure, il n'a pas été possible de modéliser ces points en sigmoïde pour en tirer des paramètres thermodynamiques. Plusieurs phénomènes semblent se dérouler simultanément, à savoir la destruction de l'auto-association du DHU et la chaleur de dilution. Il n'est en revanche pas possible de les distinguer, tant les points expérimentaux semblent erratiques. La comparaison avec un blanc, *i.e.* l'injection d'eau permutée dans une cellule contenant l'acide acétique, a montré des points tout autant erratiques. Il n'est donc pas possible, en l'état actuel des choses, d'appréhender l'effet du pH sur les auto-assemblages par ITC.

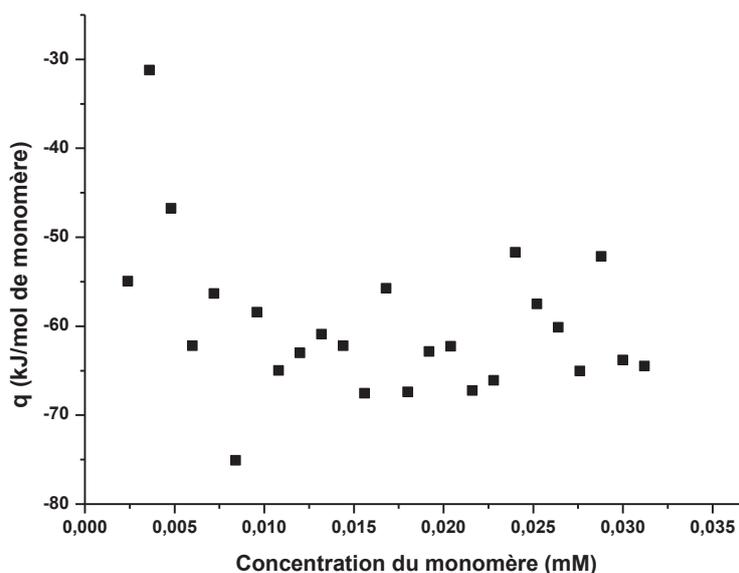


Figure 156 - Thermogramme représentant la chaleur molaire échangée en fonction de la concentration du DHU, après injection d'une solution de DHU (1 mM dans l'eau) dans une solution d'acide acétique (1 % v/v dans l'eau, pH \approx 3).

6. Conclusion

En conclusion de cette partie consacrée à la caractérisation des auto-assemblages du DHU, il a été montré que ceux-ci étaient sphériques et de diamètre d'environ 100 nm. Leur architecture a été difficilement déterminée. La concentration d'auto-association critique a été mesurée à 0,014 mM. Enfin, des constantes thermodynamiques (ΔH_{agg} , ΔG_{agg} et ΔS_{agg}) ont été calculées à 25°C. La charge de surface de ces objets a été étonnamment déterminée à -34 mV (au vu de la structure chimique du DHU).

Afin de mieux comprendre la physico-chimie de ces auto-assemblages, leur évolution au cours du temps a été évaluée en fonction de l'agitation et du pH. Il en ressort que l'agitation de la suspension mène à une solubilisation des auto-assemblages, ainsi qu'à un phénomène de coalescence. De même,

la présence de sels dans la phase continue et une valeur de pH plus faible mènent aux mêmes comportements. Le potentiel zêta semble également sensible à l'agitation et au pH du milieu.

Dans le but d'expliquer le comportement amphiphile du DHU et la valeur négative de la charge de surface de ses auto-assemblages, une analyse d'une potentielle hydrolyse (au moins partielle) des dihydrazides, avec l'apparition de fonctions acide carboxylique, a été effectuée.

IV. Analyse de l'hydrolyse du DHU

Une hydrolyse a déjà été démontrée pour le DHI, le dihydrazide utilisé pour former les polymères d'intérêt « Lehn » (Chapitre III). Ainsi, elle pourrait également intervenir avec le DHU. Pour l'identifier, des analyses en spectrométrie de masse MALDI-TOF et en LC-MS ont été réalisées et vont être présentées dans les paragraphes suivants. La Figure 157 révèle des espèces provenant de l'addition d'une fonction hydrazide sur une autre (réaction intramoléculaire) accompagnée d'une élimination de $\text{NH}_2\text{-NH}_2$, puis de l'hydrolyse de cette fonction par addition d'eau, menant à un DHU semi-hydrolysé et à la présence d'une fonction acide carboxylique en extrémité.

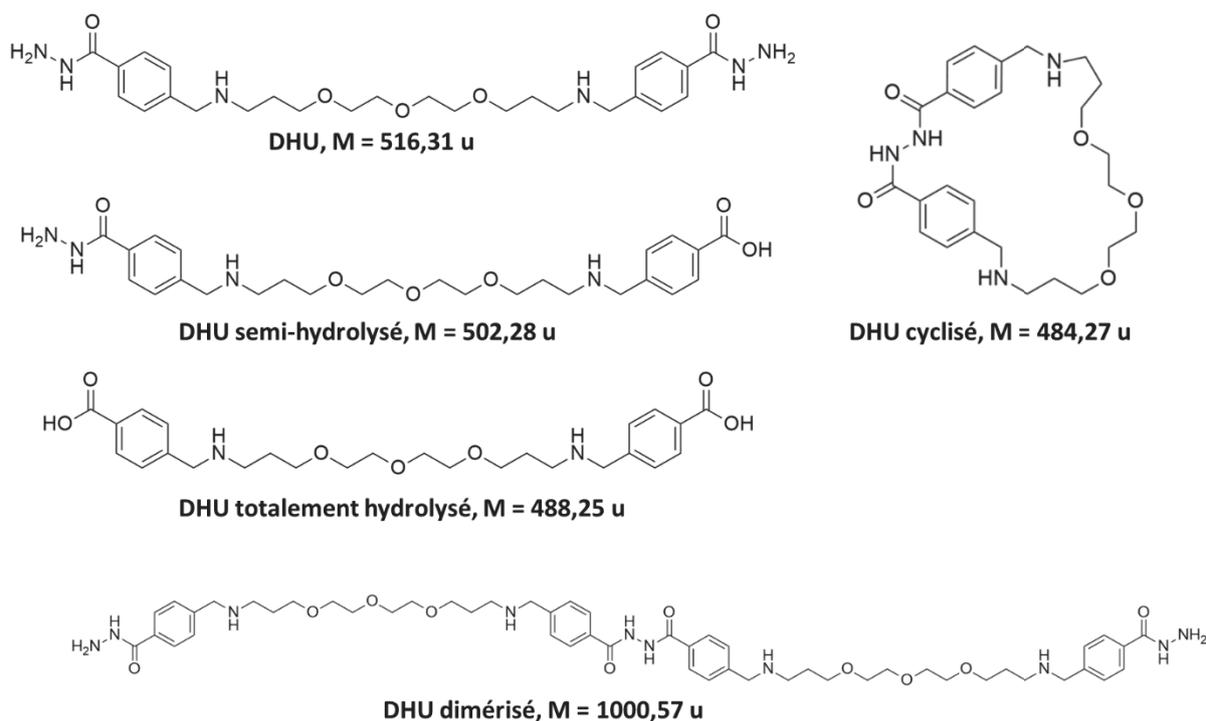


Figure 157 - Structures chimiques du DHU, de sa forme semi-hydrolysée, de sa forme totalement hydrolysée, ainsi que de ses formes intermédiaires cyclisées et dimérisées, avec leurs masses monoisotopiques correspondantes.

1. Par spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'analyse d'une solution de DHU à 1 mM par spectrométrie de masse MALDI-TOF a permis de mettre en évidence certains des composés précédemment présentés, issus de l'hydrolyse du DHU (Figure 158). En effet, ces espèces sont observées à 503,4 uma pour le DHU semi-hydrolysé, et à 489,4 uma pour le DHU totalement hydrolysé.

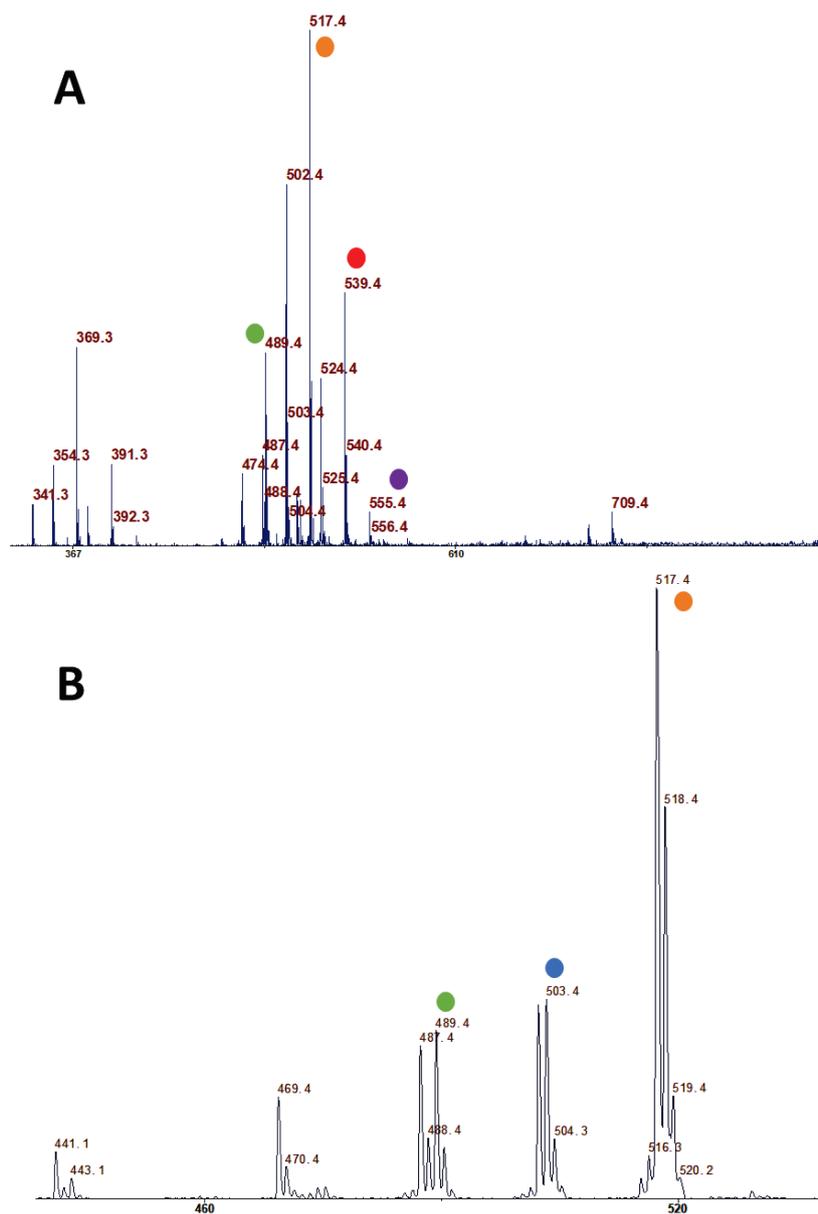


Figure 158 - Agrandissements de spectres de masse positif MALDI-TOF de solutions de DHU (1 mM) avec une matrice DHB (**A**) et CHCA (**B**). Les cercles de couleur sont attribués de la manière suivante : **oranges** : $[\text{DHU} + \text{H}]^+$, **rouges** : $[\text{DHU} + \text{Na}]^+$, **violet** : $[\text{DHU} + \text{K}]^+$, **bleus** : $[\text{DHU semi-hydrolysé} + \text{H}]^+$, **verts** : $[\text{DHU totalement hydrolysé} + \text{H}]^+$.

Il est donc possible de repérer le DHU semi-hydrolysé et le DHU totalement hydrolysé correspondant à des espèces comportant une ou des fonction(s) d'acide carboxylique et expliquant ainsi la charge surfacique négative des auto-assemblages mesurée par zétamétrie ($\zeta < 0$). Il est cependant difficile de savoir si ces composés sont présents dès le début de la solubilisation, étant donné qu'une étude cinétique quantitative est difficilement réalisable par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

2. Par LC-MS

Afin de réaliser des analyses quantitatives de ces espèces hydrolysées, une étude par LC-MS a été effectuée en collaboration avec Élodie Fromentin (CCSM, Villeurbanne). Pour cela, une optimisation de la séparation du DHU par HPLC a été réalisée dans un premier temps au laboratoire IMP, en testant de nombreuses colonnes et conditions expérimentales. La colonne HPLC optimale a trouvée être la colonne HPLC 5 (WATERS Atlantis Premier, cf Chapitre V), qui est commercialisée pour séparer les tensioactifs. Quant à l'élution optimale, elle s'est révélée être un gradient eau/acétonitrile (cf Chapitre V). La Chaîne B du laboratoire IMP a été employée pour ce travail. Cependant, lors du transfert de cette méthode (avec la même colonne, le même gradient d'éluant, la même température et le même échantillon), la reproductibilité du chromatogramme n'a pas été obtenue au laboratoire du CCSM (Figure 159) pour une raison encore inconnue.

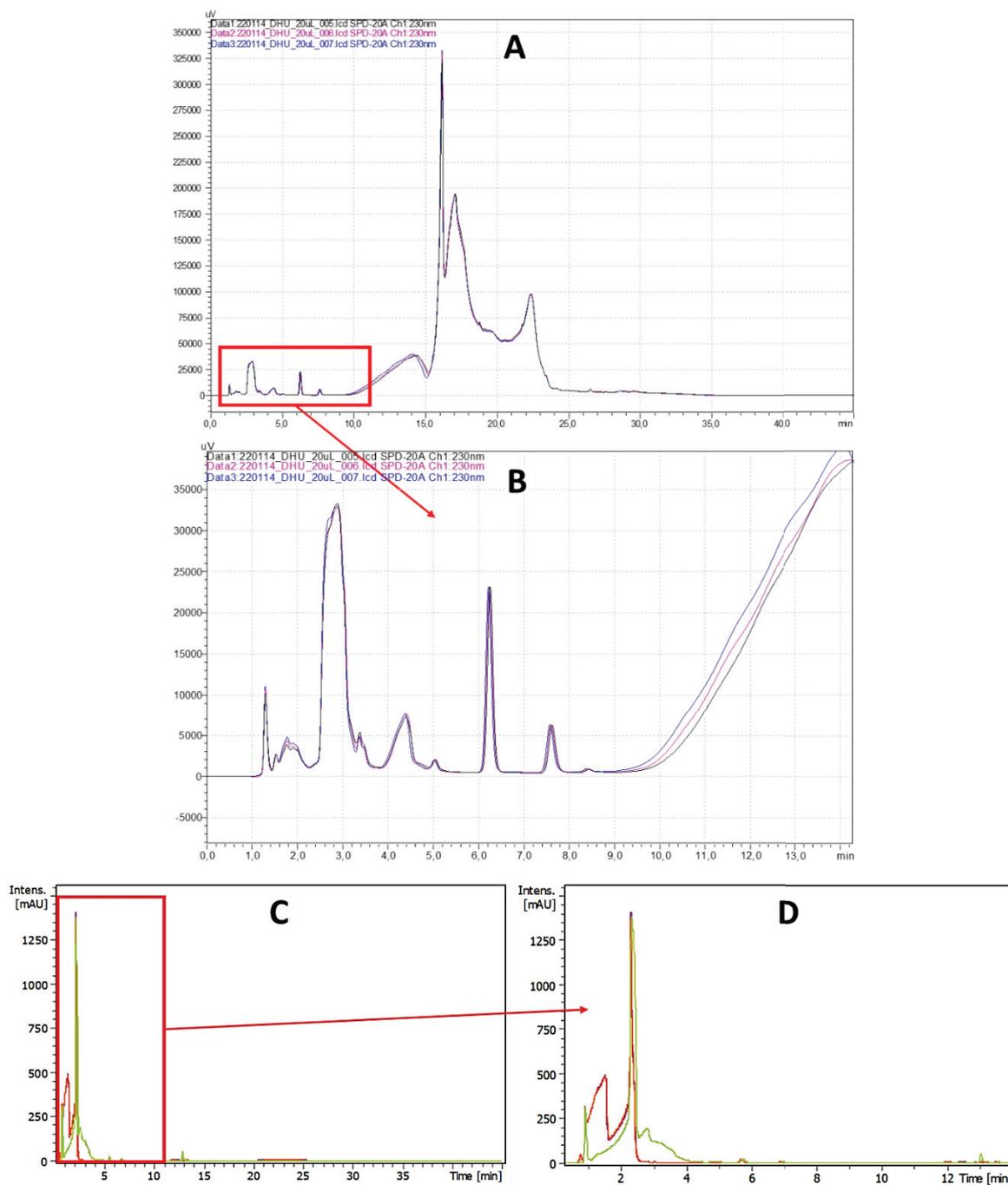


Figure 159 - Différences des chromatogrammes obtenus entre l'IMP et le CCSM pour la séparation des composés d'une solution de DHU, en utilisant les mêmes conditions d'éluion (DHU 5 mM, Colonne HPLC 5, températures, éluants, gradients d'éluion, détection UV 230 nm).
A et B : Laboratoire IMP avec la Chaîne B ; **C et D** : au CCSM.

Néanmoins, même s'il n'a pas été possible d'obtenir des chromatogrammes répétables entre les deux laboratoires, la détection en spectrométrie de masse a permis d'obtenir des spectres de masse des différents pics. Ceux-ci ont présenté un nombre plus faible d'espèces que celui obtenu en spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le spectre de masse présenté en Figure 160A correspond à un pic à un temps de rétention de 1,3 min, et montre l'existence de deux ions, l'un à 259 m/z et l'autre à

517 m/z. Trois hypothèses sont alors possibles : i) soit m/z 259 est $[M+H]^+$ et m/z 517 est $[2M+H]^+$, ii) soit m/z 259 est un ion fragment obtenu en source d'ion m/z 517, iii) soit il y a coélution de ces deux espèces. Notons qu'un spectre MS/MS de l'ion à 517 m/z a été réalisé (Figure 160B) et révèle que le pic à m/z 259 n'est pas observé, ce qui élimine l'hypothèse de l'ion fragment (en général, les adduits $[2M+H]^+$ fragmentent en $[M+H]^+$)²²⁵. Ainsi, il est plus probable que le pic à 259,16 m/z corresponde à une espèce secondaire, issue de l'ionisation ou existant en solution, et que le pic à 517,31 m/z soit bien attribué au $[DHU+H]^+$. Ce raisonnement a été appliqué à différents spectres de masse obtenus à différents temps de rétention, et l'existence du DHU, du DHU semi-hydrolysé, et de l'intermédiaire cyclisé du DHU, a été mise en évidence et confirmée avec certitude.

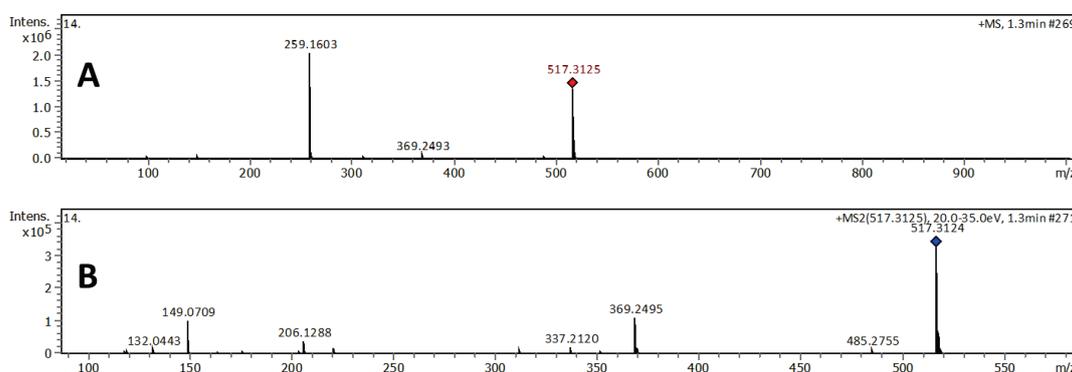


Figure 160 - (A) Spectre de masse correspondant à un temps de rétention de 1,3 min.
(B) Fragmentation MS-MS du pic à 517,312 m/z.

3. Conclusion

La mise en évidence des composés issus de l'hydrolyse du DHU permet de faire un parallèle avec ceux issus de l'hydrolyse du DHI, et étudiés en Chapitre III. En effet la réaction d'hydrolyse semble être la même, à savoir : une hydrolyse de la fonction hydrazide impliquant une auto-cyclisation, et conduisant à un dihydrazide semi-hydrolysé. Dans le cas du DHU, il n'a cependant pas été possible de repérer un dimère, qui est l'autre forme intermédiaire provenant de l'addition d'un dihydrazide sur un autre, et observée pour le DHI en Chapitre III. Cependant, la présence d'un DHU hydrolysé aux deux extrémités, espèce non atteignable avec seulement un mécanisme d'auto-cyclisation, est une preuve indirecte que ce second mécanisme est ici également possible.

Cette hydrolyse du monomère DHU permet d'expliquer la valeur négative du potentiel zêta obtenu pour les auto-assemblages (*via* l'apparition de fonctions acide carboxylique anioniques). L'influence du pH de la phase continue sur la stabilité des objets pourrait ainsi provenir de réactions acido-basiques se déroulant sur ces fonctions terminales, qui déstabiliseraient les auto-assemblages (leur potentiel zêta devient nul après quelques minutes à des valeurs de pH acides).

V. Conclusions sur la caractérisation du dihydrazide d'intérêt auto-associatif

En conclusion de ce chapitre IV consacré à l'étude du DHU en milieu aqueux, de nombreux résultats inattendus ont été mis en évidence. Ce dihydrazide avait comme premier objectif de pouvoir former des PACh par polycondensation avec le dialdéhyde GA plus solubles dans l'eau que ceux formés uniquement avec des monomères « modèles ».

