



HAL
open science

**Synthèse d'agents de contrôle originaux pour l'obtention
de copolymères α -fonctionnels par le procédé RAFT.
Application à l'élaboration de particules à chevelure
contrôlée.**

Mael Bathfield

► **To cite this version:**

Mael Bathfield. Synthèse d'agents de contrôle originaux pour l'obtention de copolymères α -fonctionnels par le procédé RAFT. Application à l'élaboration de particules à chevelure contrôlée.. Polymères. Université Claude Bernard Lyon 1, 2006. Français. NNT : . tel-02545120

HAL Id: tel-02545120

<https://hal.science/tel-02545120>

Submitted on 16 Apr 2020

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

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

THESE

présentée devant

I'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 25 avril 2002)

par

Maël BATHFIELD

(Ingénieur I.T.E.C.H. – Lyon)

**SYNTHESE D'AGENTS DE CONTROLE ORIGINAUX POUR L'OBTENTION DE
COPOLYMERES α -FONCTIONNELS PAR LE PROCEDE RAFT.
APPLICATION A L'ELABORATION DE PARTICULES A CHEVELURE CONTROLEE.**

Soutenue publiquement le 08 novembre 2006

Jury :

M. Philippe CHAUMONT, Professeur, Université Lyon 1

M^{me} Bernadette CHARLEUX, Professeur, Université Pierre et Marie Curie

M. Johan P.A. HEUTS, Professeur, Université de Eindhoven (Pays-Bas)

M. Thierry DELAIR, Chercheur Senior, bioMérieux, Lyon

M^{lle} Marie-Thérèse CHARREYRE, Chargée de Recherche, CNRS, Lyon

M. Franck D'AGOSTO, Chargé de Recherche, CNRS, Lyon

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de Thèse

Co-encadrante

Co-encadrant

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur R. GARRONE

M. le Professeur G. ANNAT

M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : M. le Professeur L. COLLET

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

Directeur : M. le Professeur M. EGEA

Directeur : M. le Professeur J.P. SCHARFF

Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

Avant-propos

Ce travail de recherche a été réalisé au sein de l'UMR 2714 CNRS-bioMérieux – Systèmes Macromoléculaires et Physiopathologie Humaine (SMPH), dirigée par Alain Theretz, ainsi qu'au sein de l'UMR 140 CNRS-ESCPE – Laboratoire de Chimie et Procédés de Polymérisation (LCP), dirigée par Roger Spitz. Je les remercie tout deux de m'avoir accueilli dans leur laboratoire respectif.

Je tiens tous d'abord à exprimer ma sincère gratitude à Monsieur Christian Pichot pour avoir, initialement, orienté ce sujet de recherche vers des domaines prometteurs et pour, par la suite, l'intérêt porté à ce travail... alors que les plaisirs de la retraite auraient très bien pu l'en détourner totalement ! Merci encore pour vos conseils.

Je suis très honoré que Madame le Professeur Bernadette Charleux et Monsieur le Professeur Hans Heuts aient accepté de juger ce mémoire en tant que rapporteurs, je les en remercie vivement.

Je remercie également Monsieur le Professeur Philippe Chaumont non seulement pour avoir accepté de présider ce jury de thèse, mais aussi pour les discussions que nous avons eu avant la soutenance.

Je tiens, bien sur, à exprimer toute ma reconnaissance à Marie-Thérèse Charreyre et à Franck D'Agosto pour, avant tout, leurs qualités humaines (disponibilité, franchise, gentillesse, esprit d'ouverture...) qui forment une base essentielle à tout travail collaboratif fructueux. Leurs connaissances (forcement de haut niveau !) alliées à une rigueur scientifique, mais aussi leur complémentarité, ont ensuite été des atouts de poids qui m'ont permis de mener à bien ce travail de recherche... sans rencontrer de gros obstacles ! Merci pour tout.

Je tiens également à remercier Thierry Delair pour avoir régulièrement pris connaissance de l'avancement de mes travaux (au travers de rapports et de réunions régulières) et pour ses remarques toujours judicieuses.

Je remercie également Catherine Ladavière pour avoir « pimenté » mon travail en nous proposant de travailler avec un phospholipide (de la synthèse organique à la caractérisation des polymères, il nous en a posé des petits problèmes !), pour son aide pour les analyses par C.E.S, mais surtout pour sa forte implication dans toutes les analyses par SM MALDI-ToF réalisées au cours de ce travail. Merci, il fallait bien ton expertise pour « tirer tout les vers du nez » de ces spectres !

De nombreuses personnes ont contribué de près ou de loin à la bonne réalisation de ce travail de thèse et à la compréhension des résultats, je tiens à les en remercier : Laurent Véron pour son aide au niveau des analyses de C.E.S. et de R.M.N. (et aussi pour avoir été un voisin de paillasse toujours de bonne humeur) ; Frederic Delolme pour la spectrométrie de masse MALDI-ToF (on serait peut-être passé à coté des RI terminés sans lui !); Guy Dessalces pour les discussions concernant la spectrométrie de masse F.A.B. ; Christian Graillat pour ses précieux conseils concernant les latex chevelus ; Jean-Pierre Broyer pour son aide technique toujours utile (même s'il s'agit parfois de petits détails, ça aurait été bête de rester bloqué à cause de ça !) ; Guillaume Gody pour la synthèse du dérivé « sucré »

(j'suis incapable de faire ce qu'il fait en chimie orga !); Delphine Daviot pour son travail sur les polymères-lipidiques (Y'a du travail de DD dans cette thèse !); Nancy Joumaa pour la M.E.T. (c'est bien plus compliqué que de prendre des photos de latex fluorescents avec un APN !); Nicolas Spinelli pour ses petits conseils de chimie organique au début de ma thèse; David Rinaldi pour la synthèse d'un lot de disulfure super pur (Chouette, c'est déjà une étape de la synthèse de faite !); Nicolas Tissier pour ses petits conseils concernant la DQEL et la centrifugeuse (euh... je peux t'emprunter tes tubes ?)...

Je voudrais associer à ces remerciements l'ensemble des personnes des deux laboratoires, biologistes ou chimistes pour le premier et « catalysistes » ou « émulsionnistes » pour le second, avec qui il m'a été très agréable de travailler, de discuter, d'aller manger ensemble, de prendre une pause « pain au lait + chocolat » (on ne change pas une recette qui marche !), de se faire quelques bars ou encore quelques restos,... bref de vivre en dehors de la paillasse !! Merci à tous, l'ambiance chaleureuse des deux laboratoires y est pour beaucoup dans le plaisir de venir travailler ;-)

J'ai bien sûr retrouvé cette ambiance auprès des personnes avec qui j'ai eu la chance de partager le « grand » bureau à l'ENS :

- Nancy : miam, c'est bon la cuisine libanaise !... y'a en à Dubaï ?
 - Nicolas : c'est bien pratique la salle Mur Mur pas trop loin du labo.
 - Aurélie : le concert de Bénabar aux Nuits de Fourvière reste un super souvenir !
 - Seb : même avec un super vélo de route, la montée vers Fourvière fait bien chauffer les mollets ! ;-)
 - Alex : au temps des Romains... (bein, oui... ça reste !)
 - GG : on s'fait un petit bowling (avec Seb) ?
 - Fabrice : j'crois qu'il aime le punch autant qu'moi !
- et le bureau aux dimensions plus classiques au LCPP :
- Nicolas : j'n'ai pas eu le temps de t'emprunter tous tes CD gravés de plein de MP3 !
 - Ricardo : le désormais Australo-franco-mexicain !! Restes en Australie, j'arrive... mais ce sera bien plus difficile d'aller au ski là-bas ! :-))

Merci également à Quentin (qui m'a doublé dans la dernière ligne droite !!), à Jean-Pierre (comme c'est bien son petit coin ardéchois !), et toutes les personnes à qui je pense en écrivant ces lignes mais que je me retiendrai de citer... pour éviter de faire plus de deux pages de remerciements ! (*comment ça, ce n'est pas une excuse !?... euh... en effet, la flemme c'est la vrai excuse... même je n'allais tout de même pas l'écrire ici !!*)

Enfin, un très grand merci à mes Parents, venus me soutenir au moment où j'en avais le plus besoin.

Ph.D. : Doctor of Philosophy...

N'oublions pas que la science
est née de la philosophie.

Comme toutes les mères,
celle-ci peut parfois donner
de judicieux conseils.

Le chiloZophiste

Tables des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	1
-----------------------------------	----------

CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Synthèse de polymères portant une entité d'intérêt à une extrémité de chaîne.....	5
--	----------

Introduction	5
---------------------------	----------

I. Fonctionnalisation après polymérisation	7
---	----------

I-1. Utilisation de polymères commerciaux.....	7
--	---

<i>a. Modification par réaction d'amidation.....</i>	<i>7</i>
--	----------

<i>b. Modification par réaction entre un thiol et un maléimide</i>	<i>8</i>
--	----------

I-2. Polymères synthétisés par télomérisation	8
---	---

I-3. Polymères synthétisés par polymérisation anionique/ROP ou ROMP	11
---	----

<i>a. Introduction de la fonction réactive via l'amorceur</i>	<i>11</i>
---	-----------

<i>b. Présence de la fonction réactive à l'extrémité ω.....</i>	<i>12</i>
---	-----------

<i>c. ω-fonctionnalisation par désactivation du centre actif.....</i>	<i>13</i>
---	-----------

I-4. Polymères synthétisés par polymérisation radicalaire contrôlée.....	14
--	----

<i>a. Fonctionnalisation via modification chimique de l'extrémité ω.....</i>	<i>14</i>
--	-----------

<i>b. Fonctionnalisation via l'extrémité α.....</i>	<i>16</i>
---	-----------

<i>Tableau 1 : Synthèse de bio-conjugués à partir de polymères préformés.....</i>	<i>20</i>
---	-----------

II. Fonctionnalisation avant polymérisation (hors PRC).....	22
--	-----------

II-1. Agents de transfert fonctionnels (télomérisation)	22
---	----

II-2. Amorceurs fonctionnels	23
------------------------------------	----

<i>a. Polymérisation radicalaire conventionnelle</i>	<i>23</i>
--	-----------

<i>b. Autres types de polymérisation</i>	<i>24</i>
--	-----------

III. Fonctionnalisation avant polymérisation (par PRC)	26
---	-----------

III-1. Amorceurs de polymérisation de type NMP	27
--	----

<i>a. Amorceurs portant un ligand d'intérêt biologique</i>	<i>28</i>
--	-----------

<i>b. Amorceurs portant un fluorophore</i>	<i>30</i>
--	-----------

<i>c. Autre amorceur fonctionnel.....</i>	<i>30</i>
---	-----------

<i>Tableau 2 : Amorceurs fonctionnels - Polymérisation de type NMP.....</i>	<i>32</i>
---	-----------

III-2. Amorceurs de polymérisation de type ATRP	34
<i>a. Amorceurs portant un ligand d'intérêt biologique</i>	34
<i>b. Amorceurs portant un fluorophore</i>	40
<i>c. Autres amorceurs fonctionnels</i>	41
Tableau 3 : Amorceurs fonctionnels – Polymérisation de type ATRP.....	44
III-3. Agents de contrôle de polymérisation de type RAFT	48
<i>a. Agents de transfert de chaîne portant un ligand d'intérêt biologique</i>	49
<i>b. Agents de transfert de chaîne portant un fluorophore</i>	53
<i>c. Agents de transfert de chaîne fonctionnels divers</i>	56
Tableau 4 : Agents de transfert fonctionnels - Polymérisation de type RAFT.....	58
Conclusion de l'étude bibliographique.....	61
Références du chapitre 1.....	63

CHAPITRE 2 :

Synthèse d'agents de contrôle (bio)-fonctionnels pour la polymérisation de type RAFT.....67

Introduction : Stratégie de synthèse..... 67

I. Synthèse des dithioesters précurseurs..... 70

I-1. Synthèse du SEDB.....	70
<i>a) Principe de la synthèse.</i>	70
<i>b) Essais d'amélioration des conditions de synthèse.</i>	71
<i>c) Purification.</i>	73
<i>d) Limitation de la dégradation du SEDB au stockage</i>	75
I-2. Caractérisations du SEDB.	76
I-3. Synthèse du SCBDB.....	78
I-4. Conclusion.....	80

II. Validation de la stratégie de synthèse de dithioesters-ligands. 81

II-1. Compétition amidation/thioamidation.....	81
<i>a) Cas des dithioesters-acides carboxyliques</i>	81
<i>b) Cas du SEDB : synthèse de la MEDBA (dithioester-ligand modèle)</i>	82
<i>c) Cas du SCBDB</i>	85
<i>d) Conclusion sur la synthèse de dithioesters fonctionnels à partir de dithioesters précurseurs</i>	85
II-2. Purification de la MEDBA	86
II-3. Caractérisation de la MEDBA.....	87
II-4. Conclusion : récapitulatif des conditions optimales de synthèse.	88

III. Synthèse et caractérisation de dithioesters-ligands d'intérêt biologique.....	89
III-1. Synthèse d'un dithioester-biotine (BEDBA).....	89
III-2. Synthèse d'un dithioester-sucre (SEDBA).....	91
III-3. Synthèse d'un dithioester-lipide (LEDBA).....	92
III-4. Effet de l'utilisation combinée de SEDB dégradé et de triéthylamine.....	95
<i>a) Identification du problème.....</i>	<i>95</i>
<i>b) Analyse par spectrométrie de masse MALDI-ToF.....</i>	<i>95</i>
<i>c) Origine de la LTPA.....</i>	<i>97</i>
III-5. Caractérisation des dithioesters-ligands.....	100
III-6. Conclusion.....	101
IV. Conclusion du chapitre 2.....	102
<i>Tableau récapitulatif des synthèses de dithioesters-ligands.....</i>	<i>104</i>
V. Partie expérimentale.....	105
V-1. Synthèse des agents RAFT.....	105
<i>a) Synthèse du SEDB.....</i>	<i>105</i>
<i>b) Synthèse du SCBDB.....</i>	<i>106</i>
<i>c) Synthèse des dithioesters-ligands.....</i>	<i>107</i>
V-2. Caractérisation.....	109
<i>a) Résonance magnétique nucléaire (RMN).....</i>	<i>109</i>
<i>b) Spectrométrie de masse MALDI-ToF.....</i>	<i>113</i>
<i>c) Analyse élémentaire et spectrométrie de masse FAB.....</i>	<i>114</i>
Références du chapitre 2.....	115