L'existence d'oligomères DHU/GA a bien été démontrée, notamment par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Néanmoins, la concentration limite en monomères sans précipitation a été déterminée comme plus faible que celle obtenue avec les monomères « modèles ». Les difficultés à analyser le DHU par HPLC et SEC, des variations inexplicables de l'absorbance UV au cours du temps de la solution de DHU, et le moussage de la solution après agitation nous ont amené à penser que des auto-assemblages de DHU se formaient dans l'eau.

La seconde partie de ce chapitre a donc été la caractérisation de ces objets, où la taille, la distribution en taille, le potentiel zêta, la morphologie, ainsi que les paramètres thermodynamiques d'agrégation (CAC, enthalpie, enthalpie libre et entropie) ont été déterminés. Ainsi, il a été montré que ces objets étaient sphériques, d'un diamètre d'environ 100 nm (déterminé conjointement par DLS et microscopie électronique), et d'une distribution en taille relativement resserrée. Il a été également mis en évidence que le pH, le temps et l'agitation exerçaient une influence sur ces paramètres. Une hypothèse pouvant expliquer ce phénomène serait une coalescence des objets accompagnée de la solubilisation de certains, accélérée par un pH plus faible, l'augmentation de la force ionique, ou encore l'agitation. Étonnamment, la charge surfacique de ces objets a été mesurée négative, alors que le DHU ne possède pas de fonctions anioniques. Une hydrolyse de ce dihydrazide a permis d'interpréter ce comportement (à l'instar de ce qui a été prouvé pour le dihydrazide DHI dans le chapitre précédent). Des composés anioniques, issus de cette hydrolyse, ont effectivement été mis en évidence par spectrométrie de masse.

Cependant, de nombreux points restent encore inexplicables, notamment l'architecture de ces auto-assemblages. Leur taille, leur sphéricité, et leur distribution en taille relativement resserrée, pourraient laisser à penser qu'il s'agisse de vésicules. Des analyses par diffusion des neutrons de ces auto-assemblages permettraient d'aider à l'identification de leur architecture (en utilisant, par exemple, un modèle mathématique de « coquille creuse » vésiculaire).

Chapitre V :

Partie Expérimentale

Sommaire du chapitre

I. SYNTHÈSE DES POLYACYLHYDRAZONES.....	218
1. <i>A partir des monomères « modèles »</i>	218
a. Choix des monomères « modèles »	218
b. Protocole de synthèse.....	219
2. <i>A partir des monomères d'intérêt</i>	220
a. Synthèse des monomères (par le laboratoire ICBMS, UCBL)	220
b. Synthèse des polymères.....	223
II. CARACTERISATION DES MONOMERES ET DES POLYMERES	225
1. <i>Évaluation de la solubilité</i>	225
a. Aspect visuel	225
b. Turbidimétrie	225
2. <i>Caractérisation par chromatographie</i>	225
a. Chaînes chromatographiques	226
b. Colonnes.....	227
c. Phases mobiles (ou éluants).....	227
3. <i>Caractérisation par spectrométrie de masse</i>	229
a. Spectrométrie de masse MALDI-TOF (<i>matrix assisted laser desorption ionization - time of flight</i>).....	229
b. Spectrométrie de masse ESI-TOF (<i>electrospray ionization - time of flight</i>).....	229
c. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)	229
4. <i>Caractérisation par résonance magnétique nucléaire (RMN)</i>	230
5. <i>Caractérisation par spectroscopie UV-Visible et infra-rouge</i>	231
a. Spectroscopie UV-Visible	231
b. Spectroscopie infrarouge	231
III. CARACTERISATION DE L'AUTO-ASSOCIATION DE MONOMERES	232
1. <i>Caractérisation par titration calorimétrique isotherme (ITC)</i>	232
a. Protocole d'utilisation	232
b. Méthodologie de traitement des données	233
i. Création du graphe $\Delta H = f(C)$	233
ii. Détermination de la CAC	234
iii. Détermination de ΔH_{agg}	234
iv. Détermination de ΔG_{agg}	235
v. Détermination de ΔS_{agg}	236
2. <i>Caractérisation par diffusion de la lumière et zétamétrie</i>	236
a. Détermination de tailles et de distributions de taille.....	236
b. Détermination du potentiel Zêta (ζ).....	236
c. Études cinétiques	237
3. <i>Caractérisation par microscopie électronique à transmission (MET)</i>	237
a. Microscopie électronique à transmission (MET).....	237
b. Cryo-MET.....	237
4. <i>Caractérisation par asymmetric flow field-flow fractionation (AF4)</i>	238
a. Principe	238
b. Conditions expérimentales	239

I. Synthèse des polyacylhydrazones

Les monomères utilisés dans la synthèse des PAcH sont des dialdéhydes et des dihydrazides. Dans un premier temps, des monomères commerciaux « modèles » ont été employés afin d'optimiser la synthèse de PAcH, ainsi que la caractérisation de ces monomères et des polymères obtenus. Dans un second temps, les monomères synthétisés par Fanny Demontrond, de l'ICBMS, ont été utilisés. Le protocole de polymérisation à partir de ces derniers diffère de celui des monomères « modèles », car la fonction aldéhyde des dialdéhydes fournis est protégée par acétalisation. Une étape supplémentaire de déprotection a donc été nécessaire.

1. A partir des monomères « modèles »

a. Choix des monomères « modèles »

La structure simple des monomères dits « modèles » a été choisie pour faciliter leur caractérisation et pour leur caractère hydrosoluble. Un seul dihydrazide « modèle » a été utilisé : le dihydrazide succinique, abrégé DHS (Figure 161A). Concernant les dialdéhydes, trois composés ont été sélectionnés : le glutaraldéhyde (GA, Figure 161B), le téréphthalaldéhyde (TPA, Figure 161C), et le 2,3-thiophénecarboxaldéhyde (TDC, Figure 161D). Toutes ces molécules ont été achetées chez Sigma-Aldrich. Le DHS, le TPA, et le TDC sont disponibles sous forme de poudres, et ont été utilisés sans purification supplémentaire. Quant au GA, il a été acheté sous forme de solution aqueuse à 25% et 70% massique (seules alternatives commercialement disponibles). La plupart des synthèses ayant lieu dans l'eau, l'élimination de l'eau de cette solution de GA n'a pas été jugée nécessaire. L'eau supplémentaire, ajoutée par la solution de GA, a été prise en compte pour le calcul des concentrations finales en GA.

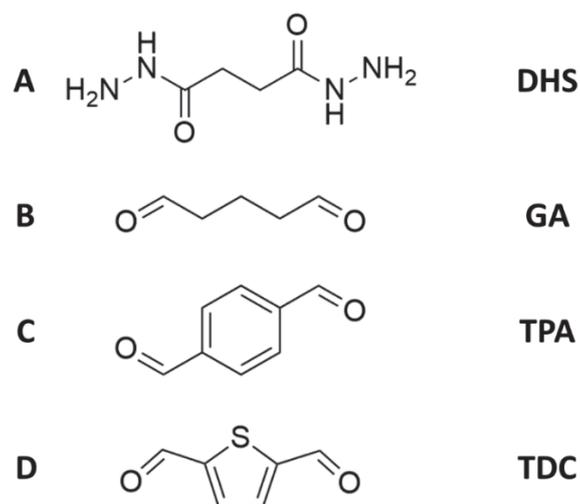


Figure 161 - Structures chimiques des monomères « modèles » utilisés pour la synthèse de PACH, et leur abréviation respective. **A)** Dihydrazide succinique - DHS. **B)** Glutaraldéhyde - GA. **C)** Téréphthalaldéhyde - TPA. **D)** 2,3-thiophènedicarboxaldéhyde - TDC.

b. Protocole de synthèse

La réaction de polymérisation à partir des monomères « modèles » a été réalisée en mélangeant des volumes identiques de deux solutions de même concentration molaire du dialdéhyde et du dihydrazide (d'une concentration maximale de 1 mg.mL^{-1}), afin d'avoir un mélange équimolaire. Le choix des concentrations finales dépend des limites de solubilité de chacun des monomères. Cette solubilité finale a été évaluée par des tests visuels et de turbidimétrie. La réaction entre le monomère dihydrazide et les dialdéhydes a été effectuée pendant 12h (sauf cas contraire précisé), à température ambiante (sauf cas contraire précisé) et sous agitation magnétique.

Le choix du solvant de synthèse a été fait en fonction de la solubilité des monomères utilisés. Pour la très grande majorité des expériences réalisées, il s'agit d'eau permutée, avec éventuellement un ajout d'acide (AcOH glacial, HCl 37 % ou TFA), pour catalyser la réaction. La quantité d'acide ajoutée est décrite pour chaque expérience, au cas par cas. Des réactions dans le DMSO ont également été effectuées, ce solvant permettant d'atteindre une concentration finale plus élevée (pour les analyses en RMN notamment), avec éventuellement un ajout d'acide pour catalyser. Les différentes combinaisons de monomères « modèles » mises en œuvre sont décrites sur la Figure 162.

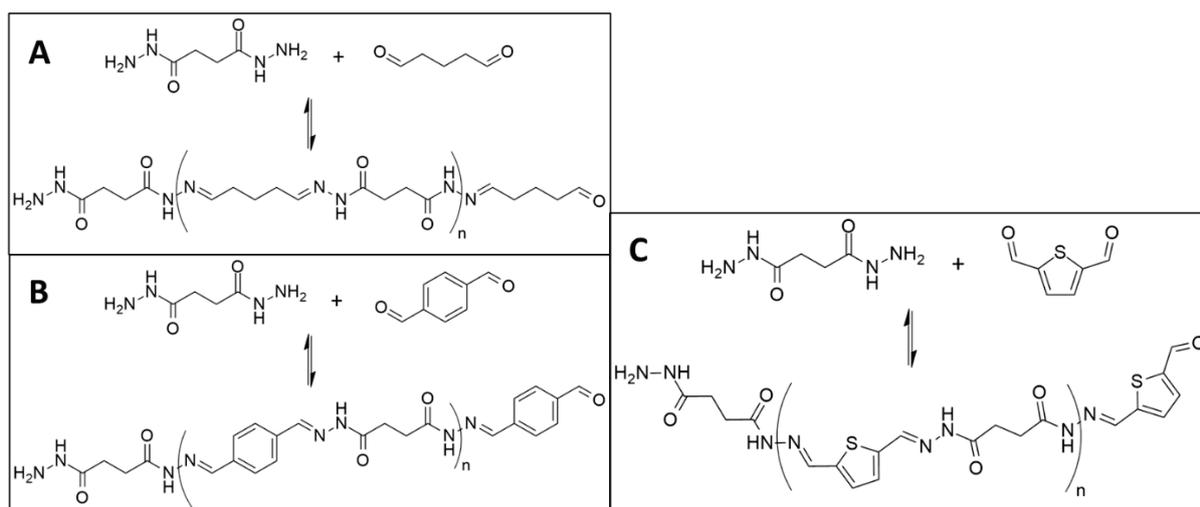


Figure 162 - Différentes polymérisations étudiées dans ce travail, à partir de **(A)** DHS et de GA, **(B)** DHS et de TPA, **(C)** DHS et de TDC.

2. A partir des monomères d'intérêt

a. Synthèse des monomères (par le laboratoire ICBMS, UCBL)

La deuxième génération de PACH a été conçue à partir de monomères synthétisés par Fanny Demontrond durant sa thèse à l'ICBMS (UCBL). Le cahier des charges établi pour ces monomères était i) que leur hydrosolubilité (intrinsèque et lors de la réaction) soit supérieure à celle des monomères « modèles » commerciaux, ii) qu'ils soient relativement faciles à synthétiser et à caractériser, iii) et si possible, qu'ils présentent des « bras espaceurs », entre les fonctions réactives, de longueur variable afin d'analyser l'influence de ce paramètre sur la polymérisation.

Dans un premier temps, un dihydrazide issu des travaux de Camille Bouillon et Sébastien Ulrich¹⁸² a été sélectionné (Figure 163A). Il a été nommé DHU en référence à Sébastien Ulrich (Dihydrazide « Ulrich »). Le principal avantage de ce monomère est sa chaîne de poly(éthylène glycol) centrale, peut éventuellement être modulée à des longueurs variables, sans modification drastique de sa synthèse. Malheureusement, les résultats de polymérisation et de solubilité obtenus à partir de ce DHU n'ont pas été concluants car moins performants en termes de solubilité que les polymères issus des monomères « modèles ». Par conséquent, une autre série de monomères a été fournie par l'ICBMS, basée cette fois-ci sur les travaux de Sophie Lohmann réalisés durant sa thèse encadrée par Jean-Marie Lehn.²¹³ Ces derniers ont ainsi été nommés monomères « Lehn ». Le dihydrazide DHI (pour dihydrazide « iminodiacétate », Figure 163B) [2,2'-(methylazanediyl)di(acetohydrazide)] a été synthétisé. Concernant les dialdéhydes, le DAI (pour dialdéhyde « iminodiacétamide », Figure 163C)

[2,2'-(methylazanediy)l]bis(N-(2-oxoethyl)acetamide)], le DAG (pour dialdéhyde « glucarate », Figure 163D) [(2R,3S,4R,5S)-2,3,4,5-tetrahydroxy-N¹,N⁶-bis(2-oxoethyl)hexanediamide], et le DAP (pour Dialdéhyde « Piperazine », Figure 163E) [2,2'-(piperazine-1,4-diyl)diacetaldehyde], ont été synthétisés sous leur forme acétalisée afin de protéger les fonctions aldéhydes durant leur stockage dans le temps. Un autre dihydrazide a également été testé (DHG, Figure 164C, molécule 4) mais il s'est avéré insoluble dans l'eau et n'a jamais été employé en tant que monomère pour former un PACH.

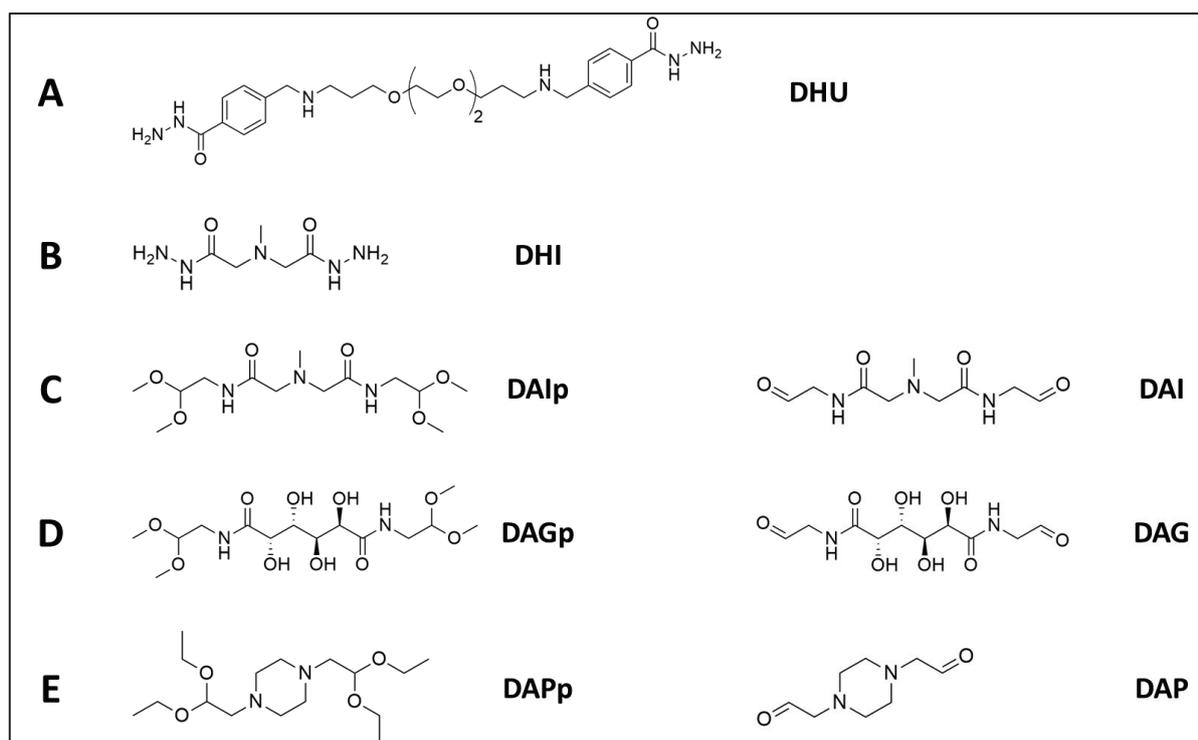


Figure 163 - Structure chimique des monomères d'intérêt pour le projet DynaSWEET. **A)** Dihydrazide « Ulrich » - DHU. **B) à E)** Monomères « Lehn » : **B)** Dihydrazide « Iminodiacétate » - DHI. **C)** Dialdéhyde « Iminodiacétate » - DAIp si protégé, DAI si déprotégé. **D)** Dialdéhyde « Glucarate » - DAGp si protégé, DAG si déprotégé. **E)** Dialdéhyde « Piperazine » - DAPp si protégé, DAP si déprotégé.

La synthèse de l'ensemble des monomères d'intérêt est brièvement présentée dans la Figure 164 ci-dessous.

b. Synthèse des polymères

Le protocole de polymérisation à partir des monomères « Lehn » est similaire à celui des monomères « modèles », à ceci près qu'une étape de déprotection des dialdéhydes protégés par acétalisation est préalablement nécessaire. Une étude de cette étape de déprotection a montré qu'un temps de réaction de 12h suffisait pour former les espèces déprotégées. Les concentrations utilisées pour les solutions de monomères vont d'une gamme de 1 mM à 100 mM, dépendant de la technique de caractérisation utilisée pour suivre la polymérisation. Trois protocoles, tous à température ambiante, ont ainsi été testés :

1. Déprotection du dialdéhyde par ajout de 1 v% HCl (37%) durant 12h et sous agitation magnétique, puis mélange avec une solution de dihydrazide de concentration identique. La réaction est ensuite réalisée pour une durée spécifique (dépendant de la technique d'analyse, entre quelques minutes et quelques jours) sous agitation magnétique. Notons que l'ajout de cet acide permet également de se placer dans des conditions de catalyse de la formation de la liaison acylhydrazone.
2. Dissolution du dialdéhyde protégé et du dihydrazide en quantité équimolaire dans la même solution, puis ajout immédiat de 0,5 v% HCl (37%). Le mélange est ensuite laissé durant 12h sous agitation magnétique. Dans ce protocole, le dialdéhyde est déprotégé *in situ* et peut ainsi directement réagir avec les fonctions hydrazide, réaction également catalysée par l'acide.
3. Déprotection du dialdéhyde par ajout de 1 v% HCl (37%) durant 12h et sous agitation magnétique, puis neutralisation de la solution à l'aide de triéthylamine. La réaction est ensuite lancée en mélangeant la solution de dialdéhyde déprotégée et une solution de dihydrazide, dans des concentrations égales. Elle a été éventuellement ensuite catalysée par ajout de 0,5 v% HCl (37%) ou de 0,5 v% AcOH glacial.

Notons également le cas particulier du DHU, qui a été fourni par l'ICBMS avant les monomères « Lehn ». Ainsi, il a été polymérisé avec un dialdéhyde « modèle », le GA, en suivant le protocole utilisé pour la synthèse avec le couple DHS/GA du projet.

Les produits chimiques utilisés pour catalyser la réaction et/ou modifier le pH du milieu, *i.e.* l'acide chlorhydrique (HCl 37%), l'acide acétique glacial (AcOH), l'acide trifluoroacétique (TFA), la triéthylamine (NEt₃), l'hydroxyde de sodium en pastilles (NaOH) et le 4-amino-L-phenylalanine (4a-Phe), proviennent de chez Sigma-Aldrich ou de Carlo Erba. Les produits sont utilisés sans purification supplémentaire.

Les différentes combinaisons de monomères d'intérêt du projet DynaSWEET examinées durant cette thèse sont décrites dans la Figure 165 ci-dessous.