CHAPITRE 3 :

Synthèse de polymères α -fonctionnels par le procédé RAFT.....116

Introduction :..... 116

Préliminaire : Conditions de polymérisation..... 117

I. Homopolymérisation RAFT de la NAM en présence de dithioesters fonctionnels variés..... 119

I-1. Polymérisation en présence de SEDB..... 119

I-2. Comparaison entre les différents dithioesters-ligands..... 122

a) Aspects cinétiques..... 122

b) Distribution des masses molaires..... 123

I-3. Origine des chaînes de faibles masses molaires présentes en fin de polymérisation.125

a) Raison pour laquelle il ne peut s'agir de la croissance de nouvelles chaînes. 126

b) Fragmentation des chaînes en polymérisation conventionnelle..... 127

c) Visualisation du phénomène de fragmentation des chaînes par retraitement des données de CES/DDL..... 128

I-4. Caractère vivant des chaînes synthétisées / Essai d'extension de chaînes.	129
I-5. Conclusion	130
II. Analyse des extrémités de chaînes.	131
II-1. RMN ¹ H.....	131
II-2. Spectrométrie de masse MALDI-ToF.....	134
a) Détermination des Mn et Ip	134
b) Analyse des extrémités de chaîne.....	135
II-3. Conclusion.....	141
III. Influence des extrémités de chaînes sur les analyses par chromatographie d'exclusion stérique.....	142
III-1. Cas des polymères fonctionnalisés par un lipide	142
III-2. Influence de l'extrémité α.....	146
III-3. Influence de l'extrémité ω / Hydrolyse des chaînes dormantes.....	147
III-4. Conclusion	149
IV. Phénomène de « sur-retard » / Terminaison sur les radicaux intermédiaires.	150
IV-1. Mise au jour du phénomène de « sur-retard »	150
IV-2. Hypothèses.....	151
a) Hypothèses de la littérature expliquant le phénomène de « retard »	151
b) Hypothèse concernant le « sur-retard »	152
IV-3. Confirmation cinétique	155
IV-4. Confirmation par spectrométrie de masse MALDI-ToF	155
IV-5. Conclusion	158
V. Conclusion du chapitre 3	159
VI. Partie expérimentale	161
VI-1. Réactifs	161
VI-2. Mode opératoire général des polymérisations RAFT.....	161
VI-3. Techniques de caractérisation des échantillons polymère	162
a) CES/DDL en phase aqueuse	162
b) CES en phase solvant (THF).....	163
c) Spectrométrie de masse MALDI-ToF.....	163
d) Diffusion quasi-élastique de la lumière	164
Références du chapitre 3.....	166

CHAPITRE 4 :

Elaboration de structures à base de (co)polymères α -fonctionnels en vue d'applications dans le diagnostic biologique et la vectorisation.....168

Introduction 168

I. Stabilisation de LipoParticules. 169

I-1. Contexte.....	169
I-2. Synthèse de conjugués polyNAM-lipide de longueur appropriée.....	170
I-3. Stabilisation des LipoParticules.....	171
I-4. Conclusion.....	172

II. Bio-conjugués précurseurs de sondes de détection super-fluorescentes. 174

II-1. Contexte et structure du bio-conjugué envisagé	174
II-2. Essais de polymérisation préliminaires	176
a) <i>Problème de stagnation des masses molaires</i>	176
b) <i>Essais en présence du dithioester-morpholine (MEDBA)</i>	177
II-3. Synthèse de la structure envisagée	182
a) <i>Copolymérisation NAM/NAS en présence de BEDBA</i>	182
b) <i>Estimation du taux de fonctionnalisation</i>	184
II-4. Vers la compréhension des polymérisations de type RAFT visant des masses molaires élevées.	185
II-5. Conclusion.....	188

III. Particules fonctionnalisées à chevelure contrôlée 189

III-1. Introduction.....	189
a) <i>Contexte</i>	189
b) <i>Stratégies envisageables</i>	190
III-2. Stratégie adoptée : la polymérisation en dispersion.....	191
a) <i>Principe de la polymérisation en dispersion</i>	191
b) <i>Stabilisants stériques utilisés dans la littérature</i>	192
III-3. Polymérisation en dispersion en présence de chaînes dormantes.	193
a) <i>Préliminaires</i>	193
b) <i>Choix des conditions de polymérisation</i>	195
c) <i>Premiers résultats</i>	197
d) <i>Remarques complémentaires</i>	199
e) <i>Influence de la longueur de chaîne polyNAM et hydrolyse compétitive</i>	203
f) <i>Synthèse de particules à chevelure contrôlée et fonctionnalisée en extrémité par un sucre</i>	205
g) <i>Nucléation tardive \Rightarrow Particules monodisperses ?</i>	207
h) <i>Discussion sur une cause possible de la nucléation précoce</i>	210
III-4. Conclusion	213

IV. Conclusion du chapitre 4 214

V. Partie expérimentale	216
V-1. Stabilisation de LipoParticules à l'aide de chaînes polyNAM-lipide	216
V-2. Copolymères NAM/NAS de masses molaires élevées.	216
V-3. Polymérisation en dispersion en présence de chaînes dormantes	217
a) <i>Synthèse des chaînes dormantes</i>	217
b) <i>Polymérisations en dispersion</i>	217
Références du chapitre 4.....	219

CONCLUSION GENERALE.....221

ANNEXES.....225

ANNEXE 1	
Exploitation des résultats des analyses élémentaires	225
ANNEXE 2	
Fragmentation du SEDB au cours des analyses de spectrométrie de masse	228
ANNEXE 3	
Nature du pic gaussien mobile visible sur certains spectres RMN ¹ H des dithioesters-ligands.	230
ANNEXE 4	
Effet des impuretés (présentes dans les dithioesters) sur les cinétiques de polymérisation RAFT de la NAM.....	232
ANNEXE 5	
Spectrométrie de masse MALDI-ToF avec du THF non distillé.	234
ANNEXE 6	
Agrégation des conjugués polyNAM-lipide en CES aqueuse.	240
ANNEXE 7	
Estimation de la concentration en radicaux propageant au cours de la copolymérisation RAFT du NAM avec le NAS (essai M3)	243
ANNEXE 8	
Analyse de la distribution des masses molaires dans le cas des polymérisation RAFT visant des masses molaires élevées.....	245

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

L'immobilisation de molécules biologiques sur des supports polymères a fait l'objet de nombreuses recherches pour diverses applications bio-médicales (tri cellulaire, imagerie), thérapeutiques (immunothérapie, enzymothérapie, vaccination), diagnostiques, ainsi que dans le domaine agroalimentaire et la chimie.¹ Les différents systèmes envisagés se différencient en fonction de la structure du support polymère (polymères en solution, polymères particulaires), des biomolécules (anticorps, antigènes, autres protéines, fragments d'ADN, plasmides, peptides,...) et du type de fixation (liaison covalente, adsorption, complexation,...). Le composé résultant de l'immobilisation de la biomolécule sur le support est souvent appelé bio-conjugué.

Pour l'élaboration de tests de diagnostic basés sur l'utilisation de séquences d'ADN (sondes nucléiques) spécifiques d'un virus à détecter, ou bien pour des applications thérapeutiques de transfert de gènes, l'expérience acquise à l'Unité Mixte de Recherche CNRS-bioMérieux a montré qu'il est nécessaire de bien contrôler la structure des polymères ainsi que les paramètres physico-chimiques qui régissent l'approche et l'orientation de la biomolécule.²⁻⁵ La nature et les caractéristiques des polymères (longueur de chaîne, architecture, présence de fonctions réactives multiples et/ou bien localisées,...) revêtent donc beaucoup d'importance.

Les techniques de polymérisation radicalaire contrôlée (PRC) offrent des solutions variées et relativement simples à mettre en œuvre pour l'obtention de polymères aux caractéristiques bien définies. En effet, non seulement ces techniques permettent de contrôler la longueur de chaîne de polymères de nature très variée, mais elles offrent également la possibilité de concevoir des architectures plus complexes (que des polymères dits « linéaires ») comme des copolymères à blocs, greffés, en étoile,...

De plus, ces techniques de PRC sont basées sur l'utilisation de composés particuliers (assurant le contrôle de la polymérisation) qui se retrouvent aux extrémités des chaînes en fin de polymérisation. Elles constituent ainsi des voies prometteuses pour la synthèse de polymères α -fonctionnels. Ce type de structure répond au critère de localisation précise d'une fonctionnalité sur la chaîne polymère. Par exemple, en utilisant une technique de PRC, l'introduction d'une entité d'intérêt biologique (ligand biologique) en extrémité α des chaînes peut facilement être assurée par la fonctionnalisation préalable de l'agent de contrôle. Les polymères α -bio-fonctionnels de longueur contrôlée obtenus sont potentiellement très intéressants pour la conception de nouveaux dispositifs biologiques.

Depuis plusieurs années, le procédé RAFT (Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer) est une technique de PRC développée au laboratoire, notamment pour la polymérisation contrôlée de dérivés d'acrylamide. Dans ce procédé, le composé qui assure le contrôle de la polymérisation est un agent de transfert de chaîne (ATC). En comparaison avec les autres techniques de PRC, ce procédé s'avère être une technique particulièrement adaptée pour la famille des acrylamides.^{4,5}

En s'appuyant sur ces travaux antérieurs, **l'objectif de ce travail de thèse a consisté à synthétiser par le procédé RAFT divers (co)polymères α -fonctionnels de longueur contrôlée à base de N-acryloylmorpholine (NAM), dérivé hydrophile de l'acrylamide. La stratégie de synthèse est basée sur l'utilisation d'un agent de transfert de chaîne (ATC) préalablement fonctionnalisé par un ligand biologique (LB) (Schéma 1).**

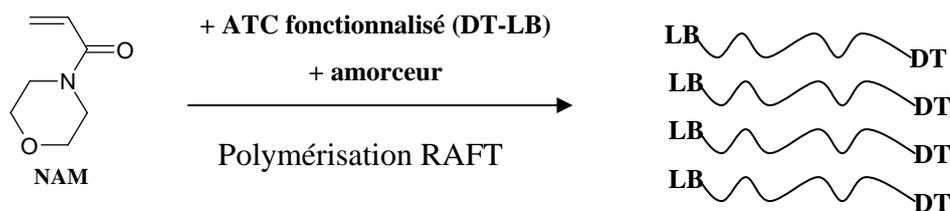


Schéma 1 : Principe de la synthèse de polymère de longueur contrôlée et portant un ligand biologique (LB) en extrémité de chaîne [DT = dithioester]

Un choix adéquat de la structure de l'ATC, composé thiocarbonyl-thio (cf. Schéma 2), est primordial pour le succès de la polymérisation RAFT d'un monomère donné⁶. Ainsi, la mise au point de nouvelles stratégies de synthèse de composés ATC constitue une part relativement importante des recherches actuelles consacrées au procédé RAFT. Un nombre conséquent de structures différentes d'ATC a déjà été reporté dans la littérature⁶⁻⁸. Parmi celles-ci, les dithioesters constituent des agents de transfert de chaîne particulièrement efficaces. Cependant, à l'heure actuelle, peu d'entre eux comportent un ligand biologique.

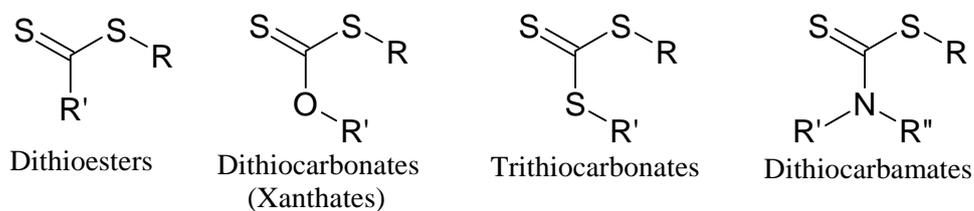


Schéma 2 : Structure générale des différentes familles d'agents de transfert de chaîne (ATC) utilisées dans le procédé RAFT.

D'autre part, dans le cadre d'applications bio-médicales, les bio-conjugués sont souvent utilisés en milieux aqueux. Ainsi, par exemple, des liaisons de type amide (liaisons « peptidiques ») entre le polymère et l'entité biologique seront préférées à des liaisons de type ester potentiellement hydrolysables. La formation d'une liaison de type amide dans un conjugué requiert souvent l'utilisation d'un ligand biologique porteur d'une fonction amine (composés assez courant dans les applications biologiques). Cependant, la réactivité importante des fonctions amine vis-à-vis des composés thiocarbonyl-thio (risque de destruction de l'ATC) les rend peu utilisables dans le cadre du procédé RAFT.

Des voies de synthèses originales restent donc encore à développer afin de contourner cette incompatibilité des ATC vis-à-vis des ligands biologiques aminés. Ainsi, ce travail de thèse s'est particulièrement orienté vers le développement d'une telle stratégie. Pour cela, un dithioester précurseur de structure particulière a été imaginé. Après sa synthèse, un ligand aminé modèle a, dans un premier temps, été considéré afin de vérifier le comportement de ce dithioester précurseur vis-à-vis des fonctions amine primaire. Dans un second temps, l'utilisation de ligands biologiques d'intérêt, tels que la biotine, un phospholipide ou un dérivé carbohydrate (Schéma 3) a bien sûr été envisagée afin d'obtenir des ATC bio-fonctionnels.