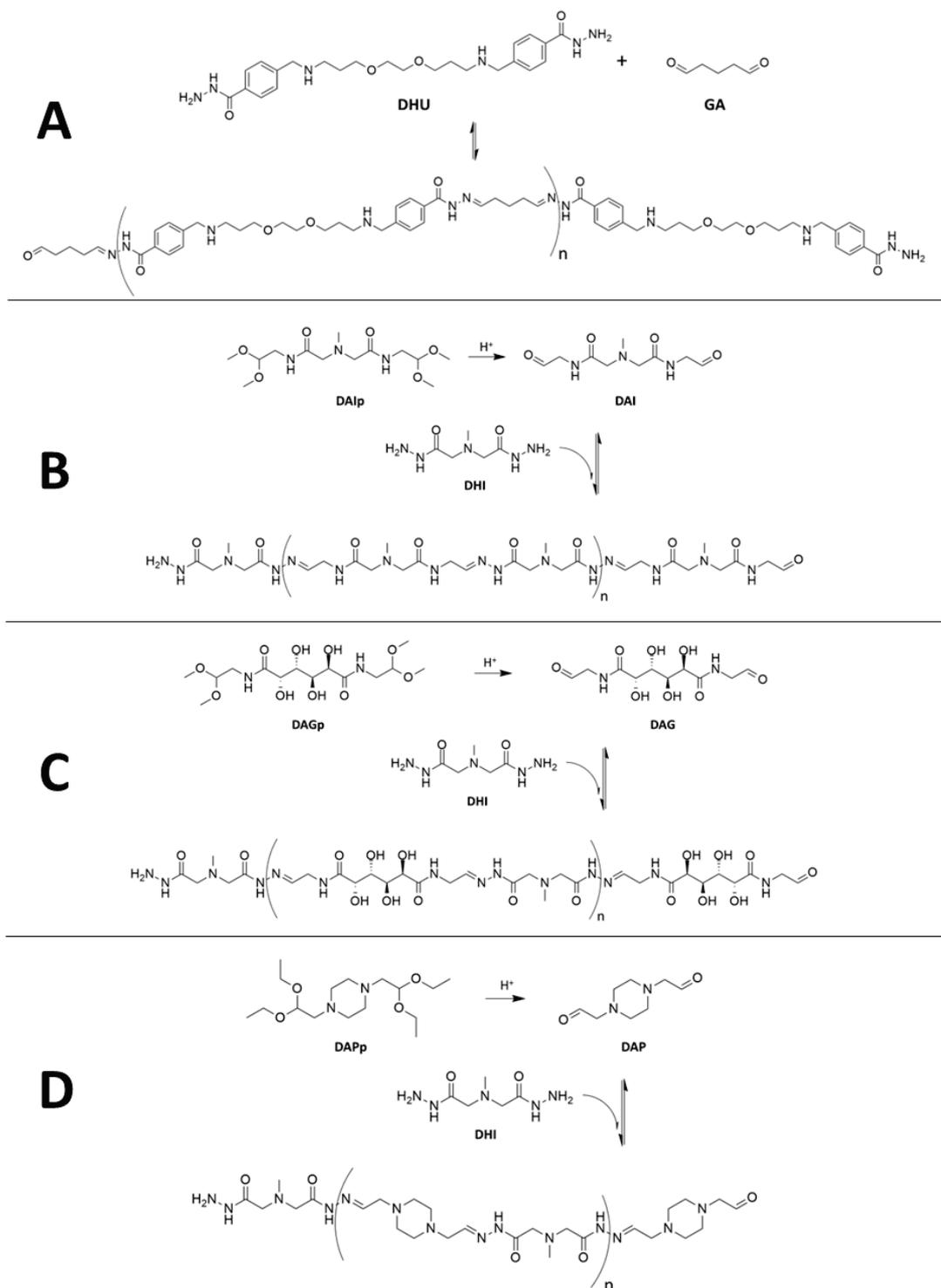


Figure 165 - Différentes polymérisations examinées durant ce travail, à partir de **(A)** DHU et de GA. **(B)** DHI et de DAIp (protégé). **(C)** DHI et de DAGp (protégé). **(D)** DHI et de DAPp (protégé).

II. Caractérisation des monomères et des polymères

1. Évaluation de la solubilité

La solubilité des monomères et des polymères a été évaluée de deux façons : par simple observation visuelle ou par mesure de turbidité.

a. Aspect visuel

L'analyse visuelle de l'aspect de la solution a été réalisée en la comparant à un flacon en verre transparent contenant le solvant considéré. Dans le cas d'absence de différence visuelle entre les deux flacons, la molécule a été déterminée comme soluble. Dans le cas contraire, une description succincte a été établie (« opalescence », « en suspension », « non soluble », par exemple).

b. Turbidimétrie

La deuxième façon d'évaluer la solubilité a été une analyse quantifiable par turbidimétrie. L'appareil utilisé a été le Turbiscan Classic MA 2000, qui permet de mesurer la transmission et la rétrodiffusion d'un échantillon. Il est couramment utilisé pour rendre compte des dispersions translucides ou opaques. Cette technique permet de comparer les valeurs de transmission entre plusieurs échantillons et au cours du temps. Les courbes de transmission obtenues ont été lissées, afin de ne pas prendre en compte les aspérités du verre.

2. Caractérisation par chromatographie

Les techniques de chromatographies utilisées pour caractériser les monomères et les polymères sont : HPLC (*high performance liquid chromatography*), SEC (*size exclusion chromatography*) et LC-MS (*liquid chromatography-mass spectrometry*). Cette dernière technique sera décrite lors de la présentation des techniques de spectrométrie de masse. Tous les échantillons sont préalablement filtrés sur filtre seringue CME (0,45 µm) avant injection dans l'une de ces trois techniques.

a. Chaînes chromatographiques

Les analyses par HPLC ont été réalisées sur deux chaînes différentes. Leurs principales différences sont la présence d'un injecteur automatique (injection manuelle dans le cas contraire), le nombre de pompes (1 ou 2 pour réaliser un gradient d'élution), la présence d'un dégazeur en ligne, et la présence d'un four pour réguler la température des colonnes.

Chaîne A (HPLC & SEC)

La chaîne Shimadzu est constituée d'un contrôleur CBM-20A, d'une pompe LC-20AD, de détecteurs RI (RID-10A) et UV (SPD-20A), et d'une injection manuelle avec une boucle d'injection de 100 µL. Le volume d'injection est de 100 µL. Les analyses ont été réalisées à température ambiante. Le logiciel LC Solution 1.25 a été utilisé pour asservir la chaîne et traiter les données brutes.

Chaîne B (HPLC)

La chaîne Shimadzu est constituée d'un contrôleur CBM-20A, de deux pompes LC-20AT, d'un dégazeur DGU-20A3, d'un passeur SIL-40C (à 4 ou 15 °C), d'un four CTO-40S (fixé à 30 °C), de détecteurs RI (RID-10A) et UV (SPD-20A), ainsi que d'une chambre de mélange de 2.6 mL. Le volume d'injection est de 20 µL. Le logiciel LC Solution 5.106 a été utilisé pour automatiser la chaîne et traiter les données brutes.

Chaîne C (SEC)

La chaîne Agilent est constituée d'un contrôleur, d'une pompe, d'un injecteur automatique, d'un dégazeur, d'un four (fixé à 30°C) et d'un détecteur UV. Un détecteur RI (réfractrométrie) et un détecteur de MALS (*Multi-Angle Light Scattering*), tous deux de la société Wyatt, ont également été employés en ligne sur cette chaîne. Le volume d'injection est de 100 µL. Le logiciel Astra 6.1 a été utilisé pour traiter les données brutes.

Chaîne D (SEC)

La chaîne Agilent series 1200, située dans le laboratoire CP2M (à Villeurbanne) et dédiée aux analyses SEC dans le DMSO, est constituée d'une pompe, d'un passeur d'échantillon, d'un four (fixé à 40 °C), ainsi que d'un réfractomètre différentiel 1260 Infinity et d'un détecteur UV à longueur d'onde variables. Le logiciel Agilent SEC Software 2.1.9 a été utilisé pour traiter et éditer les données brutes. Cette expérience a été réalisée en collaboration avec Olivier Boyron (IR CNRS, CP2M).

b. Colonnes

Plusieurs colonnes ont été utilisées, notamment dans le criblage de colonnes afin de trouver la plus performante pour la séparation de monomères et/ou de polymères. Ces différentes colonnes sont listées ci-dessous, puis, par souci de simplification, elles seront référées par numéro dans le manuscrit.

Colonne HPLC 1 : COSMOSIL 5C18-MS-II

Colonne HPLC 2 : WATERS XBridge Shield RP18

Colonne HPLC 3 : Lichrospher 100 RP-8

Colonne HPLC 4 : NUCLEOSIL C18Nautilus

Colonne HPLC 5 : WATERS Atlantis Premier BEH C18 AX 5 μ m

Colonnes SEC 1 : 3 colonnes en série TSKGel PW G6000 + TSKGel PW G2500 + TSKGel Oligo

Colonnes SEC 2 : 2 colonnes en série PL-Aquagel OH-Mixed-M-8 μ m + PL-Aquagel OH-Mixed-H-8 μ m

Colonnes SEC 3 : 2 colonnes en série GRAM de chez PSS (analyses réalisées au laboratoire CP2M, à Villeurbanne)

c. Phases mobiles (ou éluants)

Les éluants aqueux sont préparés à partir d'eau MilliQ ou à partir d'eau permutée filtrée à 0,22 μ m (membrane PTFE). Dans le cas de la préparation de tampons, des sels sont ajoutés jusqu'à une concentration totale finale de 0,1 M (sauf mention contraire). Les tampons sont préparés avec des sels provenant de Carlo Erba ou Sigma Aldrich, d'après les protocoles de préparation présentés ci-dessous. Afin d'obtenir le pH visé, de faibles quantités d'acide chlorhydrique et/ou d'hydroxyde de sodium sont ajoutées. Le pH est systématiquement vérifié à l'aide d'un pH-mètre préalablement étalonné (à température ambiante). Un éventuel ajout de sel supplémentaire (NaCl ou NaNO₃) peut également être réalisé afin d'augmenter la force ionique, auquel cas le pH est mesuré après cet ajout pour éventuellement être réajusté. Tous les débits d'éluant sont fixés à 1,0 mL.min⁻¹.

- **Tampon acétate (0,1 M, pH = 4,5)**

Le tampon acétate est préparé en mélangeant 11,6 g d'acétate d'ammonium et 11 mM d'acide acétique glacial, puis ajusté à 1L avec de l'eau permutée, et ajusté si nécessaire à un pH de 4,5. Enfin, la solution finale est filtrée sur membrane PTFE de 0,22 μm .

- **Tampon phosphate (0,1 M, pH = 7,0)**

Le tampon phosphate est préparé en réalisant une solution S1 de phosphate de sodium dibasique heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) à 26,8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (0,1 M), et une solution S2 de phosphate de sodium monobasique monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) à 13,8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (0,1 M). Ensuite, pour 1 L de solution tampon, 305 mL de solution S1 et 195 mL de solution S2 sont ajoutés dans une fiole jaugée, et le volume est ajusté à 1 L avec de l'eau MilliQ. Le pH de la solution finale est ensuite vérifié par un pH-mètre et ajusté si nécessaire à 7,0. Enfin, la solution finale est filtrée sur membrane PTFE de 0,22 μm .

- **Tampon carbonate (0,1 M, pH = 9,0)**

Le tampon carbonate est préparé en réalisant une solution S1 de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 10,6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (0,1 M), et une solution S2 de bicarbonate de sodium (NaHCO_3) à 8,4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (0,1 M). Ensuite, pour 1 L de solution tampon, 100 mL de solution S1 et 900 mL de solution S2 sont mélangés. Le pH de la solution finale est ensuite vérifié par un pH-mètre et ajusté si nécessaire à 9,0. Enfin, la solution finale est filtrée sur membrane PTFE de 0,22 μm .

Des éluants organiques ont également été utilisés, seuls, ou en mélange avec de l'eau ou des tampons, ou encore, utilisés conjointement lors de réalisation de gradients d'élution chromatographiques. Ainsi, de l'acétonitrile, du DMSO, du méthanol et de l'isopropanol ont été employés, tous de grade « analytique pour chromatographie ».

La mise au point d'un gradient d'élution chromatographique faisant appel à plusieurs éluants (tampons de différents pH et acétonitrile) se fait empiriquement en variant la durée d'analyse, la pente de gradient et la proportion d'éluant organique. Le gradient optimal correspond à celui qui permet la meilleure séparation des espèces composant l'échantillon analysé. Les gradients d'élution utilisés dans ce travail sont décrits dans les Chapitres II, III et IV.

3. Caractérisation par spectrométrie de masse

a. Spectrométrie de masse MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization - time of flight*)

Les spectres de masse ont été acquis sur un spectromètre de masse Voyager-DE PRO (Sciex, Framingham, MA) équipé d'un laser à azote émettant à 337 nm. Les ions ont été accélérés jusqu'à un potentiel final de 20 kV. Les spectres de masse correspondent à l'accumulation de 300 tirs, et un étalonnage de masse externe a été utilisé (un mélange de peptides du kit d'étalons Sequazyme™, AB Sciex). La précision de la masse instrumentale est de 0,05% pour les analyses en mode linéaire, et 0,008% pour celle en mode réflectron. Les échantillons ont été préparés en dissolvant l'échantillon dans un tampon aqueux ou dans du DMSO à une concentration variant de 0,5 à 40 g.L⁻¹. La matrice est de la 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB, Sigma-Aldrich) ou de la α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA, Sigma-Aldrich), utilisée sans autre purification et dissous dans l'eau ou le DMSO, à 10 g.L⁻¹. Les solutions de matrice et d'échantillons ont été mélangées en suivant un rapport volumique de 9:1 ou 8:2. Puis 1 μ L du mélange a été déposé et séché sur la plaque d'échantillonnage MALDI. Ces analyses ont été effectuées sur la plateforme Protein Science de la SFR Biosciences (IBCP, Lyon).

b. Spectrométrie de masse ESI-TOF (*electrospray ionization - time of flight*)

Les échantillons analysés par spectrométrie de masse ESI-TOF ont été introduits directement dans la source ESI sans filtration préalable. Ces analyses ont été conduites au Centre Commun de Spectroscopie de Masse (CCSM) de l'UCBL (Villeurbanne). Le spectromètre de masse est équipé avec une source ESI opérée en mode positif. La tension capillaire est de 4 500 V, le gaz de nébulisation est à 3,1 bar, le four à 200 °C, et le débit du gaz porteur est de 9,0 L.min⁻¹.

c. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

Les analyses de chromatographie liquide couplée à un détecteur de masse ont été réalisées au Centre Commun de Spectroscopie de Masse (CCSM, UCBL), en collaboration avec Élodie Fromentin en charge de cette plateforme d'analyse. Les analyses ont été réalisées avec un système UHPLC (Ultimate 3000, Thermo Scientific) couplé à un spectromètre de masse hybride Quadrupôle - Time-of-Flight (Q-

TOF), Impact II Bruker. Les échantillons n'ont pas été dilués avant injection. Le volume d'injection est de 20 μL (pour l'analyse 1) et de 30 μL (pour l'analyse 2). Les colonnes utilisées sont NUCLEOSIL 100-5 C18Nautilus (analyse 1) et WATERS Atlantis Premier BEH C18 AX 5 μm (analyse 2). L'éluant A est composé d'eau ultra-pure Elga, et l'éluant B est composé d'acétonitrile ($\geq 99.9\%$ Optima LC/MS grade Fisher Chemical). Le débit est fixé à 1,0 mL.min⁻¹, et les gradients appliqués sont détaillés dans le Tableau 22 et le Tableau 23.

Tableau 22 - Gradients appliqués pour l'Analyse 1.

Temps (minutes)	%A	%B
8	100	0
12	Gradient linéaire 100 \rightarrow 20	Gradient linéaire 0 \rightarrow 80
3	Gradient linéaire 20 \rightarrow 100	Gradient linéaire 80 \rightarrow 0
7	100	0

Tableau 23 - Gradients appliqués pour l'Analyse 2.

Temps (minutes)	%A	%B
10	96	4
10	Gradient linéaire 96 \rightarrow 40	Gradient linéaire 4 \rightarrow 60
5	40	60
5	Gradient linéaire 40 \rightarrow 96	Gradient linéaire 60 \rightarrow 4
15	96	4

Le spectromètre de masse est équipé d'une source ESI opérée en mode positif. La tension capillaire est de 4 500 V, le gaz de nébulisation est à 3,1 bar, le four à 200 °C, et le débit du gaz porteur est de 9,0 L.min⁻¹. La calibration a été effectuée avec une solution de formate de sodium et les données ont été traitées avec le logiciel DataAnalysis 5.0 de Bruker.

4. Caractérisation par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les analyses des échantillons par spectroscopie de RMN ont été réalisées sur la plateforme RMN Polymères de l'Institut de Chimie de Lyon localisée sur le site d'Axel'One Campus (Villeurbanne), en collaboration avec Fernande Boisson-Da Cruz (IR CNRS, IMP, Villeurbanne). Les analyses ont été

réalisées sur un spectromètre Bruker AVANCE III 400 MHz (sauf cas contraire mentionné), dans des tubes de 5 mm, à 298 K. Des analyses 1D-¹H, 1D-¹³C et DEPT135, 2D-COSY (*CORrelation Spectroscopy*, 2D-HSQC (*Heteronuclear Single-Quantum Correlation*), 2D-HMBC- (*Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*) et DOSY (*Diffusion-Ordered Spectroscopy*) ont été réalisées. Les concentrations des analytes ont varié selon les synthèses de 1 à 10 mg.mL⁻¹ (précisées au cas par cas). Les solvants deutérés (D₂O ou DMSO-d₆ utilisés seront précisés au cas par cas). Les logiciels de traitements des données sont TopSpin ou MestReNova. Des suivis cinétiques ont également été réalisés sur le même spectromètre. Afin de maintenir une température constante (298 K), l'échantillon est soit laissé dans le spectromètre entre les analyses, soit inséré dans un plot chauffant. Les analyses RMN ¹H, aux temps courts de réaction, sont réalisées avec un nombre faible de scans (20 typiquement) afin de pouvoir limiter la conversion pendant le temps d'analyse, puis le nombre d'acquisitions est augmenté après quelques heures de réaction pour obtenir des spectres avec un meilleur rapport signal sur bruit. Les analyses ¹³C, DOSY, HMBC et HSQC sont réalisées à des moments stratégiques afin d'obtenir des informations structurales en limitant au possible la perturbation du suivi cinétique par ¹H.

5. Caractérisation par spectroscopie UV-Visible et infra-rouge

a. Spectroscopie UV-Visible

Les analyses de spectroscopie UV-Visible ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre SYNERGY Mix de Bio-Tek Instruments, et analysées à l'aide du logiciel Gen5 1.10. La mesure a été effectuée grâce à des plaques de 96 puits, et la gamme de longueurs d'onde est entre 230 et 800 nm. Les échantillons sont comparés à un puits « témoin », composé du même volume de solvant pur.

b. Spectroscopie infrarouge

Les analyses de spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR) ont été réalisées avec un spectromètre Smart-Omni-Transmission de Thermo Scientific, avec un dispositif *Attenuated Total Reflectance* (ATR), permettant l'analyse des poudres et de gouttes de solution sur un cristal d'indice de réfraction élevé. Une mesure sans échantillon est réalisée au préalable afin de tracer la ligne de base pour le spectre de l'échantillon à analyser.

III. Caractérisation de l'auto-association de monomères

1. Caractérisation par titration calorimétrique isotherme (ITC)

a. Protocole d'utilisation

Les analyses de titration calorimétrique isotherme (*Isothermal Titration Calorimetry*, ITC) ont été conduites sur un appareil NanoITC de Thermal Analysis Instruments. Classiquement, cette méthode de caractérisation est employée pour étudier les interactions entre protéines et ligands, en injectant une solution de ligands dans une cellule isotherme contenant une solution de protéines. La chaleur nécessaire pour maintenir une température égale à une cellule de référence est alors mesurée en fonction du volume de solution de ligand injectée (Figure 166).

Dans ce travail, des auto-assemblages du monomère DHU formés dans l'eau ont été injectés dans une cellule contenant de l'eau permutée. La mesure de la chaleur émise par la dissociation de l'assemblage est alors utilisée pour déterminer la concentration d'agrégation critique ou d'auto-association (CAC) ainsi que l'enthalpie, l'entropie et l'enthalpie libre d'agrégation ou d'auto-association.

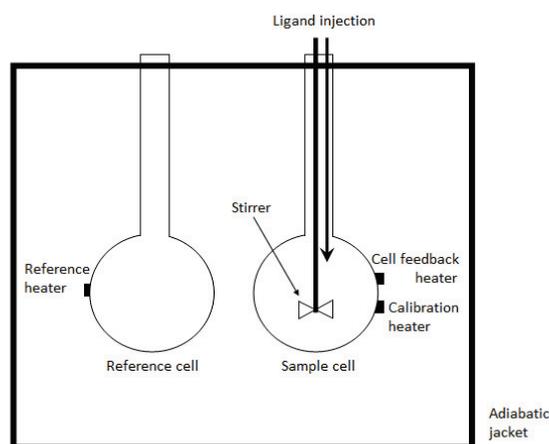


Figure 166 - Représentation schématique des composants d'un appareillage ITC.

Les données sont traitées avec le logiciel ITCRun 3.7, de Thermal Analysis Instruments, selon la méthodologie de calcul détaillée dans la partie ci-après.

b. Méthodologie de traitement des données

La méthodologie utilisée dans ce travail de thèse a été inspirée des travaux de Loh *et al.*²²³ et de ceux d'Emerson & Holtzer,²²⁴ pour traiter les données brutes obtenues par ITC, et déterminer les paramètres thermodynamiques associés à l'auto-association du DHU. Il s'agit d'approximations pour faciliter l'obtention de valeurs sur un nombre faible d'analyses. Les récents travaux de Žiga Medoš²²⁶⁻²²⁹ sont plus précis pour le même type d'analyse mais n'ont pas été pris en considération dans cette thèse, par simplicité et faute de temps.

i. Création du graphe $\Delta H = f(C)$

Les courbes obtenues en ITC présentent la chaleur échangée (Q) en fonction du temps. Il est alors possible d'intégrer les pics obtenus pour en déterminer la chaleur échangée en fonction du numéro d'injection. En connaissant le volume de solution injecté (V_i), ainsi que la concentration en DHU dans la seringue ($C_{seringue}$), la chaleur échangée Q_i est alors transformée en différence d'enthalpie observée (ΔH_i) selon l'Équation 5.

Équation 5 - Détermination de l'enthalpie molaire observée à la i-ème injection

$$\Delta H_i^\circ = \frac{Q_i \times V_i}{C_{seringue}}$$

De la même façon, le numéro d'injection N_i est transformé en concentration du DHU C_i dans la cellule à la i-ème injection selon l'Équation 6.

Équation 6 - Détermination de la concentration à chaque injection à partir du numéro d'injection

$$C_i = N_i \times \frac{C_{seringue} \times \sum_{x=1}^i V_i}{V_{cellule} + \sum_{x=1}^i V_i}$$

Ainsi, les points obtenus relient l'enthalpie molaire observée à la concentration en monomère DHU dans la cellule. Une modélisation par une fonction sigmoïdale (Boltzmann) a été ensuite utilisée pour obtenir une courbe théorique physiquement cohérente. La fonction sigmoïdale employée a été de la forme proposée ci-dessous (Équation 7).

Équation 7 - Fonction sigmoïdale utilisée pour modéliser la courbe expérimentale brute obtenue

$$y = A2 + \frac{A1 - A2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{dx}}}$$

Il a été ensuite possible de remonter à la CAC et à l'enthalpie d'agrégation ou d'auto-association (ΔH_{agg}), d'après Loh *et al.*²²³ ainsi qu'à l'enthalpie libre et à l'entropie d'agrégation ou d'auto-association (ΔG_{agg} et ΔS_{agg}), d'après Emerson & Holtzer²²⁴ grâce aux traitements mathématiques suivants.

ii. Détermination de la CAC

D'après Loh *et al.*²²³, la CAC est l'abscisse du point d'inflexion de la courbe sigmoïdale obtenue (Figure 167). Pour la déterminer de façon précise, il est pertinent de dériver la courbe modèle calculée à l'étape précédente, et de déterminer l'abscisse du maximum de la courbe.

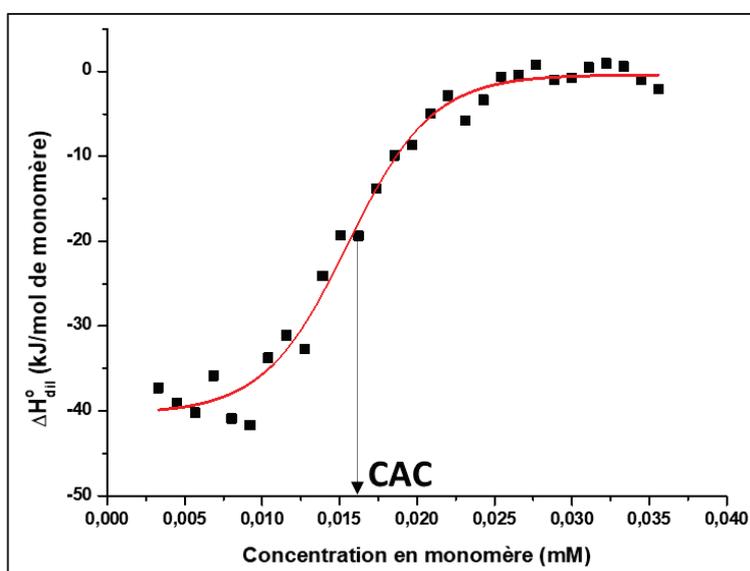


Figure 167 - Exemple de courbe obtenue par ITC et d'une détermination de CAC.

Il a été difficile d'établir l'incertitude de la valeur ainsi déterminée, du fait des erreurs qui peuvent être faites au moment de l'intégration des pics de la courbe brute, mais également des incertitudes sur toutes les valeurs utilisées pour obtenir les courbes sigmoïdales finales.

iii. Détermination de ΔH_{agg}

Toujours d'après Loh *et al.*²²³, l'enthalpie molaire observée peut calculer à partir de la différence entre les deux asymptotes horizontales, selon l'Équation 8.

Équation 8

$$\Delta H_{obs}^{\circ} = \Delta H_{dil}^{\circ}(final) - \Delta H_{dil}^{\circ}(initial)$$

Dans la modélisation faite (sigmoïde de Boltzmann), on remarque que : $\Delta H_{dil}^{\circ}(final) = A2$, et que $\Delta H_{dil}^{\circ}(initial) = A1$. On retrouve ensuite l'enthalpie molaire d'agrégation ou d'auto-association à partir de l'enthalpie molaire observée avec l'Équation 9. Il a été également difficile d'évaluer ici l'incertitude sur la valeur de l'enthalpie molaire d'agrégation ou d'auto-association, pour les mêmes raisons que pour la CAC.

Équation 9

$$\Delta H_{agg}^{\circ} = \Delta H_{obs}^{\circ} \times \frac{C_{seringue}}{C_{seringue} - CMC}$$

iv. Détermination de ΔG_{agg}

D'après Emerson & Holtzer,²²⁴ il est possible de déterminer l'enthalpie libre à partir de la CAC dans le cas du DHU, en faisant l'hypothèse que le nombre de monomères dans l'auto-assemblage est très élevé (plus exactement, que la molalité d'un agrégat à N composants est égale à la molalité d'un agrégat à N-1 composants). L'Équation 10 est donnée ci-dessous, avec R, la constante des gaz parfaits, et T, la température du système ITC.

Équation 10

$$\Delta G_{agg}^{\circ} = RT \times \ln(CAC)$$

Dans ce cas également, il a été difficile d'évaluer l'incertitude sur la valeur de l'enthalpie molaire d'agrégation ou d'auto-association, pour les mêmes raisons que pour la CAC, d'autant plus qu'une hypothèse sur la taille des agrégats a été nécessaire ici.

v. Détermination de ΔS_{agg}

Une fois les valeurs de ΔG_{agg} et ΔH_{agg} connues, il est possible de remonter à l'entropie d'agrégation ou d'auto-association ΔS_{agg} à partir de l'Équation 11. L'incertitude sur cette valeur est la plus élevée, car elle comprend l'accumulation de toutes les incertitudes formulées précédemment.

Équation 11

$$\Delta S_{agg}^{\circ} = \frac{\Delta H_{agg}^{\circ} - \Delta G_{agg}^{\circ}}{T}$$

2. Caractérisation par diffusion de la lumière et zétamétrie

a. Détermination de tailles et de distributions de taille

Les analyses de la taille et des distributions en taille des auto-assemblages du monomère DHU ont été réalisées par DLS (*Dynamic Light Scattering*), avec un Zetasizer Nano Series de Malvern. Les échantillons de DHU, à une concentration finale de 1 à 10 mM dans l'eau MilliQ, ont été transvasés dans des cuvettes de DLS jetables. La mesure a été effectuée à un angle de 173°, une position de mesure fixée à 4,65 mm, une valeur d'atténuateur variable selon l'expérience mais fixée, une température de 25°C, et en utilisant les caractéristiques de la phase continue, l'eau (RI = 1,330 ; viscosité = 0,8872 cP). Le *Derived Count Rate* (en kcps), le diamètre hydrodynamique moyen en z, *Z-Average* (en nm), et l'indice de polydispersité Pdl (sans unité) ont été des valeurs clés pour la caractérisation des auto-assemblages de DHU en suspension. Chaque échantillon a été analysé en triplicat (moyenné *in fine*).

b. Détermination du potentiel Zêta (ζ)

Les analyses du potentiel Zêta (ζ -Pot) ont été réalisées avec un Zetasizer Nano Series de Malvern. Les échantillons de DHU, à une concentration finale de de 1 à 10 mM dans l'eau MilliQ, ont été transvasés dans des cuvettes de zétamétrie jetables. Les paramètres permettant de caractériser les échantillons ont été la mobilité électrophorétique (en $\mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), le potentiel Zêta (en mV), et la conductivité (en $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$). L'équation de Smoluchowski a été utilisée pour transformer les valeurs de mobilité électrophorétique en potentiel zêta. Chaque échantillon a été analysé en triplicat (moyenné *in fine*).

c. Études cinétiques

Des études cinétiques ont également été menées sur le Zetasizer Nano Series de Malvern, en DLS et en zétamétrie. Pour ce faire, les suspensions ont soit été laissées i) dans des cuvettes jetables sans agitation et analysées régulièrement (tout en recouvrant les cuvettes d'un papier film lorsqu'elles n'étaient pas utilisées pour les rendre hermétiques), soit ii) sous agitation dans des flacons en verre, avec un prélèvement régulier introduit dans les cuvettes jetables (concentration finale en DHU de 1 à 10 mM). Les analyses ont été menées à 25 °C dans l'appareil et à température ambiante en dehors. Ainsi, les paramètres influant sur l'étude cinétique ont été l'agitation, la concentration, et la quantité d'acide ajoutée.

3. Caractérisation par microscopie électronique à transmission (MET)

a. Microscopie électronique à transmission (MET)

Les analyses par microscopie électronique à transmission (MET) ont été réalisées sur un microscope Philips CM120. L'échantillon (une goutte de 5 μ l) a été déposé sur un film de carbone de 30 nm d'épaisseur supporté par une grille de cuivre (CF200-Cu, EMS), puis a été séché à l'air libre. Ce film a été éventuellement préalablement hydrophilisé avec un plasma argon *via* le mode *Glow discharge* d'un métalliseur de type MED-20 de chez Baltec afin d'obtenir une meilleure homogénéité de dépôt d'échantillon. Une solution aqueuse à 2% massique de silicotungstate de sodium a pu être utilisée lors du processus de dépôt de la goutte sur grille afin de réaliser un contraste négatif et améliorer ainsi le contraste des auto-assemblages sous le faisceau. La tension d'accélération des électrons utilisée a été de 80 kV.

b. Cryo-MET

Les analyses par cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-MET) ont été réalisées sur un microscope Philips CM120 et à l'aide d'un porte objet cryo Gatan 626. La préparation de l'échantillon pour l'observation a été effectuée en utilisant un cryoplunge VITROBOT de chez ThermoFisher. Cette préparation consiste à déposer une goutte de 3,5 μ l de la solution à caractériser sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone à trous de type Lacey (LC400-Cu, EMS)

préalablement hydrophilisée par *glow discharge* (MED-20 de chez Baltec). Ensuite un épongeage de 2 s s'opère afin de ne laisser qu'un film mince de solution sur la grille. Puis celle-ci est plongée dans de l'éthane liquide refroidit à l'azote liquide afin d'obtenir un refroidissement instantané et une couche amorphe de glace homogène sur l'ensemble de la grille. Un contrastant peut être introduit dans la goutte d'échantillon (silicotungstate de sodium 2% massique) afin d'améliorer le contraste des auto-assemblages sous faisceau. La tension d'accélération des électrons appliquée a été de 120 kV, et l'observation a été réalisée en mode *Low dose* afin de limiter la dose d'électron reçu par l'échantillon, et retarder ainsi sa dégradation.

4. Caractérisation par *asymmetric flow field-flow fractionation* (AF4)

a. Principe

Le principe de cette méthode (Figure 168), alternative à la SEC, repose sur la séparation des composés d'un échantillon en fonction de leur taille. La stratégie est qu'une fois introduits dans le canal, les composés soient soumis à deux débits : le débit d'élution, qui les entraîne vers la sortie du canal, et le débit de *crossflow*, qui leur impose un courant perpendiculaire et qui les « plaque » contre une membrane. Ainsi, les composés de plus faible taille, par mouvement Brownien, présenteront une diffusion plus grande dans le canal, et seront ainsi, en moyenne, plus sensibles à l'élution que les composés de grande taille (« plaqués » vers la membrane). De fait, plus un composé est petit, plus il sortira tôt du canal d'analyse.

Un des atouts de l'AF4 par rapport à la SEC est le fait de limiter le plus possible les interactions avec une phase stationnaire, et de diminuer les soucis de cisaillement pouvant être rencontrés en SEC. L'optimisation des conditions d'analyse est donc effectuée en faisant varier le débit d'élution, le débit de *crossflow*, les gradients de débit, le type de membrane, la taille du canal et la concentration de l'analyte. En revanche, un inconvénient de l'AF4 peut être qu'au moment de l'introduction de l'analyte, un débit opposé au débit d'élution est nécessaire pour concentrer les composés et les plaquer sur la membrane (étape dite de « focus »). Puis, après cela, les composés subissent le débit d'élution et celui de *crossflow*. Or, cette étape, qui a pour but de concentrer localement tous les analytes au même endroit, peut conduire à leur agrégation, voire leur précipitation.

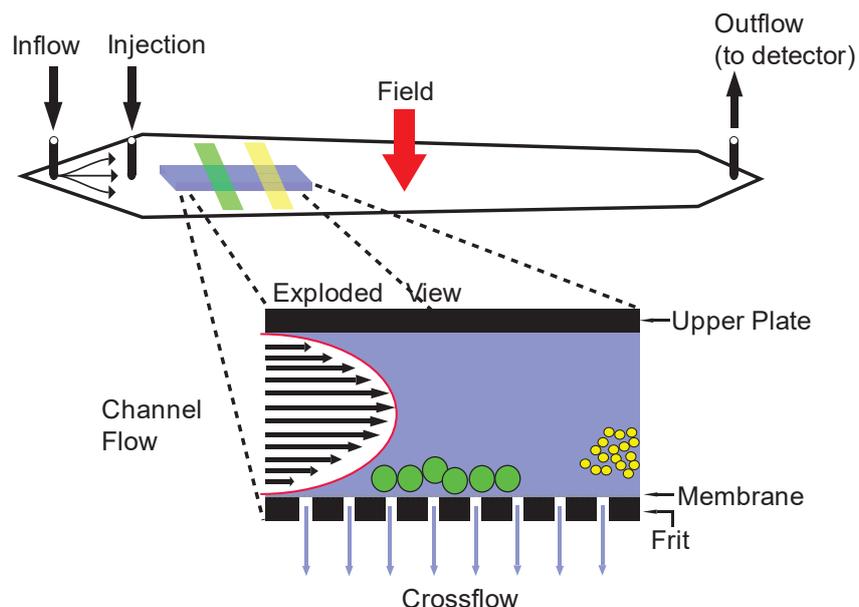


Figure 168 - Schéma détaillant le principe de l'AF4, tiré d'une présentation de la société Wyatt.

b. Conditions expérimentales

Comme indiqué précédemment, les paramètres qu'il est possible de faire varier pour optimiser la séparation des composés sont : le débit d'élution, le débit de *crossflow*, le débit de focus (pour concentrer l'échantillon sur la membrane avant de début de l'analyse), les gradients de ces débits, le type d'éluant, le type de membrane, la géométrie et la taille du canal, et le volume et la concentration de l'échantillon injecté. Par manque de temps, nous avons gardé fixes le type de membrane, ainsi que la géométrie et la taille du canal.

Pour décrire la méthode d'analyse employée, le tableau général ci-dessous présente les étapes d'élution, les gradients, et les débits utilisés. La détection a été effectuée par UV, RI et par diffusion élastique de la lumière.

Étape	Mode	Crossflow (mL.min ⁻¹)
Préparation	Elution	0
Injection et concentration sur la membrane	Focus	Focus Flow
	Focus + Inject	Focus Flow
	Focus	Focus Flow
Élution	Elution	Crossflow max
	Elution	Crossflow max → 0.1 (gradient linéaire)
	Elution	0.1
	Elution	0
« Lavage »	Elution + Inject	0
	Elution	0

Conclusion Générale

Ces travaux de thèse ont porté sur l'élaboration et la caractérisation de polyacylhydrazones (PACH) hydrosolubles, dans le cadre du projet ANR DynaSWEET. Dans ce projet, ces polymères ont pour objectif final d'être utilisés pour constituer des assemblages macromoléculaires capables d'interagir avec des protéines de surface de *Pseudomonas aeruginosa*, les lectines, afin d'inhiber la formation de son biofilm. Le cahier des charges de ces PACH est que leur synthèse et leur caractérisation se déroulent en milieu aqueux, et qu'ils présentent un comportement répondant à la chimie combinatoire dynamique (CCD), grâce à des liaisons acylhydrazones sensibles au pH. Afin de les synthétiser, le choix des monomères s'est porté sur des dihydrazides et des dialdéhydes.

Ainsi, dans un premier temps, des monomères commerciaux « modèles » (*i.e.* GA, TDC, DHS) ont été sélectionnés pour leur structure chimique et leur accessibilité simples. Cependant, l'hydrosolubilité des produits issus de leur réaction a été trouvée faible avec l'apparition rapide d'un précipité, ne permettant pas de travailler avec des concentrations élevées. À faible concentration, lorsque les produits de la réaction étaient solubles, leur caractérisation approfondie a pu être réalisée en faisant appel à différentes techniques d'analyse (HPLC, SEC, RMN, spectrométrie de masse MALDI-TOF, spectroscopie UV). La présence de PACH a été ainsi prouvée. Il a été mis en évidence que ces PACH correspondaient à des oligomères de faible masse molaire et sous une forme cyclique, que la réaction de polymérisation était catalysée en milieu acide, et qu'un intermédiaire réactionnel, de type carbinolamine, existait.

Dans le but de pouvoir travailler avec des concentrations supérieures sans précipitation dans l'eau, des monomères dihydrazides et dialdéhydes, plus hydrosolubles (*i.e.* DHI, DAI, DAG, DAP), ont été synthétisés par un partenaire du projet ANR. Les PACH obtenus ont été analysés par différentes techniques d'analyse (HPLC, SEC, RMN, spectrométrie de masse MALDI-TOF, spectroscopie UV, LC-MS), et des oligomères de faible masse molaire ont aussi été mis en évidence. Cependant, avec ces monomères-là, des espèces finales cycliques coexistaient avec des espèces linéaires. Comme avec les monomères « modèles », cette obtention d'oligomères de faible degré de polymérisation, et principalement cycliques, pourrait s'expliquer par : i) la relative faible concentration des monomères utilisée (provoquant des puits thermodynamiques qui limiteraient les oligomères à de faibles masses molaires), ii) l'existence de réactions secondaires des dihydrazides dans l'eau (comme celle de leur hydrolyse partielle ou totale conduisant à la formation de fonctions acide carboxylique « inertes » vis-à-vis des aldéhydes), iii) l'existence de réactions secondaires des dialdéhydes lors de l'étape de déprotection de leurs fonctions acétal (conduisant à un composé secondaire non identifié, et détecté en extrémité de chaîne des oligomères). Ces réactions sont d'ailleurs catalysées en milieu acide. Pour exemple, la disparition complète des fonctions hydrazides s'effectue après seulement 8 jours à pH = 1.

Enfin, la polymérisation entre un dihydrazide particulier, le DHU, et un dialdéhyde « modèle », le GA, a été examinée. Elle conduit également à la formation d'oligomères cycliques de faible masse molaire. Parallèlement à cette étude, un caractère auto-associatif du monomère DHU a été mis en évidence dans l'eau, conduisant à la formation d'auto-assemblages caractérisés par ITC, DLS, zétamétrie, microscopie électronique, et turbidimétrie. Il a ainsi été montré que leur forme était sphérique, d'une centaine de nanomètres de diamètre, et d'une charge surfacique négative. Cette valeur anionique, *a priori* étonnante étant donné la structure chimique du DHU, a été démontrée en LC-MS être causée par l'hydrolyse partielle du DHU. Malheureusement, la quantification de cette hydrolyse n'a pas été possible. Par ailleurs, des constantes thermodynamiques de cette auto-association ont pu être établies à pH neutre (sans toutefois avoir pu être comparées à celles obtenues à un pH acide).

En conclusion, ce travail de thèse aura ainsi permis de montrer que la réaction de monomères dihydrazides et dialdéhydes peut conduire à la formation d'oligomères cycliques de PACH dans l'eau. Lorsque des monomères plus hydrosolubles sont utilisés, une coexistence de macrocycles et d'espèces linéaires est atteignable. L'influence du pH, du temps réactionnel, et du solvant (DMSO ou eau) a été analysée, de même que le caractère dynamique des PACH obtenus. Par ailleurs, une étude novatrice sur l'hydrolyse des dihydrazides a été menée, et la caractérisation d'auto-assemblages formés par un dihydrazide auto-associatif a été réalisée.

Suite à ce travail de thèse, de nombreuses perspectives peuvent être entrevues :

- Concernant les PACH et leur caractérisation, l'optimisation de l'analyse des polymères par SEC et AF4 reste un élément clé pour déterminer leur masse molaire moyenne et leur distribution en masse molaire, orthogonalement aux méthodes déjà utilisées. De plus, l'utilisation de monomères avec une structure chimique plus adaptée pourrait être considérée afin de prouver le caractère dynamique des polymères. Par exemple, on pourrait imaginer des structures plus hydrosolubles, contenant du poly(éthylène glycol) en large quantité, qui auraient peu d'interactions avec les phases stationnaires des colonnes SEC.
- Les réactions secondaires que subissent les monomères pourraient être étudiées plus en profondeur, notamment avec des analyses de l'hydrolyse des dihydrazides à d'autres valeurs de pH que celles étudiées (comme par exemple à pH 4 ou 9), ou l'identification des composés issus de la déprotection des dialdéhydes qui n'ont pas été attribués en spectrométrie de masse, et que l'on observe avec certains oligomères.
- Concernant les auto-assemblages du monomère DHU dans l'eau, l'examen de leur structuration pourrait être approfondie en les analysant par diffusion des neutrons aux petits

angles, ou encore, en effectuant des incorporations de fluorophores afin de déterminer une éventuelle forme vésiculaire. Par ailleurs, l'analyse du DHU par HPLC et LC-MS a posé de nombreux problèmes de répétabilité, et l'optimisation de ces analyses permettrait d'accroître la compréhension du comportement de ce dihydrazide en milieu aqueux.

- Enfin, des tests d'activité biologique de ces PACh (même sous forme d'oligomères cycliques) permettraient de vérifier une possible activité biologique des fonctions acylhydrazone vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*, sous la forme de tests « contrôles ». À plus long terme, l'incorporation des dynarènes (qui serviraient de ligands aux lectines de *Pseudomonas aeruginosa*) en tant que monomères dans les PACh pourrait être utilisée pour des tests d'agrégation des bactéries, afin de continuer à répondre au projet DynaSWEET.