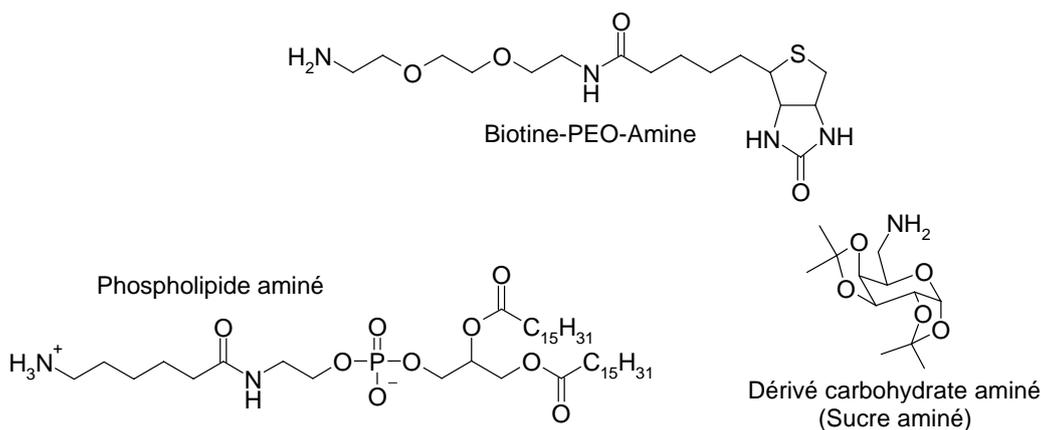


Schéma 3 : Structure des ligands biologiques envisagés

Le choix de ces ligands biologiques est directement lié à des applications potentielles dans le domaine de la vectorisation (polymère-lipide) ou dans le domaine du diagnostic biologique (polymère-biotine et polymère-sucre).

Dans le cadre de ce dernier domaine d'application, la conception de nouveaux supports pour la capture d'agents pathogènes (bactéries, virus,...) requiert la présence sur ces supports d'un grand nombre de sites de capture accessibles. Ainsi, l'élaboration de particules « chevelues » présentant un ligand biologique à l'extrémité de chaque « cheveu » est apparu prometteur (Schéma 4).

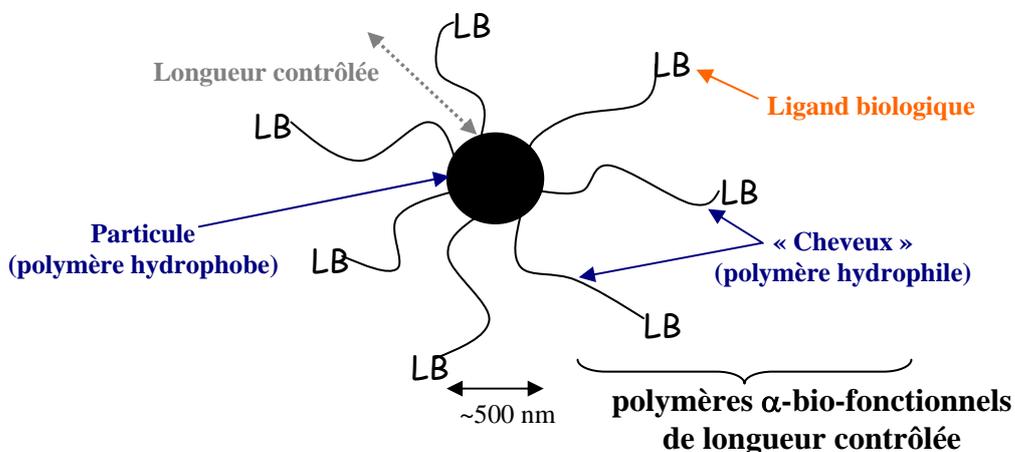


Schéma 4 : Schéma de la structure des particules « chevelues » envisagées.

Les polymères polyNAM α -bio-fonctionnels de longueur contrôlée, synthétisés par le procédé RAFT grâce à des ATC bio-fonctionnels, semblent constituer des cheveux adéquats pour l'élaboration de telles particules chevelues. Ainsi, en élargissement de ce travail de thèse, une voie de synthèse de particules fonctionnalisées à chevelure contrôlée utilisant le principe de la polymérisation en dispersion a été testée.

Ce mémoire s'organise en quatre chapitres :

- Le premier chapitre consiste en une étude bibliographique consacrée aux diverses stratégies de synthèse de polymères portant une entité d'intérêt à une extrémité de chaîne. La plupart des procédés de polymérisation utilisés sont illustrés par un ou plusieurs exemples correspondants à des conjugués (biologiques ou non) pour des applications potentielles des plus variées. Les stratégies mettant en œuvre les techniques de PRC sont particulièrement développées dans cette partie.
- Dans un second chapitre, la mise au point d'une stratégie générale de synthèse de dithioesters fonctionnels est exposée. Son application a permis la synthèse aisée de plusieurs dithioesters bio-fonctionnels portant respectivement une biotine, un phospholipide et un sucre. Leur caractérisation complète a été effectuée.
- Ensuite, l'utilisation de ces dithioesters bio-fonctionnels en polymérisation RAFT de la NAM est décrite dans un troisième chapitre. Les cinétiques et le contrôle des masses molaires sont discutés. Ce chapitre présente également l'analyse de la nature des extrémités de chaîne des polymères α -fonctionnels obtenus, et l'influence de la nature de ces extrémités de chaîne sur les méthodes de caractérisation utilisées.
- Enfin, le quatrième chapitre traite de l'utilisation de la nouvelle stratégie de synthèse de bio-conjugués afin de concevoir des structures répondant aux critères de plusieurs applications biologiques. En particulier, une voie de synthèse de particules « chevelues » par polymérisation en dispersion est décrite.

- (1) Delair, T.; Pichot, C. *Biomimétisme Et Matériaux*; ARAGO 25 ed. O.F.T.A., **2001**.
- (2) Ladavière, C. *Thèse, Université Lyon 1* **1998**.
- (3) D'Agosto, F. *Thèse, Université Lyon 1* **2000**.
- (4) Favier, A. *Thèse, Université Lyon 1* **2002**.
- (5) de Lambert Bregnot du Lut, B. *Thèse, Université Lyon 1* **2003**.
- (6) Favier, A.; Charreyre, M.-T. *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, 27, 653–692.
- (7) Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Aust. J. Chem.* **2005**, 58, 349-410.
- (8) Perrier, S.; Takolpuckdee, P. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* **2005**, 43, 5347–5393.

Chapitre 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Synthèse de polymères portant une
entité d'intérêt à une extrémité de chaîne.