Références

- (1) Shahriari, S.; Monajjemi, M.; Zare, K. Increasing the Efficiency of Some Antibiotics on Penetrating Bacteria Cell Membrane. *Ukr. J. Ecol.* **2018**, *8* (1), 671–679. <https://doi.org/10.15421/2018>.
- (2) Nauciel, C. *Bactériologie Médicale*; Masson, 2000.
- (3) Hancock, R. E. The Pseudomonas Aeruginosa Outer Membrane Permeability Barrier and How to Overcome It. *Antibiot Chemother* **1985**, *36*, 95–102.
- (4) Mcdermott, P. F.; Walker, R. D.; White, D. G. Antimicrobials: Modes of Action and Mechanisms of Resistance. *Int. J. Toxicol.* **2003**, *22*, 135–143. <https://doi.org/10.1080/10915810390198410>.
- (5) Mo, Y.; Lorenzo, M.; Farghaly, S.; Kaur, K.; Housman, S. T. What's New in the Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Infections? *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *93* (2), 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.08.007>.
- (6) Poole, K. Multidrug Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **2001**, *4* (5), 500–508. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00242-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00242-3).
- (7) Hancock, R. E. W. Resistance Mechanisms in *Pseudomonas Aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. *Clin. Infect. Dis.* **1998**, *27* (s1), S93–S99. <https://doi.org/10.1086/514909>.
- (8) Botzenhart, K.; Rüden, H. Hospital Infections Caused by Pseudomonas Aeruginosa. *Antibiot Chemother* **1987**, *39*, 1–15.
- (9) Stover, C. K.; Erwin, A. L.; Mizoguchi, S. D.; Warrenner, P.; Hickey, M. J.; Hufnagle, W. O.; Kowalik, D. J.; Lagrou, M.; Garber, R. L.; Goltry, L.; Tolentino, E.; Yuan, Y.; Brody, L. L.; Coulter, S. N.; Folger, K. R. Complete Genome Sequence of Pseudomonas Aeruginosa PAO1, an Opportunistic Pathogen. *Nature* **2000**, *406* (August), 959–964. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2008.10.001>.
- (10) Raisin. Surveillance Des Infections Nosocomiales En Réanimation Adulte, Réseau REA-Raisin, résultats 2016.
- (11) Khalifa, A. B. H.; Moissenet, D.; Thien, H. V.; Khedher, M. Les Facteurs de Virulence de Pseudomonas Aeruginosa: Mécanismes et Modes de Régulations. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. **2011**, *69* (4), 393–403. <https://doi.org/10.1684/abc.2011.0589>.
- (12) Paranchych, W.; Sastry, P. A.; Drake, D.; Pearlstone, J. R.; Smillie, L. B. Pseudomonas Pili: Studies on Antigenic Determinants and Mammalian Cell Receptors. *Antibiot Chemother* **1985**, *36*, 49–57.
- (13) Wagner, S.; Sommer, R.; Hinsberger, S.; Lu, C.; Hartmann, R. W.; Empting, M.; Titz, A. Novel Strategies for the Treatment of Pseudomonas Aeruginosa Infections. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (13), 5929–5969. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01698>.
- (14) Biquand, A. *Les Infections à Pseudomonas Aeruginosa et Leurs Traitements En 2017*; Thèse de Pharmacie, Université de Rennes 1, 2017.
- (15) Cohen, T. S.; Prince, A. Cystic Fibrosis: A Mucosal Immunodeficiency Syndrome. *Nat. Med.* **2012**, *18* (4), 509–519. <https://doi.org/10.1038/nm.2715>.
- (16) Lyczak, J. B.; Cannon, C. L.; Pier, G. B. Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15* (2), 194–222. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.194>.
- (17) Hentzer, M.; Wu, H.; Andersen, J. B.; Riedel, K.; Rasmussen, T. B.; Bagge, N.; Kumar, N.;

- Schembri, M. A.; Song, Z.; Kristoffersen, P.; Manefield, M.; Costerton, J. W.; Molin, S.; Eberl, L.; Steinberg, P.; Kjelleberg, S.; Høiby, N.; Givskov, M. Attenuation of *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence by Quorum Sensing Inhibitors. *EMBO J.* **2003**, *22* (15), 3803–3815. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg366>.
- (18) Kropinski, A. M.; Jewell, B.; Kuzio, J.; Milazzo, F.; Berry, D. Structure and Functions of *Pseudomonas Aeruginosa* Lipopolysaccharide. *Antibiot Chemother* **1985**, *36*, 58–73.
- (19) Doring, G.; Maier, M.; Miiller, E.; Bibi, Z.; Tiimmler, B.; Kharazmi, A. Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Antibiot Chemother* **1987**, *39*, 136–148.
- (20) Carpentier, B.; Cerf, O. Biofilms and Their Consequences, with Particular Reference to Hygiene in Food Industry. *J. Appl. Bacteriol.* **1993**, *75*, 499–511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb01587.x>.
- (21) Ma, L.; Conover, M.; Lu, H.; Parsek, M. R.; Bayles, K.; Wozniak, D. J. Assembly and Development of the *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Matrix. *PLoS Pathog* **2009**, *5* (3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000354>.
- (22) Ragot, C. *Résistance Des Bactéries En Biofilm Aux Agents Désinfectants*; Thèse de Pharmacie, Université Claude Bernard Lyon 1, 1996.
- (23) Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lappin-scott, H. M. Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, *49*, 711–745.
- (24) Mårdén, P.; Tunlid, A.; Malmcrona-Friberg, K.; Odham, G.; Kjelleberg, S. Physiological and Morphological Changes during Short Term Starvation of Marine Bacterial Islates. *Arch. Microbiol.* **1985**, *142* (4), 326–332. <https://doi.org/10.1007/BF00491898>.
- (25) Wolfaardt, G. M.; Lawrence, J. R.; Robarts, R. D.; Caldwell, S. J.; Caldwell, D. E. Multicellular Organization in a Degradative Biofilm Community. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60* (2), 434–446.
- (26) Dhaliwal, D. S.; Cordier, J. L.; Cox, L. J. Impedimetric Evaluation of the Efficiency of Disinfectants against Biofilms. *Lett. Appl. Microbiol.* **1992**, *15* (5), 217–221. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1992.tb00767.x>.
- (27) Gilbert, D. N. An Evaluation of Antipseudomonal Antimicrobial Agents. *Antibiot Chemother* **1985**, *36*, 111–133.
- (28) Döring, G.; Pier, G. B. Vaccines and Immunotherapy against *Pseudomonas Aeruginosa*. *Vaccine* **2008**, *26* (8), 1011–1024. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.12.007>.
- (29) Cryz, S. J.; Fürer, E.; Sadoff, J. C.; Germanier, R. A Polyvalent *Pseudomonas Aeruginosa* O-Polysaccharide-Toxin A Conjugate Vaccine. *Antibiot Chemother* **1987**, *39*, 249–255.
- (30) Thomsen, K.; Christophersen, L.; Bjarnsholt, T.; Jensen, P.; Moser, C.; Høiby, N. Anti-*Pseudomonas Aeruginosa* IgY Antibodies Augment Bacterial Clearance in a Murine Pneumonia Model. *J. Cyst. Fibros.* **2016**, *15* (2), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.08.002>.
- (31) Cecioni, S.; Imberty, A.; Vidal, S. Glycomimetics versus Multivalent Glycoconjugates for the Design of High Affinity Lectin Ligands. *Chemical Reviews*. 2015. <https://doi.org/10.1021/cr500303t>.
- (32) Imberty, A.; Varrot, A. Microbial Recognition of Human Cell Surface Glycoconjugates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18* (5), 567–576. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.08.001>.
- (33) Hauber, H.-P.; Schulz, M.; Schumacher, U.; Pforte, A.; Mack, D.; Zabel, P. Inhalation with

- Fucose and Galactose for Treatment of *Pseudomonas Aeruginosa* in Cystic Fibrosis Patients. *Int. J. Med. Sci.* **2012**, 5 (6), 371–376. <https://doi.org/10.7150/ijms.5.371>.
- (34) Chemani, C.; Pierre, M.; de Bentzmann, S.; Guery, B. P.; Faure, K.; Imberty, A.; Wimmerova, M. Role of LecA and LecB Lectins in *Pseudomonas Aeruginosa*-Induced Lung Injury and Effect of Carbohydrate Ligands. *Infect. Immun.* **2009**, 77 (5), 2065–2075. <https://doi.org/10.1128/iai.01204-08>.
- (35) Imberty, A.; Wimmerová, M.; Mitchell, E. P.; Gilboa-Garber, N. Structures of the Lectins from *Pseudomonas Aeruginosa*: Insights into the Molecular Basis for Host Glycan Recognition. *Microbes Infect.* **2004**, 6 (2), 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.10.016>.
- (36) Boukerb, A. M.; Rousset, A.; Galanos, N.; Méar, J. B.; Thépaut, M.; Grandjean, T.; Gillon, E.; Cecioni, S.; Abderrahmen, C.; Faure, K.; Redelberger, D.; Kipnis, E.; Dessein, R.; Havet, S.; Darblade, B.; Matthews, S. E.; De Bentzmann, S.; Guéry, B.; Cournoyer, B.; Imberty, A.; Vidal, S. Antiadhesive Properties of Glycoclusters against *Pseudomonas Aeruginosa* Lung Infection. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (24), 10275–10289. <https://doi.org/10.1021/jm500038p>.
- (37) Cioci, G.; Gilboa-Garber, N.; Imberty, A.; Mitchell, E. P.; Gautier, C.; Pérez, S.; Wimmerová, M.; Sudakevitz, D. Structural Basis of Calcium and Galactose Recognition by the Lectin PA-IL of *Pseudomonas Aeruginosa*. *FEBS Lett.* **2003**, 555 (2), 297–301. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)01249-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)01249-3).
- (38) von Bismarck, P.; Schneppenheim, R.; Schumacher, U. Successful Treatment of *Pseudomonas Aeruginosa* Respiratory Tract Infection with a Sugar Solution - a Case Report on a Lectin Based Therapeutic Principle TT - Erfolgreiche Behandlung Einer *Pseudomonas Aeruginosa*-Infektion Der Atemwege Mit Hilfe Einer Zucke. *Klin Padiatr* **2001**, 213 (05), 285–287. <https://doi.org/10.1055/s-2001-17220>.
- (39) Gening, M. L.; Titov, D. V.; Cecioni, S.; Audfray, A.; Gerbst, A. G.; Tsvetkov, Y. E.; Krylov, V. B.; Imberty, A.; Nifantiev, N. E.; Vidal, S. Synthesis of Multivalent Carbohydrate-Centered Glycoclusters as Nanomolar Ligands of the Bacterial Lectin LecA from *Pseudomonas Aeruginosa*. *Chem. - A Eur. J.* **2013**. <https://doi.org/10.1002/chem.201300135>.
- (40) Cecioni, S.; Lalor, R.; Blanchard, B.; Praly, J. P.; Imberty, A.; Matthews, S. E.; Vidal, S. Achieving High Affinity towards a Bacterial Lectin through Multivalent Topological Isomers of Calix[4]Arene Glycoconjugates. *Chem. - A Eur. J.* **2009**. <https://doi.org/10.1002/chem.200901799>.
- (41) Bernardi, A.; Jiménez-Barbero, J.; Casnati, A.; De Castro, C.; Darbre, T.; Fieschi, F.; Finne, J.; Funken, H.; Jaeger, K. E.; Lahmann, M.; Lindhorst, T. K.; Marradi, M.; Messner, P.; Molinaro, A.; Murphy, P. V.; Nativi, C.; Oscarson, S.; Penadés, S.; Peri, F.; Pieters, R. J.; Renaudet, O.; Reymond, J. L.; Richichi, B.; Rojo, J.; Sansone, F.; Schäffer, C.; Turnbull, W. B.; Velasco-Torrijos, T.; Vidal, S.; Vincent, S.; Wennekes, T.; Zuilhof, H.; Imberty, A. Multivalent Glycoconjugates as Anti-Pathogenic Agents. *Chemical Society Reviews*. 2013. <https://doi.org/10.1039/c2cs35408j>.
- (42) Gerland, B.; Goudot, A.; Pourceau, G.; Meyer, A.; Vidal, S.; Souteyrand, E.; Vasseur, J. J.; Chevlot, Y.; Morvan, F. Synthesis of Homo- and Heterofunctionalized Glycoclusters and Binding to *Pseudomonas Aeruginosa* Lectins PA-IL and PA-III. *J. Org. Chem.* **2012**. <https://doi.org/10.1021/jo300826u>.
- (43) Cecioni, S.; Faure, S.; Darbost, U.; Bonnamour, I.; Parrot-Lopez, H.; Roy, O.; Taillefumier, C.; Wimmerová, M.; Praly, J. P.; Imberty, A.; Vidal, S. Selectivity among Two Lectins: Probing the Effect of Topology, Multivalency and Flexibility of “Clicked” Multivalent Glycoclusters. *Chem. - A Eur. J.* **2011**. <https://doi.org/10.1002/chem.201002635>.

- (44) Cecioni, S.; Praly, J. P.; Matthews, S. E.; Wimmerová, M.; Imberty, A.; Vidal, S. Rational Design and Synthesis of Optimized Glycoclusters for Multivalent Lectin-Carbohydrate Interactions: Influence of the Linker Arm. *Chem. - A Eur. J.* **2012**. <https://doi.org/10.1002/chem.201200010>.
- (45) Imberty, A.; Chabre, Y. M.; Roy, R. Glycomimetics and Glycodendrimers as High Affinity Microbial Anti-Adhesins. *Chem. - A Eur. J.* **2008**, *14* (25), 7490–7499. <https://doi.org/10.1002/chem.200800700>.
- (46) Donnier-Maréchal, M.; Abdullayev, S.; Bauduin, M.; Pascal, Y.; Fu, M. Q.; He, X. P.; Gillon, E.; Imberty, A.; Kipnis, E.; Dessein, R.; Vidal, S. Tetraphenylethylene-Based Glycoclusters with Aggregation-Induced Emission (AIE) Properties as High-Affinity Ligands of Bacterial Lectins. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (45), 8804–8809. <https://doi.org/10.1039/c8ob02035c>.
- (47) Kadam, R. U.; Bergmann, M.; Hurley, M.; Garg, D.; Cacciarini, M.; Swiderska, M. A.; Nativi, C.; Sattler, M.; Smyth, A. R.; Williams, P.; Cámara, M.; Stocker, A.; Darbre, T.; Reymond, J. L. A Glycopeptide Dendrimer Inhibitor of the Galactose-Specific Lectin LecA and of Pseudomonas Aeruginosa Biofilms. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50* (45), 10631–10635. <https://doi.org/10.1002/anie.201104342>.
- (48) Angeli, A.; Li, M.; Dupin, L.; Vergoten, G.; Noël, M.; Madaoui, M.; Wang, S.; Meyer, A.; Géhin, T.; Vidal, S.; Vasseur, J. J.; Chevolut, Y.; Morvan, F. Design and Synthesis of Galactosylated Bifurcated Ligands with Nanomolar Affinity for Lectin LecA from Pseudomonas Aeruginosa. *ChemBioChem* **2017**, *18* (11), 1036–1047. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700154>.
- (49) Lehn, J.-M. Dynamic Combinatorial Chemistry and Virtual Combinatorial Libraries. *Chem. - A Eur. J.* **1999**, *5* (9), 2455–2463. <https://doi.org/10.1002/adsc.200606132>.
- (50) Rowan, S. J.; Cantrill, S. J.; Cousins, G. R. L.; Sanders, J. K. M.; Stoddart, J. F. *Dynamic Covalent Chemistry*; 2002; Vol. 41. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020315\)41:6<898::AID-ANIE898>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020315)41:6<898::AID-ANIE898>3.0.CO;2-E).
- (51) Kramer, R.; Lehn, J. M.; Marquis-Rigault, A. Self-Recognition in Helicate Self-Assembly: Spontaneous Formation of Helical Metal Complexes from Mixtures of Ligands and Metal Ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90* (12), 5394–5398. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5394>.
- (52) Rideout, D. Self-Assembling Drugs: A New Approach to Biochemical Modulation in Cancer Chemotherapy. *Cancer Invest.* **1994**, *12* (2), 189–202.
- (53) Rideout, D. Self-Assembling Cytotoxins. *Science (80-.).* **1986**, *233*, 561–563.
- (54) Chow, C. F.; Fujii, S.; Lehn, J. M. Crystallization-Driven Constitutional Changes of Dynamic Polymers in Response to Neat/Solution Conditions. *Chem. Commun.* **2007**, *1* (42), 4363–4365. <https://doi.org/10.1039/b713413d>.
- (55) Cougnon, F. B. L.; Sanders, J. K. M. Evolution of Dynamic Combinatorial Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (12), 2211–2221.
- (56) Corbett, P. T.; Leclaire, J.; Vial, L.; West, K. R.; Wietor, J.-L.; Sanders, J. K. M.; Otto, S. Dynamic Combinatorial Chemistry. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3652–3711. <https://doi.org/10.1021/cr020452p>.
- (57) Zhang, W.; Jin, Y. *Dynamic Covalent Chemistry*, Wiley.; Zhang, W., Jin, Y., Eds.; John Wiley & Sons Ltd, 2018. <https://doi.org/10.1002/9783527809080.cataz06077>.
- (58) Ulrich, S. Growing Prospects of Dynamic Covalent Chemistry in Delivery Applications. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52* (2), 510–519. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00591>.

- (59) Otto, S.; Furlan, R. L. E.; Sanders, J. K. M. Selection and Amplification of Hosts from Dynamic Combinatorial Libraries of Macrocyclic Disulfides. *Science* (80-.). **2002**, *297* (5581), 590–593. <https://doi.org/10.1126/science.1072361>.
- (60) Sarma, R. J.; Otto, S.; Nitschke, J. R. Disulfides, Imines, and Metal Coordination within a Single System: Interplay between Three Dynamic Equilibria. *Chem. - A Eur. J.* **2007**, *13* (34), 9542–9546. <https://doi.org/10.1002/chem.200701228>.
- (61) Fan, J.; Lal Saha, M.; Song, B.; Schönherr, H.; Schmittel, M. Preparation of a Poly-Nanocage Dynamer: Correlating the Growth of Polymer Strands Using Constitutional Dynamic Chemistry and Heteroleptic Aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 150–153. <https://doi.org/10.1021/ja209879h>.
- (62) Whitaker, D. E.; Mahon, C. S.; Fulton, D. A. Thermoresponsive Dynamic Covalent Single-Chain Polymer Nanoparticles Reversibly Transform into a Hydrogel. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52* (3), 956–959. <https://doi.org/10.1002/anie.201207953>.
- (63) Frei, P.; Hevey, R.; Ernst, B. Dynamic Combinatorial Chemistry: A New Methodology Comes of Age. *Chem. - A Eur. J.* **2019**, *25* (1), 60–73. <https://doi.org/10.1002/chem.201803365>.
- (64) Hartman, A. M.; Gierse, R. M.; Hirsch, A. K. H. Protein-Templated Dynamic Combinatorial Chemistry: Brief Overview and Experimental Protocol. *European J. Org. Chem.* **2019**, No. 22, 3581–3590. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201900327>.
- (65) Orrillo, A. G.; Escalante, A. M.; Furlan, R. L. E. Dithioacetal Exchange: A New Reversible Reaction for Dynamic Combinatorial Chemistry. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (20), 6746–6749. <https://doi.org/10.1002/chem.201600208>.
- (66) Lehn, J. M. From Supramolecular Chemistry towards Constitutional Dynamic Chemistry and Adaptive Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (2), 151–160. <https://doi.org/10.1039/b616752g>.
- (67) Xing, P.; Chen, H.; Bai, L.; Hao, A.; Zhao, Y. Superstructure Formation and Topological Evolution Achieved by Self-Organization of a Highly Adaptive Dynamer. *ACS Nano* **2016**, *10* (2), 2716–2727. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07800>.
- (68) Ten Cate, A. T.; Dankers, P. Y. W.; Sijbesma, R. P.; Meijer, E. W. Disulfide Exchange in Hydrogen-Bonded Cyclic Assemblies: Stereochemical Self-Selection by Double Dynamic Chemistry. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (15), 5799–5803. <https://doi.org/10.1021/jo0501238>.
- (69) Gianga, T. M.; Pantoş, G. D. Structurally Divergent Dynamic Combinatorial Chemistry on Racemic Mixtures. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17321-2>.
- (70) Men, G.; Lehn, J. M. Higher Order Constitutional Dynamic Networks: [2×3] and [3×3] Networks Displaying Multiple, Synergistic and Competitive Hierarchical Adaptation. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (6), 2474–2483. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b13072>.
- (71) Jacobson, H.; Stockmayer, W. H. Intramolecular Reaction in Polycondensations. I. The Theory of Linear Systems. *J. Chem. Phys.* **1950**, *18* (12), 1600–1606. <https://doi.org/10.1063/1.1747547>.
- (72) Lehn, J.-M. Dynamers: Dynamic Molecular and Supramolecular Polymers. *Aust. J. Chem.* **2010**, *63*, 611–623. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2005.06.002>.
- (73) Lehn, J. M. Supramolecular Polymer Chemistry - Scope and Perspective. *Polym. Int.* **2002**, *51* (10), 825–839. <https://doi.org/10.1002/pi.852>.

- (74) Lehn, J. M. Dynamers: From Supramolecular Polymers to Adaptive Dynamic Polymers. *Adv. Polym. Sci.* **2013**. <https://doi.org/10.1007/12-2013-267>.
- (75) Kolomiets, E.; Lehn, J. M. Double Dynamers: Molecular and Supramolecular Double Dynamic Polymers. *Chem. Commun.* **2005**, No. 12, 1519–1521. <https://doi.org/10.1039/b418899c>.
- (76) Roy, N.; Bruchmann, B.; Lehn, J. M. DYNAMERS: Dynamic Polymers as Self-Healing Materials. *Chemical Society Reviews*. 2015. <https://doi.org/10.1039/c5cs00194c>.
- (77) Goral, V.; Nelen, M. I.; Eliseev, A. V.; Lehn, J.-M. Double-Level “Orthogonal” Dynamic Combinatorial Libraries on Transition Metal Template. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (4), 1347–1352. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1347>.
- (78) Liu, Y.; Liu, Y.; Wang, Q.; Han, Y.; Chen, H.; Tan, Y. Doubly Dynamic Hydrogel Formed by Combining Boronate Ester and Acylhydrazone Bonds. *Polymers (Basel)*. **2020**, *12* (2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/polym12020487>.
- (79) Fukuda, K.; Shimoda, M.; Sukegawa, M.; Nobori, T.; Lehn, J. M. Doubly Degradable Dynamers: Dynamic Covalent Polymers Based on Reversible Imine Connections and Biodegradable Polyester Units. *Green Chem.* **2012**. <https://doi.org/10.1039/c2gc35875a>.
- (80) Zhang, Y.; Qi, Y.; Ulrich, S.; Barboiu, M.; Ramström, O. Dynamic Covalent Polymers for Biomedical Applications. *Mater. Chem. Front.* **2020**, *4* (2), 489–506. <https://doi.org/10.1039/c9qm00598f>.
- (81) Chakma, P.; Konkolewicz, D. Dynamic Covalent Bonds in Polymeric Materials. *Angew. Chemie* **2019**, *131* (29), 9784–9797. <https://doi.org/10.1002/ange.201813525>.
- (82) Lehn, J. M. Dynamers: Dynamic Molecular and Supramolecular Polymers. In *Progress in Polymer Science (Oxford)*; 2005; Vol. 30, pp 814–831. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2005.06.002>.
- (83) Winne, J. M.; Leibler, L.; Du Prez, F. E. Dynamic Covalent Chemistry in Polymer Networks: A Mechanistic Perspective. *Polym. Chem.* **2019**, *10* (45), 6091–6108. <https://doi.org/10.1039/c9py01260e>.
- (84) Skene, W.; Lehn, J. Dynamers: Polyacylhydrazone Reversible Covalent Polymers, Component Exchange, and Constitutional Diversity. *Proceeding Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101* (22), 8270–8275. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401885101>.
- (85) Deng, G.; Tang, C.; Li, F.; Jiang, H.; Chen, Y. Covalent Cross-Linked Polymer Gels with Reversible Sol-Gel Transition and Self-Healing Properties. *Macromolecules* **2010**, *43* (3), 1191–1194. <https://doi.org/10.1021/ma9022197>.
- (86) Mahon, C. S.; Fulton, D. A. Templatation-Induced Re-Equilibration in Polymer-Scaffolded Dynamic Combinatorial Libraries Leads to Enhancements in Binding Affinities. *Chem. Sci.* **2013**, *4* (9), 3661–3666. <https://doi.org/10.1039/c3sc51413g>.
- (87) Mahon, C. S.; Jackson, A. W.; Murray, B. S.; Fulton, D. A. Templating a Polymer-Scaffolded Dynamic Combinatorial Library. *Chem Commun* **2011**, *47* (25), 7209–7211. <https://doi.org/10.1039/c1cc11998b>.
- (88) Ramström, O.; Lohmann, S.; Bunyapairoonsri, T.; Lehn, J. M. Dynamic Combinatorial Carbohydrate Libraries: Probing the Binding Site of the Concanavalin A Lectin. *Chem. - A Eur. J.* **2004**, *10* (7), 1711–1715. <https://doi.org/10.1002/chem.200305551>.
- (89) Chen, M.; Tian, J.; Liu, Y.; Cao, H.; Li, R.; Wang, J.; Wu, J.; Zhang, Q. Dynamic Covalent Constructed Self-Healing Hydrogel for Sequential Delivery of Antibacterial Agent and Growth

- Factor in Wound Healing. *Chem. Eng. J.* **2019**, *373* (May), 413–424. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.05.043>.
- (90) Ono, T.; Nobori, T.; Lehn, J. M. Dynamic Polymer Blends - Component Recombination between Neat Dynamic Covalent Polymers at Room Temperature. *Chem. Commun.* **2005**, No. 12, 1522–1524. <https://doi.org/10.1039/b418967a>.
- (91) Ono, T.; Fujii, S.; Nobori, T.; Lehn, J. M. Optodynamers: Expression of Color and Fluorescence at the Interface between Two Films of Different Dynamic Polymers. *Chem. Commun.* **2007**, No. 42, 4360–4362. <https://doi.org/10.1039/b712454f>.
- (92) Godoy-Alcántar, C.; Yatsimirsky, A. K.; Lehn, J. M. Structure-Stability Correlations for Imine Formation in Aqueous Solution. *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18* (10), 979–985. <https://doi.org/10.1002/poc.941>.
- (93) Poulsen, S. A. Direct Screening of a Dynamic Combinatorial Library Using Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17* (8), 1074–1080. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.03.017>.
- (94) Hartman, A. M.; Gierse, R. M.; Hirsch, A. K. H. Protein-Templated Dynamic Combinatorial Chemistry: Brief Overview and Experimental Protocol. *European J. Org. Chem.* **2019**, *2019* (22), 3581–3590. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201900327>.
- (95) Daines, A. M.; Robinson, H.; Glenny, M.; Williams, D. B. G.; Hinkley, S. F. R. Linear and Macrocyclic Water Soluble Polyacylhydrazones and Their Utilisation in Coatings. *Prog. Org. Coatings* **2018**, *121* (March), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2018.04.019>.
- (96) Hirsch, A. K. H.; Buhler, E.; Lehn, J. M. Biodynamers: Self-Organization-Driven Formation of Doubly Dynamic Proteoids. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (9), 4177–4183. <https://doi.org/10.1021/ja2099134>.
- (97) Moulin, E.; Cormos, G.; Giuseppone, N. Dynamic Combinatorial Chemistry as a Tool for the Design of Functional Materials and Devices. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (3), 1031–1049. <https://doi.org/10.1039/c1cs15185a>.
- (98) Furlan, R. L. E.; Otto, S.; Sanders, J. K. M. Supramolecular Templating in Thermodynamically Controlled Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (8), 4801–4804. <https://doi.org/10.1073/pnas.022643699>.
- (99) Kalia, J.; Raines, R. T. Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47* (39), 7523–7526. <https://doi.org/10.1002/anie.200802651>.
- (100) Kölmel, D. K.; Kool, E. T. Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (15), 10358–10376. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00090>.
- (101) Nguyen, R.; Huc, I. Optimizing the Reversibility of Hydrazone Formation for Dynamic Combinatorial Chemistry. *Chem. Commun.* **2003**, *8*, 942–943. <https://doi.org/10.1039/b211645f>.
- (102) Yildiz, I. A DFT Approach to the Mechanistic Study of Hydrozone Hydrolysis. *J. Phys. Chem. A* **2016**, *120* (20), 3683–3692. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.6b02882>.
- (103) Haugen, K. C.; Rodriguez, K. X.; Chavannavar, A. P.; Oliver, A. G.; Ashfeld, B. L. Phosphine-Mediated Addition of 1,2-Dicarbonyls to Diazenes: An Umpolung Approach toward N-Acyl Hydrazone Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56* (23), 3527–3530. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.01.030>.
- (104) Toro, P. M.; Jara, D. H.; Klahn, A. H.; Villaman, D.; Fuentealba, M.; Vega, A.; Pizarro, N.

- Spectroscopic Study of the E/Z Photoisomerization of a New Cyrhetyrenyl Acylhydrazone: A Potential Photoswitch and Photosensitizer†*; 2021; Vol. 97.
<https://doi.org/10.1111/php.13309>.
- (105) Van Dijken, D. J.; Kovaříček, P.; Ihrig, S. P.; Hecht, S. Acylhydrazones as Widely Tunable Photoswitches. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (47), 14982–14991.
<https://doi.org/10.1021/jacs.5b09519>.
- (106) Chaur, M. N.; Collado, D.; Lehn, J. M. Configurational and Constitutional Information Storage: Multiple Dynamics in Systems Based on Pyridyl and Acyl Hydrazones. *Chem. - A Eur. J.* **2011**, *17* (1), 248–258. <https://doi.org/10.1002/chem.201002308>.
- (107) Psarrou, M.; Kothri, M. G.; Vamvakaki, M. Photo- and Acid-Degradable Polyacylhydrazone–Doxorubicin Conjugates. *Polymers (Basel)*. **2021**, *13* (2461).
<https://doi.org/10.3390/polym13152461>.
- (108) Binauld, S.; Stenzel, M. H. Acid-Degradable Polymers for Drug Delivery: A Decade of Innovation. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (21), 2082–2102. <https://doi.org/10.1039/c2cc36589h>.
- (109) Levrard, B.; Ruff, Y.; Lehn, J. M.; Herrmann, A. Controlled Release of Volatile Aldehydes and Ketones by Reversible Hydrazone Formation - “Classical” Profragrances Are Getting Dynamic. *Chem. Commun.* **2006**, No. 28, 2965–2967. <https://doi.org/10.1039/b602312f>.
- (110) Kool, E. T.; Park, D. H.; Crisalli, P. Fast Hydrazone Reactants: Electronic and Acid/Base Effects Strongly Influence Rate at Biological PH. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (47), 17663–17666.
<https://doi.org/10.1021/ja407407h>.
- (111) Jencks, W. P. Mechanism and Catalysis of Simple Carbonyl Group Reactions. *Prog. Phys. Org. Chem.* **1964**, *2*, 63–128. <https://doi.org/10.1002/9780470171813.ch2>.
- (112) Cordes, E. H.; Jencks, W. P. General Acid Catalysis of Semicarbazone Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84* (22), 4319–4328. <https://doi.org/10.1021/ja00881a024>.
- (113) Cordes, E. H.; Jencks, W. P. On the Mechanism of Schiff Base Formation and Hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84* (22), 832–837. <https://doi.org/10.14314/polimery.2010.041>.
- (114) Higgs, P. L.; Ruiz-Sanchez, A. J.; Dalmina, M.; Horrocks, B. R.; Leach, A. G.; Fulton, D. A. Enhancing the Kinetics of Hydrazone Exchange Processes: An Experimental and Computational Study. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (12), 3218–3224.
<https://doi.org/10.1039/c9ob00058e>.
- (115) Dirksen, A.; Dirksen, S.; Hackeng, T. M.; Dawson, P. E. Nucleophilic Catalysis of Hydrazone Formation and Transimination: Implications for Dynamic Covalent Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (49), 15602–15603. <https://doi.org/10.1021/ja067189k>.
- (116) Bhat, V. T.; Caniard, A. M.; Luksch, T.; Brenk, R.; Campopiano, D. J.; Greaney, M. F. Nucleophilic Catalysis of Acylhydrazone Equilibration for Protein-Directed Dynamic Covalent Chemistry. *Nat. Chem.* **2010**, *2* (6), 490–497. <https://doi.org/10.1038/nchem.658>.
- (117) Crisalli, P.; Kool, E. T. Water-Soluble Organocatalysts for Hydrazone and Oxime Formation. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (3), 1184–1189. <https://doi.org/10.1021/jo302746p>.
- (118) Domaille, D. W.; Cha, J. N. Aniline-Terminated DNA Catalyzes Rapid DNA–Hydrazone Formation at Physiological PH. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (29), 3831–3833.
<https://doi.org/10.1039/c4cc00292j>.
- (119) Trausel, F.; Fan, B.; van Rossum, S. A. P.; van Esch, J. H.; Eelkema, R. Aniline Catalysed Hydrazone Formation Reactions Show a Large Variation in Reaction Rates and Catalytic

- Effects. *Adv. Synth. Catal.* **2018**, *360* (13), 2571–2576.
<https://doi.org/10.1002/adsc.201800342>.
- (120) Blanden, A. R.; Mukherjee, K.; Dilek, O.; Loew, M.; Bane, S. L. 4-Aminophenylalanine as a Biocompatible Nucleophilic Catalyst for Hydrazone Ligations at Low Temperature and Neutral PH. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (10), 1954–1961. <https://doi.org/10.1021/bc2001566>.
- (121) Crisalli, P.; Kool, E. T. Importance of Ortho Proton Donors in Catalysis of Hydrazone Formation. *Org. Lett.* **2013**, *15* (7), 1646–1649. <https://doi.org/10.1021/ol400427x>.
- (122) Drienovská, I.; Mayer, C.; Dulson, C.; Roelfes, G. A Designer Enzyme for Hydrazone and Oxime Formation Featuring an Unnatural Catalytic Aniline Residue. *Nat. Chem.* **2018**, *10* (9), 946–952. <https://doi.org/10.1038/s41557-018-0082-z>.
- (123) Zhou, Y.; Piergentili, I.; Hong, J.; Helm, M. P. V. Der; MacChione, M.; Li, Y.; Eelkema, R.; Luo, S. Indoline Catalyzed Acylhydrazone/Oxime Condensation under Neutral Aqueous Conditions. *Org. Lett.* **2020**, *22* (15), 6035–6040. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c02128>.
- (124) Morales, S.; Aceña, J. L.; García Ruano, J. L.; Cid, M. B. Sustainable Synthesis of Oximes, Hydrazones, and Thiosemicarbazones under Mild Organocatalyzed Reaction Conditions. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (20), 10016–10022. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b01912>.
- (125) Larsen, D.; Kietrys, A. M.; Clark, S. A.; Park, H. S.; Ekebergh, A.; Kool, E. T. Exceptionally Rapid Oxime and Hydrazone Formation Promoted by Catalytic Amine Buffers with Low Toxicity. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (23), 5252–5259. <https://doi.org/10.1039/c8sc01082j>.
- (126) Kool, E. T.; Crisalli, P.; Chan, K. M. Fast Alpha Nucleophiles: Structures That Undergo Rapid Hydrazone/Oxime Formation at Neutral PH. *Org. Lett.* **2014**, *16* (5), 1454–1457. <https://doi.org/10.1021/ol500262y>.
- (127) Cal, P. M. S. D.; Vicente, J. B.; Pires, E.; Coelho, A. V.; Veiros, L. F.; Cordeiro, C.; Gois, P. M. P. Iminoboronates: A New Strategy for Reversible Protein Modification. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (24), 10299–10305. <https://doi.org/10.1021/ja303436y>.
- (128) Cal, P. M. S. D.; Frade, R. F. M.; Cordeiro, C.; Gois, P. M. P. Reversible Lysine Modification on Proteins by Using Functionalized Boronic Acids. *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21* (22), 8182–8187. <https://doi.org/10.1002/chem.201500127>.
- (129) Bandyopadhyay, A.; Gao, J. Iminoboronate-Based Peptide Cyclization That Responds to PH, Oxidation, and Small Molecule Modulators. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (7), 2098–2101. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b12301>.
- (130) Bandyopadhyay, A.; McCarthy, K. A.; Kelly, M. A.; Gao, J. Targeting Bacteria via Iminoboronate Chemistry of Amine-Presenting Lipids. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms7561>.
- (131) Ponka, P.; Borova, J.; Neuwirt, J. A. N.; Fuchs, O. T. A.; Necas, E. A STUDY OF INTRACELLULAR IRON METABOLISM USING PYRIDOXAL ISONICOTINOYL HYDRAZONE AND OTHER SYNTHETIC CHELATING AGENTS. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *586* (28996), 278–297.
- (132) Edward, J. T.; Gauthier, M.; Chubb, F. L.; Ponka, P. Synthesis of New Acylhydrazones as Iron-Chelating Compounds. *J. Chem. Eng. Data* **1988**, *33* (4), 538–540. <https://doi.org/10.1021/je00054a044>.
- (133) Wu, Y. P.; Rahman, F. U.; Bhatti, M. Z.; Yu, S. B.; Yang, B.; Wang, H.; Li, Z. T.; Zhang, D. W. Acylhydrazone as a Novel “off-On-Off” Fluorescence Probe for the Sequential Detection of Al³⁺ and F⁻. *New J. Chem.* **2018**, *42* (18), 14978–14985. <https://doi.org/10.1039/c8nj02474j>.

- (134) Peng, H.; Peng, X.; Huang, J.; Huang, A.; Xu, S.; Zhou, J.; Huang, S.; Cai, X. Synthesis and Crystal Structure of a Novel Pyridine Acylhydrazone Derivative as a “Turn on” Fluorescent Probe for Al³⁺. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1212*, 128138. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128138>.
- (135) Feng, X.; Wu, Y.; Zhang, Q.; Liu, J. *Elaborated DNA-Binding Specialities, in Vitro Medicated Apoptosis and Restrained Malignancy of Neotype Water-Soluble Cationic Porphyrin Acylhydrazone Cu-Complex*; 2017; Vol. 147. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.08.006>.
- (136) Hou, B.; Li, Z.; Zhang, Q.; Chen, P.; Liu, J. Novel Water-Soluble Cu(II) Complexes Based on Acylhydrazone Porphyrin Ligands for DNA Binding and: In Vitro Anticancer Activity as Potential Therapeutic Targeting Candidates. *New J. Chem.* **2020**, *44* (36), 15387–15395. <https://doi.org/10.1039/d0nj02842h>.
- (137) Yousef Ebrahimipour, S.; Sheikshoaie, I.; Crochet, A.; Khaleghi, M.; Fromm, K. M. A New Mixed-Ligand Copper(II) Complex of (E)-N'-(2- Hydroxybenzylidene) Acetohydrazide: Synthesis, Characterization, NLO Behavior, DFT Calculation and Biological Activities. *J. Mol. Struct.* **2014**, *1072* (1), 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.05.024>.
- (138) Choudhary, S.; Morrow, J. R. Dynamic Acylhydrazone Metal Ion Complex Libraries: A Mixed-Ligand Approach to Increased Selectivity in Extraction. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, *41* (21), 4096–4098. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20021104\)41:21<4096::AID-ANIE4096>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20021104)41:21<4096::AID-ANIE4096>3.0.CO;2-0).
- (139) Dasgupta, S.; Karim, S.; Banerjee, S.; Saha, M.; Das Saha, K.; Das, D. Designing of Novel Zinc(II) Schiff Base Complexes Having Acyl Hydrazone Linkage: Study of Phosphatase and Anti-Cancer Activities. *Dalt. Trans.* **2020**, *49* (4), 1232–1240. <https://doi.org/10.1039/c9dt04636d>.
- (140) Gordillo Varela, M. A.; Zuluaga, F.; Chaur Valencia, M. N. Acylhydrazone-Based Dynamic Combinatorial Libraries: Study of the Thermodynamic/Kinetic Evolution, Configurational and Coordination Dynamics. *Rev. Colomb. Química* **2016**, *45* (3), 39. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n3.61408>.
- (141) dos Santos, P. V. P.; Ribeiro, C. M.; Pavan, F. R.; Corbi, P. P.; Bergamini, F. R. G.; Carvalho, M. A.; D'Oliveira, K. A.; Cuin, A. Promising Ag(I) Complexes with N-Acylhydrazones from Aromatic Aldehydes and Isoniazid against Multidrug Resistance in Tuberculosis. *J. Mol. Struct.* **2021**, *1234*, 130193. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130193>.
- (142) Hu, J. H.; Li, J. Bin; Qi, J.; Sun, Y. Selective Colorimetric and “Turn-on” Fluorimetric Detection of Cyanide Using an Acylhydrazone Sensor in Aqueous Media. *New J. Chem.* **2015**, *39* (5), 4041–4046. <https://doi.org/10.1039/c5nj00089k>.
- (143) Yang, Z.; He, Y.; Liu, X.; Zhao, S.; Yang, Z.; Yang, S. Highly Efficient Approach for Hypochlorous Acid Sensing in Water Samples and Living Cells Based on Acylhydrazone Schiff Base Functionalized Fluorescent Probes. *New J. Chem.* **2017**, *41* (20), 12250–12258. <https://doi.org/10.1039/c7nj01383c>.
- (144) Qi, H.; Bai, B.; Wang, H.; Zhang, M.; Chen, Y.; Wei, J.; Li, M.; Xin, H. Stimuli-Responsive Behavior of Naphthyl Acylhydrazone Derivative and Its Application in Information Security Protection. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *242*, 118768. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118768>.
- (145) Fuertes, A.; Juanes, M.; Granja, J. R.; Montenegro, J. Supramolecular Functional Assemblies: Dynamic Membrane Transporters and Peptide Nanotubular Composites. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (56), 7861–7871. <https://doi.org/10.1039/c7cc02997g>.
- (146) Lam, R. T. S.; Belenguer, A.; Roberts, S. L.; Naumann, C.; Jarrosson, T.; Otto, S.; Sanders, J. K.