Sommaire du chapitre 1

Introduction	5
I. Fonctionnalisation après polymérisation	7
I-1. Utilisation de polymères commerciaux	7
a. <i>Modification par réaction d'amidation</i>	7
b. <i>Modification par réaction entre un thiol et un maléimide</i>	8
I-2. Polymères synthétisés par télomérisation	8
I-3. Polymères synthétisés par polymérisation anionique/ROP ou ROMP	11
a. <i>Introduction de la fonction réactive via l'amorceur</i>	11
b. <i>Présence de la fonction réactive à l'extrémité ω</i>	12
c. <i>ω-fonctionnalisation par désactivation du centre actif</i>	13
I-4. Polymères synthétisés par polymérisation radicalaire contrôlée	14
a. <i>Fonctionnalisation via modification chimique de l'extrémité ω</i>	14
b. <i>Fonctionnalisation via l'extrémité α</i>	16
Tableau 1 : Synthèse de bio-conjugués à partir de polymères préformés	20
II. Fonctionnalisation avant polymérisation (hors PRC)	22
II-1. Agents de transfert fonctionnels (télomérisation)	22
II-2. Amorceurs fonctionnels	23
a. <i>Polymérisation radicalaire conventionnelle</i>	23
b. <i>Autres types de polymérisation</i>	24
III. Fonctionnalisation avant polymérisation (par PRC)	26
III-1. Amorceurs de polymérisation de type NMP	27
a. <i>Amorceurs portant un ligand d'intérêt biologique</i>	28
b. <i>Amorceurs portant un fluorophore</i>	30
c. <i>Autre amorceur fonctionnel</i>	30
Tableau 2 : Amorceurs fonctionnels - Polymérisation de type NMP	32
III-2. Amorceurs de polymérisation de type ATRP	34
a. <i>Amorceurs portant un ligand d'intérêt biologique</i>	34
b. <i>Amorceurs portant un fluorophore</i>	40
c. <i>Autres amorceurs fonctionnels</i>	41
Tableau 3 : Amorceurs fonctionnels - Polymérisation de type ATRP	44
III-3. Agents de contrôle de polymérisation de type RAFT	48
a. <i>Agents de transfert de chaîne portant un ligand d'intérêt biologique</i>	49
b. <i>Agents de transfert de chaîne portant un fluorophore</i>	53
c. <i>Agents de transfert de chaîne fonctionnels divers</i>	56
Tableau 4 : Agents de transfert fonctionnels - Polymérisation de type RAFT	58
Conclusion de l'étude bibliographique	61
Références du chapitre 1	63

Introduction

L'innovation dans le domaine des matériaux polymères implique souvent la conception de structures macromoléculaires originales et/ou complexes. Ainsi, la formation de conjugués (associant un composé d'intérêt à une chaîne polymère) peut être un moyen d'ajouter des propriétés à un polymère dans le cadre d'un champ d'applications donné. Inversement, les propriétés de certains composés peuvent être modifiées suite au couplage à un polymère (cas de nombreux bio-conjugués). De cette conjugaison « forcée » de propriétés différentes provient le terme « conjugué ». Ainsi, de manière générale, on entend par « conjugués » les composés résultants de la fixation covalente sur des chaînes polymères d'une entité apportant une caractéristique particulière (par exemple un composé biologique comme un sucre, un lipide ou une biotine, ou bien une entité de marquage comme un fluorophore).

Les propriétés finales des conjugués dépendent énormément de leur structure et donc, en particulier, du nombre de sites d'ancrage du composé d'intérêt et de leur localisation sur la chaîne polymère. Les stratégies de synthèse conduisant à des conjugués de structure parfaitement définie sont donc particulièrement prometteuses. Dans ce cadre, considérant une chaîne polymère linéaire, deux sites de d'ancrage sont parfaitement définis en nombre et en localisation : ce sont les extrémités de chaîne. Elles sont généralement différenciées par les lettres grecques α et ω , en rapport avec « l'histoire » de la formation de la chaîne : l'extrémité α indique le côté des premières unités monomère insérées dans la chaîne, et contient généralement un fragment du composé amorceur de la polymérisation.* Forcément, l'extrémité ω ... c'est l'autre, et sa nature dépend du procédé de polymérisation mis en jeu.

Parmi les diverses structures de conjugués possibles, cette étude bibliographique ne s'intéresse qu'à la synthèse de conjugués porteurs d'une entité d'intérêt à l'une des extrémités de chaîne. L'entité d'intérêt apporte une propriété particulière (par exemple : propriété de reconnaissance, d'ancrage, de marquage, etc...) pour un type d'application visé. Ainsi, les nombreux travaux décrivant seulement l'introduction d'une fonction « réactive » en extrémité de chaîne, sans utilisation de cette réactivité pour une application potentielle, ont été exclus de cette étude.** Pour un panorama complet sur ce sujet (« restreint » aux techniques de polymérisation radicalaire contrôlée, PRC), on peut se reporter aux articles-revues de Hawker *et al.*¹ (NMP), de Matyjaszewski *et al.*^{2,3} et de Sawamoto *et al.*⁴ (ATRP), et enfin de Rizzardo *et al.*⁵, de Perrier *et al.*⁶ et de Favier *et al.*⁷ (RAFT). Dans ces revues, les expressions comme « polymère α -fonctionnel », « polymères fonctionnalisés » ou encore « fonctionnalisation des extrémités de chaînes » sont généralement utilisées pour faire référence à l'introduction de fonctions réactives en extrémité des chaînes. Elle resteront utilisées ici, mais pour faire référence à une entité d'intérêt.

* polymérisation qui est donc une polymérisation en chaîne ce qui permet une différenciation des extrémités de chaîne selon le sens de croissance. Dans le cas des polycondensations, cette distinction ne peut se faire que de manière arbitraire.

** D'autre part, bien que les copolymères à blocs comportant des blocs de nature chimique très différente pourraient être considérés comme des conjugués particuliers, leurs diverses stratégies de synthèse ne sont pas reportées ici.

Deux approches différentes peuvent être mises en œuvre pour la synthèse de polymères α ou ω -fonctionnels : la fonctionnalisation des extrémités de chaîne « après » polymérisation, ou l'introduction du composé d'intérêt « avant » la polymérisation.

- La première stratégie est illustrée dans la première partie de cette étude qui ne se veut pas exhaustive mais souhaite simplement donner quelques exemples de synthèse de conjugués selon l'origine du polymère préformé utilisé. Pour cela, les exemples sont restreints à des publications relativement récentes concernant la synthèse de bio-conjugués.
- La seconde partie aborde brièvement la deuxième stratégie à travers quelques travaux concernant la synthèse de bio-conjugués et mettant en jeu des techniques de polymérisation en chaîne autres que les techniques de PRC (polymérisation radicalaire conventionnelle, polymérisation anionique).
- La troisième partie de cette étude est consacrée à illustrer la variété des polymères α -fonctionnels synthétisables par PRC. En effet, le développement des techniques de PRC ces dix dernières années a donné un nouvel élan à la synthèse de polymères α -fonctionnels. Même si beaucoup d'entre eux sont des bio-conjugués (en vue d'applications bio-médicales), d'autres types de conjugués sont également présentés. Cette partie se divise logiquement en trois sous-parties selon les trois principales techniques de polymérisation radicalaire contrôlée (NMP, ATRP, RAFT).