- M. Amplification of Acetylcholine- Binding Catenanes from Dynamic Combinatorial Libraries. *Science (80-.)*. **2005**, *308*, 667–669.
- (147) Yin, Z. Y.; Hu, J. H.; Fu, Q. Q.; Gui, K.; Yao, Y. A Novel Long-Alkyl-Chained Acylhydrazone-Based Supramolecular Polymer Gel for the Ultrasensitive Detection and Separation of Multianalytes. *Soft Matter* **2019**, *15* (20), 4187–4191. <https://doi.org/10.1039/c9sm00624a>.
- (148) Guo, Z.; Ma, W.; Gu, H.; Feng, Y.; He, Z.; Chen, Q.; Mao, X.; Zhang, J.; Zheng, L. PH-Switchable and Self-Healable Hydrogels Based on Ketone Type Acylhydrazone Dynamic Covalent Bonds. *Soft Matter* **2017**, *13* (40), 7371–7380. <https://doi.org/10.1039/c7sm00916j>.
- (149) Kuhl, N.; Bode, S.; Bose, R. K.; Vitz, J.; Seifert, A.; Hoepfner, S.; Garcia, S. J.; Spange, S.; Van Der Zwaag, S.; Hager, M. D.; Schubert, U. S. Acylhydrazones as Reversible Covalent Crosslinkers for Self-Healing Polymers. *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25* (22), 3295–3301. <https://doi.org/10.1002/adfm.201501117>.
- (150) Ono, T.; Fujii, S.; Nobori, T.; Lehn, J. M. Soft-to-Hard Transformation of the Mechanical Properties of Dynamic Covalent Polymers through Component Incorporation. *Chem. Commun.* **2007**, No. 1, 46–48. <https://doi.org/10.1039/b612035k>.
- (151) Bogdanov, A. V.; Zaripova, I. F.; Voloshina, A. D.; Strobrykina, A. S.; Kulik, N. V.; Bukharov, S. V.; Voronina, J. K.; Khamatgalimov, A. R.; Mironov, V. F. Synthesis and Antimicrobial Activity Evaluation of Some Novel Water-Soluble Isatin-3-Acylhydrazones. *Monatshefte fur Chemie* **2017**, *149* (1), 111–117. <https://doi.org/10.1007/s00706-017-2049-y>.
- (152) Bogdanov, A. V.; Zaripova, I. F.; Mustafina, L. K.; Voloshina, A. D.; Sapunova, A. S.; Kulik, N. V.; Mironov, V. F. Synthesis and Study of Antimicrobial Activity of Water-Soluble Ammonium Acylhydrazones Based on New 1,ω-Alkylenebis(Isatins). *Russ. J. Gen. Chem.* **2019**, *89* (7), 1368–1376. <https://doi.org/10.1134/S107036321907003X>.
- (153) dos Santos Filho, J. M.; de Queiroz e Silva, D. M. A.; Macedo, T. S.; Teixeira, H. M. P.; Moreira, D. R. M.; Challal, S.; Wolfender, J. L.; Queiroz, E. F.; Soares, M. B. P. Conjugation of N-Acylhydrazone and 1,2,4-Oxadiazole Leads to the Identification of Active Antimalarial Agents. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, *24* (22), 5693–5701. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.09.013>.
- (154) Tatar, E.; Şenkardeş, S.; Sellitepe, H. E.; Küçükgül, Ş. G.; Karaoğlu, Ş. A.; Bozdeveci, A.; De Clercq, E.; Pannecouque, C.; Ben Hadda, T.; Küçükgül, I. Synthesis, and Prediction of Molecular Properties and Antimicrobial Activity of Some Acylhydrazones Derived from N-(Arylsulfonyl)Methionine. *Turkish J. Chem.* **2016**, *40* (3), 510–534. <https://doi.org/10.3906/kim-1509-21>.
- (155) Lazzarini, C.; Haranahalli, K.; Rieger, R.; Ananthula, H. K.; Desai, P. B.; Ashbaugh, A.; Linke, M. J.; Cushion, M. T.; Ruzsicska, B.; Haley, J.; Ojima, I.; Del Poeta, M. Acylhydrazones as Antifungal Agents Targeting the Synthesis of Fungal Sphingolipids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62* (5). <https://doi.org/10.1128/AAC.00156-18>.
- (156) Wang, Z.; Xie, D.; Gan, X.; Zeng, S.; Zhang, A.; Yin, L.; Song, B.; Jin, L.; Hu, D. Synthesis, Antiviral Activity, and Molecular Docking Study of Trans-Ferulic Acid Derivatives Containing Acylhydrazone Moiety. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (17), 4096–4100. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.07.038>.
- (157) Guilherme, F. D.; Simonetti, J. É.; Folquitto, L. R. S.; Reis, A. C. C.; Oliver, J. C.; Dias, A. L. T.; Dias, D. F.; Carvalho, D. T.; Brandão, G. C.; Souza, T. B. de. Synthesis, Chemical Characterization and Antimicrobial Activity of New Acylhydrazones Derived from Carbohydrates. *J. Mol. Struct.* **2019**, *1184*, 349–356.

- <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.02.045>.
- (158) Silva, G. A.; Costa, L. M. M.; Brito, F. C. F.; Miranda, A. L. P.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. New Class of Potent Antinociceptive and Antiplatelet 10H-Phenothiazine-1- Acylhydrazone Derivatives. *Bioorganic Med. Chem.* **2004**, *12* (12), 3149–3158. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.04.009>.
- (159) Rodrigues, D. A.; Ferreira-Silva, G. A.; Ferreira, A. C. S.; Fernandes, R. A.; Kwee, J. K.; SantAnna, C. M. R.; Ionta, M.; Fraga, C. A. M. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Novel N-Acylhydrazone Derivatives as Potent Histone Deacetylase 6/8 Dual Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (2), 655–670. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01525>.
- (160) Congiu, C.; Onnis, V. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Acylhydrazone Derivatives as Potential Antitumor Agents. *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, *21* (21), 6592–6599. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.08.026>.
- (161) Gupta, R.; Kumar, P.; Narasimhan, B. Synthesis, Antimicrobial Evaluation and QSAR Studies of Monochloroacetic Acid Derivatives. *Arab. J. Chem.* **2017**, *10*, S909–S920. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.12.027>.
- (162) Sreenivasachary, N.; Lehn, J. M. Gelation-Driven Component Selection in the Generation of Constitutional Dynamic Hydrogels Based on Guanine-Quartet Formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (17), 5938–5943. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501663102>.
- (163) Sreenivasachary, N.; Hickman, D. T.; Sarazin, D.; Lehn, J. M. DyNAs: Constitutional Dynamic Nucleic Acid Analogues. *Chem. - A Eur. J.* **2006**, *12* (33), 8581–8588. <https://doi.org/10.1002/chem.200600625>.
- (164) Buhler, E.; Sreenivasachary, N.; Candau, S. J.; Lehn, J. M. Modulation of the Supramolecular Structure of G-Quartet Assemblies by Dynamic Covalent Decoration. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (33), 10058–10059. <https://doi.org/10.1021/ja072109d>.
- (165) Dascalu, A. E.; Ghinet, A.; Lipka, E.; Furman, C.; Rigo, B.; Fayeulle, A.; Billamboz, M. Design, Synthesis and Evaluation of Hydrazine and Acyl Hydrazone Derivatives of 5-Pyrrolidin-2-One as Antifungal Agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2020**, *30* (13), 127220. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127220>.
- (166) Fu, J.; Fu, H.; Dieu, M.; Halloum, I.; Kremer, L.; Xia, Y.; Pan, W.; Vincent, S. P. Identification of Inhibitors Targeting: Mycobacterium Tuberculosis Cell Wall Biosynthesis via Dynamic Combinatorial Chemistry. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (77), 10632–10635. <https://doi.org/10.1039/c7cc05251k>.
- (167) Mondal, M.; Radeva, N.; Köster, H.; Park, A.; Potamitis, C.; Zervou, M.; Klebe, G.; Hirsch, A. K. H. Structure-Based Design of Inhibitors of the Aspartic Protease Endothiapepsin by Exploiting Dynamic Combinatorial Chemistry. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (12), 3259–3263. <https://doi.org/10.1002/anie.201309682>.
- (168) Huang, R.; Leung, I. K. H. Protein-Directed Dynamic Combinatorial Chemistry: A Guide to Protein Ligand and Inhibitor Discovery. *Molecules* **2016**, *21* (7). <https://doi.org/10.3390/molecules21070910>.
- (169) Vicini, P.; Incerti, M.; La Colla, P.; Loddo, R. Anti-HIV Evaluation of Benzo[d]Isothiazole Hydrazones. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44* (4), 1801–1807. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.05.030>.
- (170) Bunyapaiboonsri, T.; Ramström, O.; Lohmann, S.; Lehn, J. M.; Peng, L.; Goeldner, M. Dynamic Deconvolution of a Pre-Equilibrated Dynamic Combinatorial Library of Acetylcholinesterase

- Inhibitors. *ChemBioChem* **2001**, *2* (6), 438–444. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20010601\)2:6<438::AID-CBIC438>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20010601)2:6<438::AID-CBIC438>3.0.CO;2-J).
- (171) Bunyapaiboonsri, T.; Ramström, H.; Ramström, O.; Haiech, J.; Lehn, J. M. Generation of Bis-Cationic Heterocyclic Inhibitors of Bacillus Subtilis HPr Kinase/Phosphatase from a Ditopic Dynamic Combinatorial Library. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (26), 5803–5811. <https://doi.org/10.1021/jm030917j>.
- (172) Ramström, O.; Lehn, J.-M. In Situ Generation and Screening of a Dynamic Combinatorial Carbohydrate Library against Concanavalin A. *ChemBioChem* **2000**, *1* (1), 41–48. [https://doi.org/10.1016/S0096-6347\(40\)90310-6](https://doi.org/10.1016/S0096-6347(40)90310-6).
- (173) Clipson, A. J.; Bhat, V. T.; McNae, I.; Caniard, A. M.; Campopiano, D. J.; Greaney, M. F. Bivalent Enzyme Inhibitors Discovered Using Dynamic Covalent Chemistry. *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18* (34), 10562–10570. <https://doi.org/10.1002/chem.201201507>.
- (174) Ulrich, S.; Dumy, P. Probing Secondary Interactions in Biomolecular Recognition by Dynamic Combinatorial Chemistry. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (44), 5810–5825. <https://doi.org/10.1039/c4cc00263f>.
- (175) Su, D.; Coste, M.; Diaconu, A.; Barboiu, M.; Ulrich, S. Cationic Dynamic Covalent Polymers for Gene Transfection. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8* (41), 9385–9403. <https://doi.org/10.1039/d0tb01836h>.
- (176) Liu, Y.; Lehn, J. M.; Hirsch, A. K. H. Molecular Biodynamers: Dynamic Covalent Analogues of Biopolymers. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (2), 376–386. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00594>.
- (177) Michel, R. H.; Murphey, W. A. Polymers from the Condensation of Dihydrazides with Dialdehydes and Diketones. *J. Appl. Polym. Sci.* **1963**, *7* (2), 617–624. <https://doi.org/10.1002/app.1963.070070218>.
- (178) Cousins, G. R. L.; Poulsen, S. A.; Sanders, J. K. M. Dynamic Combinatorial Libraries of Pseudo-Peptide Hydrazone Macrocycles. *Chem. Commun.* **1999**, No. 16, 1575–1576. <https://doi.org/10.1039/a904091i>.
- (179) Furlan, R. L. E.; Cousins, G. R. L.; Sanders, J. K. M. Molecular Amplification in a Dynamic Combinatorial Library Using Non-Covalent Interactions. *Chem. Commun.* **2000**, No. 18, 1761–1762. <https://doi.org/10.1039/b006149m>.
- (180) Bulos, F.; Roberts, S. L.; Furlan, R. L. E.; Sanders, J. K. M. Molecular Amplification of Two Different Receptors Using Diastereomeric Templates. *Chem. Commun.* **2007**, No. 29, 3092–3093. <https://doi.org/10.1039/b705620f>.
- (181) Voshell, S. M.; Lee, S. J.; Gagné, M. R. The Discovery of an Enantioselective Receptor for (-)-Adenosine from a Racemic Dynamic Combinatorial Library. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (38), 12422–12423. <https://doi.org/10.1021/ja0647699>.
- (182) Bouillon, C.; Paolantoni, D.; Rote, J. C.; Bessin, Y.; Peterson, L. W.; Dumy, P.; Ulrich, S. Degradable Hybrid Materials Based on Cationic Acylhydrazone Dynamic Covalent Polymers Promote Dna Complexation through Multivalent Interactions. *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20* (45), 14705–14714. <https://doi.org/10.1002/chem.201403695>.
- (183) Roberts, G. A. F.; Thomas, Z. M. Polymers from Carbohydrate-Based Monomers, 1 Poly (Acylhydrazone) s from D-Glucarodihydrazide and Related Compounds. *Makromol Chem* **1981**, *182*, 2611–2617.

- (184) Beeren, S. R.; Pittelkow, M.; Sanders, J. K. M. From Static to Dynamic: Escaping Kinetic Traps in Hydrazone-Based Dynamic Combinatorial Libraries. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (26), 7359–7361. <https://doi.org/10.1039/c1cc12268a>.
- (185) Folmer-Andersen, J. F.; Lehn, J. M. Constitutional Adaptation of Dynamic Polymers: Hydrophobically Driven Sequence Selection in Dynamic Covalent Polyacylhydrazones. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, 48 (41), 7664–7667. <https://doi.org/10.1002/anie.200902487>.
- (186) Folmer-Andersen, J. F.; Buhler, E.; Candau, S. J.; Joulie, S.; Schmutz, M.; Lehn, J. M. Cooperative, Bottom-up Generation of Rigid-Rod Nanostructures through Dynamic Polymer Chemistry. *Polym. Int.* **2010**, 59 (11), 1477–1491. <https://doi.org/10.1002/pi.2864>.
- (187) Folmer-Andersen, J. F.; Lehn, J. M. Thermo-responsive Dynamers: Thermally Induced, Reversible Chain Elongation of Amphiphilic Poly(Acylhydrazones). *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (28), 10966–10973. <https://doi.org/10.1021/ja2035909>.
- (188) Zhang, X.; Liu, T.; Yan, J.; Liu, K.; Li, W.; Zhang, A. Multiple-Responsive Dendronized Hyperbranched Polymers. *ACS Omega* **2019**, 4 (4), 7667–7674. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00291>.
- (189) Gehin, C.; Montenegro, J.; Bang, E. K.; Cajaraville, A.; Takayama, S.; Hirose, H.; Futaki, S.; Matile, S.; Riezman, H. Dynamic Amphiphile Libraries to Screen for the “Fragrant” Delivery of siRNA into HeLa Cells and Human Primary Fibroblasts. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (25), 9295–9298. <https://doi.org/10.1021/ja404153m>.
- (190) Priegue, J. M.; Crisan, D. N.; Martínez-Costas, J.; Granja, J. R.; Fernández-Trillo, F.; Montenegro, J. In Situ Functionalized Polymers for siRNA Delivery. *Angew. Chemie* **2016**, 128 (26), 7618–7621. <https://doi.org/10.1002/ange.201601441>.
- (191) Priegue, J. M.; Lostalé-Seijo, I.; Crisan, D.; Granja, J. R.; Fernández-Trillo, F.; Montenegro, J. Different-Length Hydrazone Activated Polymers for Plasmid DNA Condensation and Cellular Transfection. *Biomacromolecules* **2018**, 19 (7), 2638–2649. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00252>.
- (192) Juanes, M.; Creese, O.; Fernández-Trillo, P.; Montenegro, J. Messenger RNA Delivery by Hydrazone-Activated Polymers. *Medchemcomm* **2019**, 10 (7), 1138–1144. <https://doi.org/10.1039/c9md00231f>.
- (193) Louzao, I.; García-Fandiño, R.; Montenegro, J. Hydrazone-Modulated Peptides for Efficient Gene Transfection. *J. Mater. Chem. B* **2017**, 5 (23), 4426–4434. <https://doi.org/10.1039/c7tb00179g>.
- (194) Ruiz-Sanchez, A. J.; Higgs, P. L.; Peters, D. T.; Turley, A. T.; Dobson, M. A.; North, A. J.; Fulton, D. A. Probing the Surfaces of Biomacromolecules with Polymer-Scaffolded Dynamic Combinatorial Libraries. *ACS Macro Lett.* **2017**, 6 (9), 903–907. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.7b00561>.
- (195) Xu, J.; Zhao, S.; Zhang, S.; Pei, J.; Li, Y.; Zhang, Y.; He, X.; Hu, L. Development of a Multivalent Acetylcholinesterase Inhibitor via Dynamic Combinatorial Chemistry. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, 150 (xxxx), 1184–1191. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.127>.
- (196) Xu, J.; Zhang, S.; Zhao, S.; Hu, L. Identification and Synthesis of an Efficient Multivalent E. Coli Heat Labile Toxin Inhibitor — A Dynamic Combinatorial Chemistry Approach. *Bioorganic Med. Chem.* **2020**, 28 (9), 115436. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115436>.
- (197) Liu, Y.; Stuart, M. C. A.; Buhler, E.; Lehn, J. M.; Hirsch, A. K. H. Proteoid Dynamers with Tunable Properties. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, 26 (34), 6297–6305.

- <https://doi.org/10.1002/adfm.201601612>.
- (198) Ruff, Y.; Lehn, J. M. Glycodynamers: Fluorescent Dynamic Analogues of Polysaccharides. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47* (19), 3556–3559. <https://doi.org/10.1002/anie.200703490>.
- (199) Ruff, Y.; Lehn, J. M. Glycodynamers: Dynamic Analogs of Arabinofuranoside Oligosaccharides. *Biopolymers* **2008**, *89* (5), 486–496. <https://doi.org/10.1002/bip.20885>.
- (200) Kirker, K. R.; Luo, Y.; Nielson, J. H.; Shelby, J.; Prestwich, G. D. Glycosaminoglycan Hydrogel Films as Bio-Interactive Dressings for Wound Healing. *Biomaterials* **2002**, *23* (17), 3661–3671. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00100-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00100-X).
- (201) Bouillon, C.; Bessin, Y.; Poncet, F.; Gary-Bobo, M.; Dumy, P.; Barboiu, M.; Bettache, N.; Ulrich, S. Biomolecular Dynamic Covalent Polymers for DNA Complexation and SiRNA Delivery. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (44), 7239–7246. <https://doi.org/10.1039/C8TB01278D>.
- (202) Liao, Z.; Liu, Y.; Han, S. F.; Wang, D.; Zheng, J. Q.; Zheng, X. J.; Jin, L. P. A Novel Acylhydrazone-Based Derivative as Dual-Mode Chemosensor for Al³⁺, Zn²⁺ and Fe³⁺ and Its Applications in Cell Imaging. *Sensors Actuators, B Chem.* **2017**, *244*, 914–921. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.074>.
- (203) Bartolami, E.; Bessin, Y.; Bettache, N.; Gary-Bobo, M.; Garcia, M.; Dumy, P.; Ulrich, S. Multivalent DNA Recognition by Self-Assembled Clusters: Deciphering Structural Effects by Fragments Screening and Evaluation as SiRNA Vectors. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (36), 9427–9438. <https://doi.org/10.1039/c5ob01404b>.
- (204) Bartolami, E.; Bessin, Y.; Gervais, V.; Dumy, P.; Ulrich, S. Dynamic Expression of DNA Complexation with Self-Assembled Biomolecular Clusters. *Angew. Chemie* **2015**, *127* (35), 10321–10325. <https://doi.org/10.1002/ange.201504047>.
- (205) Reuther, J. F.; Goodrich, A. C.; Escamilla, P. R.; Lu, T. A.; Del Rio, V.; Davies, B. W.; Anslyn, E. V. A Versatile Approach to Noncanonical, Dynamic Covalent Single- and Multi-Loop Peptide Macrocycles for Enhancing Antimicrobial Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (10), 3768–3774. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b00046>.
- (206) Reuther, J. F.; Dees, J. L.; Kolesnichenko, I. V.; Hernandez, E. T.; Ukraintsev, D. V.; Guduru, R.; Whiteley, M.; Anslyn, E. V. Dynamic Covalent Chemistry Enables Formation of Antimicrobial Peptide Quaternary Assemblies in a Completely Abiotic Manner. *Nat. Chem.* **2018**, *10* (1), 45–50. <https://doi.org/10.1038/NCHEM.2847>.
- (207) Hickman, D. T.; Sreenivasachary, N.; Lehn, J. M. Synthesis of Components for the Generation of Constitutional Dynamic Analogues of Nucleic Acids. *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91* (1), 1–20. <https://doi.org/10.1002/hlca.200890022>.
- (208) Cecioni, S. Approche Multivalente Des Interactions Saccharides - Lectines : Synthèse de Glycoclusters et Analyse de La Reconnaissance Biomoléculaire, UCBL, 2010.
- (209) Pascal, Y. Les Glycodyn[n]Arènes Comme Ligands Multivalents de Lectines : Une Étude Par Chimie Combinatoire Dynamique, UCBL, 2018.
- (210) Demontrond, F. Des Glycodyn[n]Arènes Aux Polymères Dynamiques Comme Ligands Multivalents de Lectines, Université Claude Bernard Lyon 1, 2021.
- (211) Folmer-andersen, J. F.; Lehn, J. Thermo-responsive Dynamers: Thermally Induced, Reversible Chain Elongation of Amphiphilic Poly(Acylhydrazones). *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 10966–10973.
- (212) Tosoh. Type of Polymer TSKgel PW Columns for Analysis of Water-Soluble Polymers <https://www.separations.eu.tosohbioscience.com/solutions/hplc-products/size->

- exclusion/aqueous-size-exclusion-gfc/tskgel-pw-columns (accessed 2022 -05 -05).
- (213) Lohmann, S. *Mise Au Point de Bibliothèques Combinatoires Dynamiques Pour l'application à Des Cibles Biologiques*, Université Louis Pasteur, 2003.
- (214) MolView, Model Jmol [https://molview.org/?smiles=N1\(N\(\[H\]\)C\(=O\)CN\(C\)CC1=O\)\[H\]](https://molview.org/?smiles=N1(N([H])C(=O)CN(C)CC1=O)[H]) (accessed 2022 -05 -17).
- (215) Cox, R. A.; Yates, K. Hydrolysis Mechanisms for Acylhydrazines in Aqueous Sulfuric Acid, Determined Using the Excess Acidity Method. *Can. J. Chem.* **1984**, *62* (12), 2948–2948. <https://doi.org/10.1139/v84-502>.
- (216) Mashima, M.; Ikeda, F. Ultraviolet Spectra of Hydrazide Solutions and Their Hydrolysis. I. Hydrolysis of Formhydrazide in Acid Solutions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1973**, *46* (5), 1366–1371.
- (217) Mashima, M.; Ikeda, F. Ultraviolet Spectra of Hydrazide Solutions and Their Hydrolysis. II. Hydrolysis of Formhydrazide in Alkaline Solutions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1973**, *46* (5), 1371–1374.
- (218) Tsuji, J.; Nagashima, T.; Qui, N. T.; Takayanagi, H. Facile Oxidative Conversion of Hydrazides of Carboxylic Acids to Corresponding Acids, Esters and Amides Using Copper Compounds. *Tetrahedron* **1980**, *36* (10), 1311–1315. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(80\)85042-3](https://doi.org/10.1016/0040-4020(80)85042-3).
- (219) Zhang, Y. G.; Liu, X. L.; He, Z. Y.; Li, X. M.; Kang, H. J.; Tian, S. K. Palladium/Copper-Catalyzed Oxidative Arylation of Terminal Alkenes with Aryl Hydrazides. *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20* (10), 2765–2769. <https://doi.org/10.1002/chem.201304696>.
- (220) Zhu, F.; Zou, M.; Shao, X.; Li, Z. On-Water, Catalyst-Free and Room-Temperature Construction of 2-Aryl-1,3,4-Oxadiazole Derivatives from 1,1-Dichloro-2-Nitroethene and Hydrazides. *RSC Adv.* **2015**, *5* (76), 61752–61758. <https://doi.org/10.1039/c5ra11213c>.
- (221) Milletti, F.; Storch, L.; Goracci, L.; Bendels, S.; Wagner, B.; Kansy, M.; Cruciani, G. Extending PKa Prediction Accuracy: High-Throughput PKa Measurements to Understand PKa Modulation of New Chemical Series. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (9), 4270–4279. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.06.026>.
- (222) Cugnon de Sévricourt, M.; Robba, M. [1] Benzofuro [2,3-d] Pyridazines II. Etude Des Benzofuropyridazones. *J. Heterocycl. Chem.* **1977**, *14*, 777.
- (223) Loh, W.; Brinatti, C.; Tam, K. C. Use of Isothermal Titration Calorimetry to Study Surfactant Aggregation in Colloidal Systems. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2016**, *1860* (5), 999–1016. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.10.003>.
- (224) Emerson, M. F.; Holtzer, A. On the Ionic Strength Dependence of Micelle Number. II. *J. Phys. Chem.* **1967**, *71* (6), 1898–1907. <https://doi.org/10.1021/j100865a057>.
- (225) Zheng, F.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Han, Y.; Zhang, L.; Bouyssiere, B.; Shi, Q. Aggregation of Porphyrins and Fragmentation of Porphyrin Ions: Characterized by TIMS-TOF MS and FT-ICR MS. *Fuel* **2021**, *289* (December 2020), 119889. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119889>.
- (226) Medoš, Ž.; Plechkova, N. V.; Friesen, S.; Buchner, R.; Bešter-Rogač, M. Insight into the Hydration of Cationic Surfactants: A Thermodynamic and Dielectric Study of Functionalized Quaternary Ammonium Chlorides. *Langmuir* **2019**, *35* (10), 3759–3772. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03993>.
- (227) Medoš, Ž.; Friesen, S.; Buchner, R.; Bešter-Rogač, M. Interplay between Aggregation Number, Micelle Charge and Hydration of Catanionic Surfactants. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*

- (18), 9998–10009. <https://doi.org/10.1039/d0cp00877j>.
- (228) Medoš, Ž.; Čobanov, I.; Bešter-Rogač, M.; Šarac, B. Usually Overlooked Problems Related with Measurements of High-Heat Effects Using Power Compensation Isothermal Titration Calorimetry. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2021**, *145* (1), 87–96. <https://doi.org/10.1007/s10973-020-09663-2>.
- (229) Fernandez-Alvarez, R.; Medoš, Ž.; Tošner, Z.; Zhigunov, A.; Uchman, M.; Hervø-Hansen, S.; Lund, M.; Bešter-Rogač, M.; Matějčíček, P. Total Description of Intrinsic Amphiphile Aggregation: Calorimetry Study and Molecular Probing. *Langmuir* **2018**, *34* (47), 14448–14457. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03462>.

Annexes

ANNEXE 1 : Spectres RMN ^1H des monomères DHS et TDC

Le spectre RMN ^1H du DHS (Figure 169) montrent des protons tout à fait identifiables et quantifiables. Les protons liés aux azotes terminaux (s ; $\delta = 4,12$ ppm ; 4H), les protons liés aux azotes intérieurs (s ; $\delta = 8,95$ ppm ; 2H) ainsi que les protons liés aux carbones (s ; $\delta = 2,24$ ppm ; 4H) sont détectables. L'eau présente sur le spectre à 3,32 ppm peut provenir de traces d'eau dans le DMSO-d₆ hygroscopique, ou de la poudre hygroscopique, elle aussi, de DHS. Des pics parasites sont détectés (singulet à 4,32 ppm et triplet à 2,59 ppm) n'ont pas été attribués car ne correspondant pas à des impuretés usuelles.

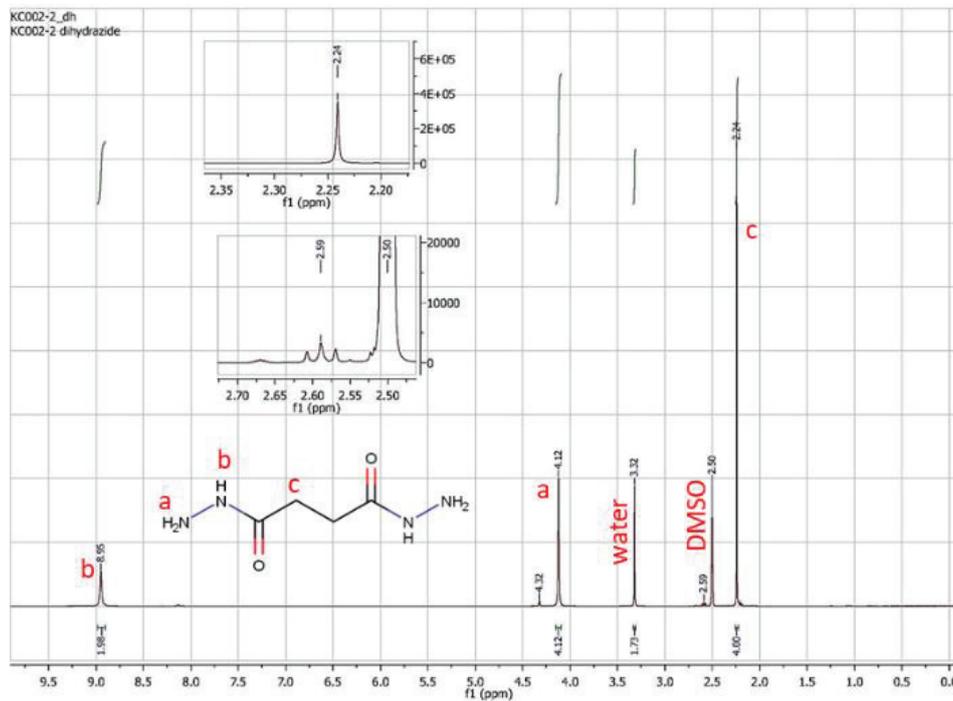


Figure 169 - Spectre RMN ^1H du DHS (298 K, 400 MHz) dans le DMSO-d₆

Le spectre RMN ^1H du TDC dans le DMSO-d₆ est présenté en Figure 170. Les protons des aldéhydes (s ; $\delta = 10,07$ ppm ; 2H) et les protons issus du cycle (s ; $\delta = 8,15$ ppm ; 2H) sont détectables, ainsi que des protons provenant de la présence d'eau à 3,32 ppm, pour les mêmes raisons que le spectre du DHS. Ce qui ressort de ces analyses est que les monomères sont purs, malgré quelques pics parasites pour le DHS, dont la provenance n'a pas été déterminée (car ne provenant pas d'impuretés ordinaires).

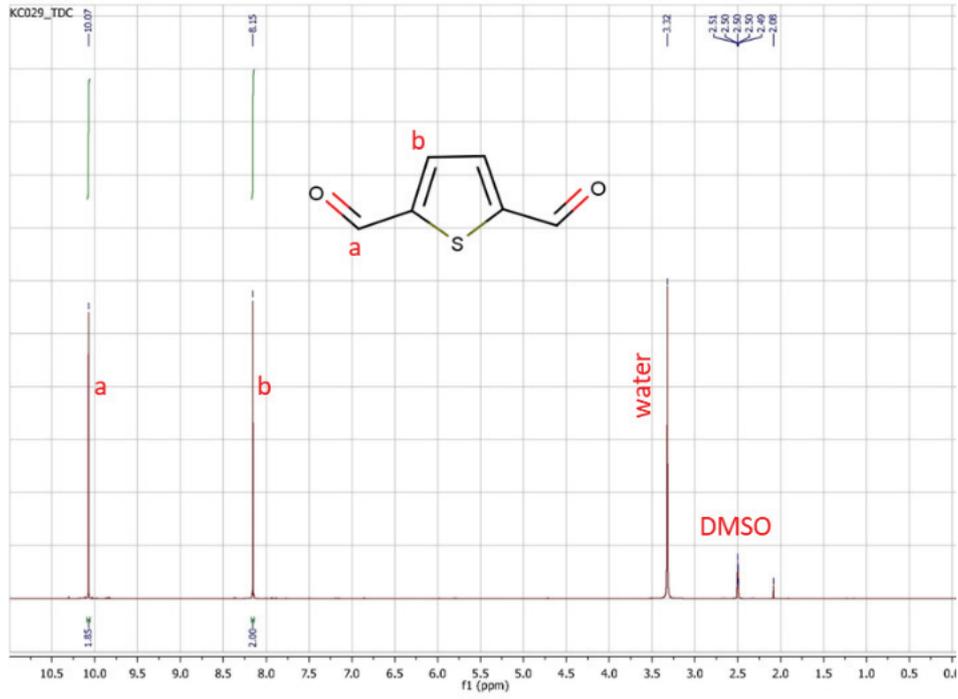


Figure 170 - Spectre RMN ^1H du TDC (298 K, 400 MHz), dans le DMSO-d_6

ANNEXE 2 : Analyse par SEC des monomères Lehn, mise en évidence indirecte d'interactions avec la phase stationnaire et de la déprotection des dialdéhydes protégés.

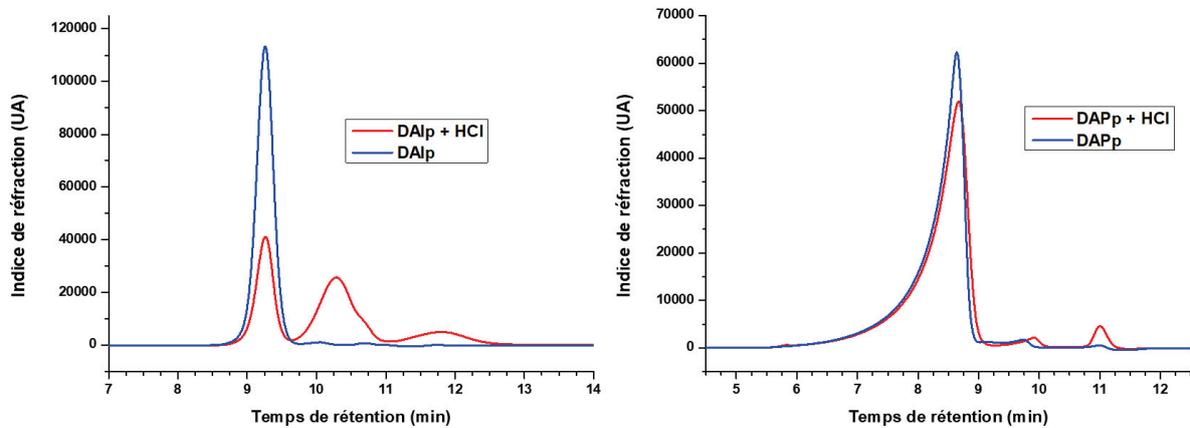


Figure 171 - Comparaison d'une solution de dialdéhyde protégé (en bleu) avec une solution de dialdéhyde déprotégé (1 v% HCl, pendant une nuit, en rouge), à 10 mM dans l'eau. A gauche : DAlp, à droite : DAPp.

ANNEXE 3 : Analyse par LC-MS des polymères Lehn et identification des oligomères, exemple de la réaction DHI+DAG

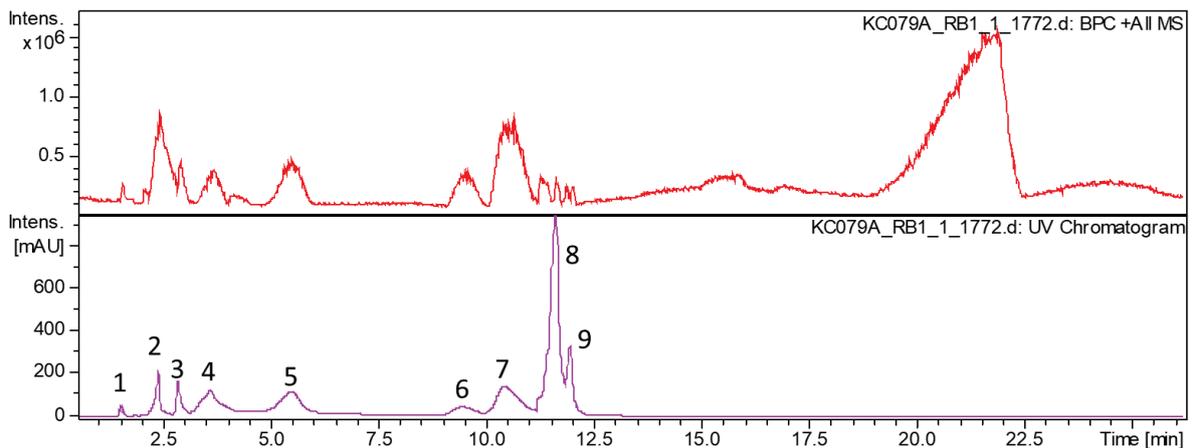


Figure 172 - Chromatogrammes issus des analyses LC-MS de la réaction DHI-DAG (détection MS en rouge, détection UV 250 nm en violet). Identification des espèces correspondant aux pics UV : Pic 1 : DHI hydrolysé, Pic 2 : DHI, Pic 3 : DHI cyclisé, Pic 4 : DHI-DAG cycle (fonction acylhydrazone et carbinolamine), Pic 5 : DHI-DAG cycle (fonction acylhydrazone), Pic 6 : DHI-DAG-DHI, Pic 7 : DHI-DAGp, Pic 8 : DHI-DAGp, Pic 9 : DAGp.

ANNEXE 4 : Spectres de masse MALDI-TOF positif d'un mélange DHU+GA avec ajout d'acide, et comparaison avec les mêmes conditions sans ajout d'acide

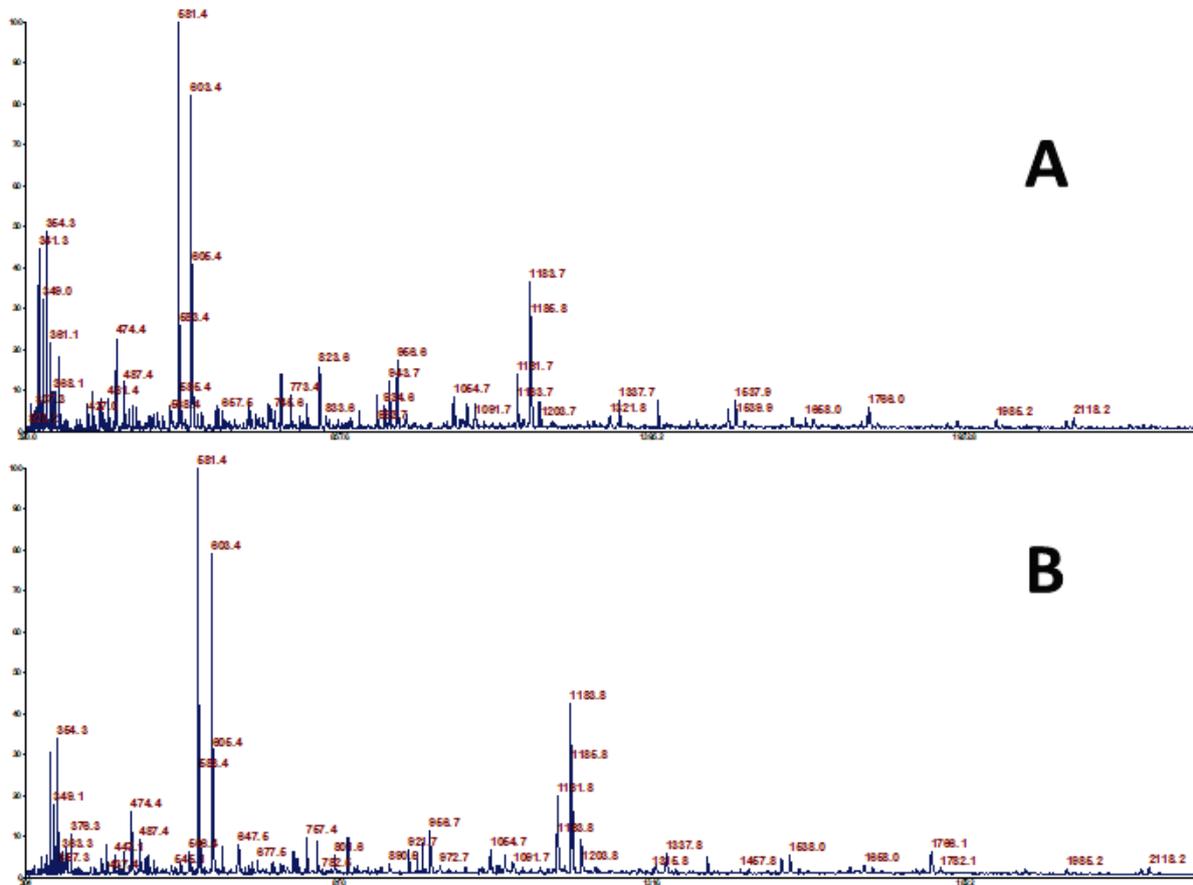


Figure 173 - Spectre de masse MALDI-TOF positif (matrice DHB) d'un mélange extemporané de DHU et de GA (1 mM/monomère). (A) Spectre obtenu avec un mélange contenant 1v% de AcOH. (B) Spectre obtenu sans ajout d'acide.

Univ Lyon, CNRS, UMR 5223, Ingénierie des Matériaux Polymères, Université Claude Bernard Lyon1,
INSA Lyon, Université Jean Monnet, F-69622 Villeurbanne Cédex, France

Krouidigezh, sintezenn hag arouezadur poliacilhidrazonoù dourzileizh gant ur raktres enepbakteriel.

Gerioù-alc’hwez : dialdehid, dihidrazid, dinamerioù, dourzileizh, emgenstrolladoù, poliacilhidrazon.

Diverradenn : En tezenn-mañ war un doktolerezh kimiezh e studiomp an sintezenn hag an arouezadur poliacilhidrazonoù en dourzileizhenn, dre dihidrazidoù ha dialdehidoù evit cheñch anezho er molekulennoù yac’hadel. Gant ur studiadenn kentañ tro dro monomerioù war ar marc’had hon eus gwelet eo meret ar polimerioù, diaes eo disolviñ anezho en dour koulskoude. Gant trenkenn e vez kataliset furmidigezh fonksionoù acilhidrazon, lakaet anat en DMSO eo bet ar wikefre savet dre daou brantad . Un eil studiadenn hon eus graet gant monomerioù a c’hell bezañ disolveta en dour, oc’h ober ur reaktadenn en metoù paotetek. Polimerioù a gavomp a zo, dreist-holl, oligomerioù a-vareoù gant mas skañv koulskoude. Ar reaktadennoù eilrenk war ar monomerioù en dour a c’hellfe displegañ an dra-se, an hidroliz war an dihidrazid peurgetket, dre ur wikefre gant pH neutrel. Labouret hon eus en trede studiadenn diwar an arouezadur emgenstrolladoù meret gant un dihidrazid, o furmiñ dafaroù sferek kant nanometr o diametr, o ferzh a cheñch hervezh an amzer hag ar pH.

Conception, synthèse et caractérisation de polyacylhydrazones hydrosolubles à but antibactérien.

Mots-clés : auto-assemblages, dialdéhyde, dihydrazide, dynamères, hydrosolubilité, polyacylhydrazone.

Résumé : Afin de proposer de nouvelles voies de lutte contre la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* en utilisant des ligands assemblés par chimie combinatoire dynamique, ces travaux de thèse ont porté sur l'élaboration et la caractérisation de polyacylhydrazones en milieu aqueux à partir de différents monomères dihydrazides et dialdéhydes. Une première étude, centrée sur des monomères commerciaux, a permis de montrer la formation des polymères, mais aussi leur faible hydrosolubilité. Il a été également démontré que l'ajout d'acide catalysait la création des fonctions acylhydrazone, dont le mécanisme en deux étapes a été mis en évidence dans le DMSO. Une deuxième étude utilisant des monomères synthétisés par un partenaire du projet, et plus solubles dans l'eau, a été menée. Grâce à ces monomères, la réaction a pu être réalisée dans un milieu plus concentré. Cependant, les polymères obtenus étaient majoritairement des oligomères cycliques et de faible masse molaire. Des réactions secondaires des monomères, identifiées dans l'eau, pourraient expliquer cette limitation, notamment l'hydrolyse des dihydrazides dont le mécanisme a été démontré à pH neutre et catalysé en pH acide. Enfin, une troisième étude s'est intéressée aux polyacylhydrazones conçus à partir d'un dihydrazide particulier, présentant un caractère auto-associatif. Les objets sphériques formés par celui-ci en milieu aqueux, d'une centaine de nanomètre de diamètre, se sont révélés être sensibles au pH et évoluer au cours du temps.

Design, synthesis and characterization of water-soluble polyacylhydrazones with an antibacterial purpose.

Keywords: dialdehyde, dihydrazide, dynamers, polyacylhydrazone, self-assemblies, water solubility.

Abstract: In order to develop new ways to fight bacteria *Pseudomonas aeruginosa* by using assembled ligands designed through dynamic combinatorial chemistry, this thesis dealt with the elaboration and characterization of polyacylhydrazones in aqueous medium from several dihydrazide and dialdehyde monomers. A first study, focused on commercial monomers, has shown that a polymer was formed, but hardly soluble in water. It also has been demonstrated that the addition of acid catalyzed the formation of acylhydrazone functions, whose mechanism was demonstrated in DMSO. A second study was carried out by using more water-soluble monomers, synthesized by a project partner. Thanks to these monomers, the reaction could be performed at higher concentrations. However, the obtained polymers were mainly cyclic oligomers with a low molar mass. Side reactions of monomers in water could explain this limitation, particularly the hydrolysis of dihydrazides, through a mechanism demonstrated at neutral pH and catalyzed in acidic conditions. Finally, a third study was performed on polyacylhydrazones made from a particular dihydrazide presenting a self-assembling behavior. The spherical objects (≈ 100 nm) formed by this monomer in an aqueous medium were characterized and found to be pH- and time-sensitive.