I. Fonctionnalisation après polymérisation

La modification chimique des extrémités de chaînes d'un polymère préformé est, à priori, une méthode des plus simples pour réaliser une fonctionnalisation en un lieu bien défini. Cette méthode met en jeu des réactions classiques de chimie organique. Le choix de cette chimie dépend évidemment de la nature des fonctions réactives présentes en extrémité de chaîne et des fonctions complémentaires disponibles sur l'entité d'intérêt à fixer. La nature de ces fonctions réactives résulte souvent du mode de synthèse du polymère utilisé. Dans la littérature, de nombreux polymères de toutes origines ont été fonctionnalisés en vue de diverses applications.

Nous nous limiterons ici à des publications relativement récentes concernant la synthèse de bio-conjugués. Les applications de ces derniers dépassent souvent les compétences usuelles des polyméristes. Et inversement, les procédés de synthèse de polymères pouvant servir à la conception de bio-conjugués dépassent généralement les compétences usuelles des équipes de biologistes. De ce fait, l'utilisation de polymères commerciaux est régulièrement rencontrée.

I-1. Utilisation de polymères commerciaux

a. Modification par réaction d'amidation

Qu'ils soient synthétisés par voie contrôlée ou non, de nombreux polymères commerciaux présentent des fonctions réactives en bout de chaînes : typiquement, une amine primaire ou un acide carboxylique. Une réaction d'amidation *via* activation de l'acide par le N-hydroxysuccinimide (NHS) est fréquemment employée pour la formation de bio-conjugués. Quatre exemples sensiblement différents peuvent être mentionnés pour illustrer cette stratégie :

- La synthèse proposée par J.H. Jeong et T.G. Park⁸ d'un conjugué polymère biodégradable/ oligonucléotide (ODN), potentiellement utilisable pour le relargage des ODN dans les cellules, s'effectue à partir d'un copolymère poly(D,L-lactic-co-acide glycolique) ($M_w = 10000$ g/mol, I_p non précisé) portant une fonction acide carboxylique. Après activation de cette fonction par le couple DCC (dicyclohexyl carbodiimide) / NHS et purification du polymère activé, celui-ci est couplé à un ODN aminé (-NH₂) à température ambiante pendant 12h. Le rendement de couplage est estimé à 75% et l'élimination des ODN résiduels est effectuée par dialyse.
- La même voie de synthèse est utilisée avec un poly(acrylate de *tert*-butyle) porteur d'une fonction acide carboxylique ($M_n = 4200$ g/mol, $I_p = 1,25$) et un lipide aminé (-NH₃⁺). Le couplage, en présence de triéthylamine, du polymère activé avec ce lipide conduit au conjugué visé avec un rendement de 34% après purification sur colonne d'alumine.⁹
- Un « double » conjugué (galactose)₃-polymère-lipide a été synthétisé par Frisch *et al.*¹⁰ à partir d'un poly(éthylène glycol) di-aminé ($M_w = 2000$ g/mol, I_p non précisé, une fonction amine primaire à chaque extrémité de chaîne). Une première fonctionnalisation à l'aide d'un lipide acide en présence de DCC/NHS mène au conjugué mono-aminé PEG/lipide. Après purification sur colonne de silice, le rendement est d'environ 34%. Ces opérations de couplage et purification sont répétées avec un composé acide carboxylique portant trois unités galactose pour conduire au bio-conjugué visé avec un rendement global de 20%.

- Un poly(éthylène glycol) hétéro bi-fonctionnel mono-aminé et mono-hydroxylé ($M_w = 3800$ g/mol, I_p non précisé) a également servi à la synthèse d'un conjugué biotine/PEG-*b*-poly(acide lactique).¹¹ L'étape d'activation de l'acide est évitée en utilisant directement une biotine portant la fonction ester activé (biotine-COONHS). Après couplage à température ambiante pendant 12h en présence de triéthyl amine, le polymère biotinylé est isolé par filtration sous vide. Le rendement de couplage n'a pas été déterminé dans cette étude. L'extrémité hydroxyle sert ensuite à amorcer la polymérisation anionique du (*l*-)lactide pour la formation du bloc PLA ($M_n = 9200$ g/mol). L'analyse en chromatographie d'exclusion stérique du bio-conjugué copolymère ne révèle la présence que d'un unique pic. Selon les auteurs¹¹, cela est la signature d'un produit pur... bien que cela ne permette pas de s'affranchir de la présence éventuelle de copolymère non biotinylé.

L'utilisation du NHS n'est pas automatique puisqu'il existe d'autres agents de couplage tel que le 1-hydroxybenzotriazole (HOBT). Celui-ci, associé à la DCC, a été utilisé par Kassab *et al.*¹² pour coupler des dérivés aminés du galactose sur un poly(L-acide lactique) ($M_w = 73000$ g/mol, I_p non précisé) portant une fonction acide carboxylique en bout de chaîne. Deux équivalents de sucre aminé et d'agents de couplage ont été utilisés. Le dosage des fonctions acide résiduelles indique des rendements de couplage de l'ordre de 60 à 70%.

b. Modification par réaction entre un thiol et un maléimide

Certains polymères commerciaux présentent également une fonction maléimide en bout de chaîne. Celle-ci est fréquemment utilisée en biologie moléculaire pour sa réactivité envers les fonctions thiol présentes en surface de certaines protéines. Cette réactivité a été exploitée pour la synthèse de conjugué poly(L-Lysine)-*g*-PEG/mannose¹³ : le poly(éthylène glycol) hétéro bi-fonctionnel (maléimide-PEG-COONHS, $M_n = 3400$ g/mol, $I_p = 1,05$) est couplé avec le 2-mercaptoethyl α -D-mannopyranoside. L'autre extrémité (-COONHS) sert ensuite au greffage du conjugué sur un squelette de poly(L-Lysine) présentant des fonctions amine primaire latérales. Le bio-conjugué final permet l'élaboration de surfaces de détection d'une protéine spécifique (reconnue par le mannose) tout en limitant l'adsorption non-spécifique (effet du PEG).

La synthèse de conjugués par l'utilisation de polymères commerciaux s'effectue donc principalement suivant deux grands types de réactivité : acide carboxylique/amine primaire ou thiol/maléimide. La stratégie d'insertion de ces fonctions réactives en extrémité de chaînes polymères dépend du type de polymérisation mis en œuvre.

I-2. Polymères synthétisés par télomérisation

Avant le développement des techniques de polymérisations radicalaires contrôlées, les masses molaires pouvaient tout de même être ajustées par l'utilisation d'agents de transfert tels que les mercaptans (composés comportant une fonction thiol) : en modifiant les rapports molaires [monomère]/[amorceur]/[agent de transfert], une large gamme de masse molaire peut être couverte, selon l'équation de Mayo suivante :

$$\frac{1}{DP_n} = \frac{1}{DP_{n_0}} + C_{tr} \frac{[AT]}{[M]}$$

où DP_n est le degré moyen de polymérisation,
 DP_{n_0} est le degré moyen de polymérisation en l'absence d'agent de transfert,
 C_{tr} est la constante de transfert à l'agent de transfert ($=k_{tr}/k_p$),
 $[AT]$ et $[M]$ sont respectivement les concentrations en agent de transfert et en monomère.

Etant donné que le rôle premier de l'agent de transfert est de créer un nombre plus important de chaînes que ne le ferait l'amorceur utilisé seul, si le rapport [agent de transfert]/[amorceur] est suffisamment grand (>5), une proportion importante de chaînes est amorcée par l'agent de transfert. Si celui-ci porte une fonction réactive (en plus de la fonction thiol), il y a là un moyen de fonctionnaliser les extrémités de chaînes tout en ajustant les masses molaires. Ce procédé de polymérisation effectué en présence d'un grand excès d'agent de transfert de telle sorte que les groupes terminaux soient des fragments de l'agent de transfert est appelé télomérisation.¹⁴

Ce procédé a été largement appliqué par l'équipe de A.S. Hoffman¹⁵ pour la synthèse de bio-conjugués thermosensibles : la polymérisation de la *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) en présence d'acide mercaptopropanoïque a permis le couplage du polymère obtenu avec une enzyme¹⁶ (trypsine, cf. Figure 1) ou avec une streptavidine mutante¹⁷. Dans les deux cas, les polymères (M_n entre 5000 et 19000 g/mol) ont été utilisés après fractionnement (à l'aide d'un mélange acétone/*n*-hexane) afin de réduire la largeur de la distribution des masses molaires. Le couplage a été réalisé en présence d'un large excès de ligand aminé et de NHS/DCC pour activer l'acide. Cependant, le rendement de couplage entre le poly(NIPAAm)-NHS et la streptavidine-NH₂ n'a pas dépassé les 20%. Cet exemple illustre bien les problèmes fréquemment rencontrés lors des tentatives de réactions entre deux macromolécules : à partir d'une certaine masse molaire, les problèmes d'accessibilité des fonctions réactives deviennent très problématiques.

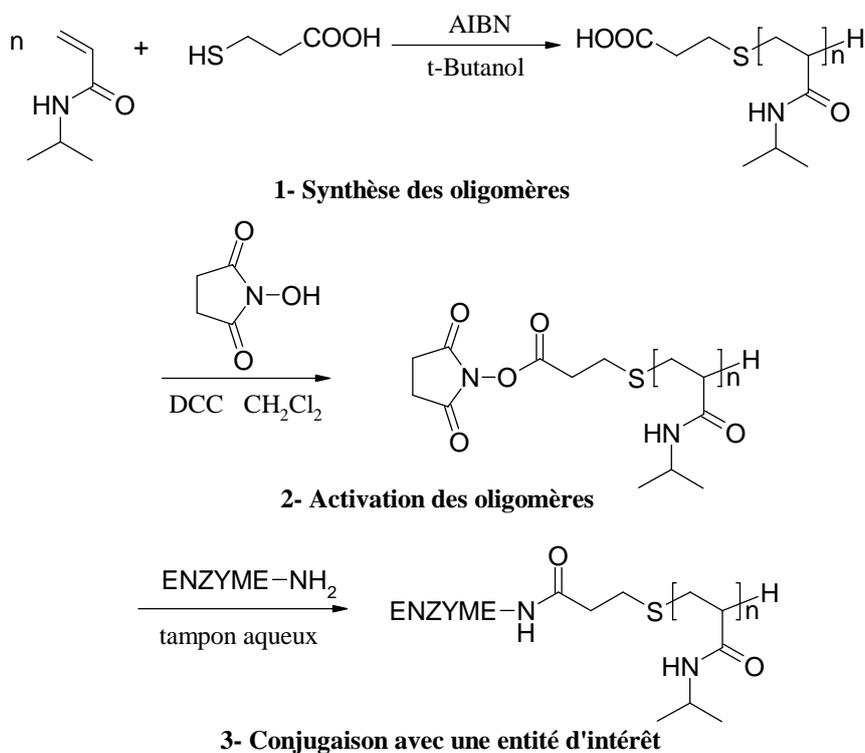


Figure 1 : Synthèse d'un conjugué poly(NIPAAm)/Enzyme après polymérisation en présence d'agent de transfert¹⁶

Selon la même stratégie, le couplage d'un copolymère thermosensible de poly(*N,N*-diméthyl acrylamide-*co*-*N*-4-phenylazo-phenylacrylamide) sur un site proche du site actif d'une enzyme mutée a permis la régulation de l'activité de cette enzyme en fonction de la température¹⁸ (Figure 2). L'agent de transfert (2-mercaptoéthanol) utilisé pendant la polymérisation a apporté au copolymère une fonction hydroxyle terminale qui a ensuite été modifiée en fonction vinyl sulfone (VS) pour acquérir une réactivité suffisante vis-à-vis des cystéines (fonction thiol) portées par l'enzyme.

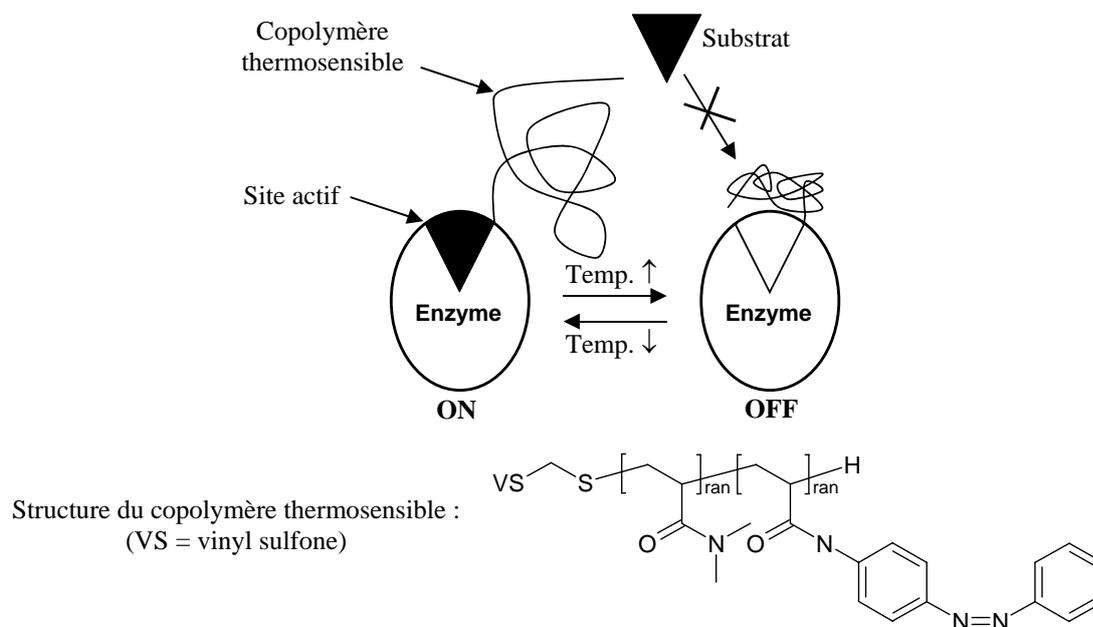


Figure 2 : Régulation de l'activation d'une enzyme par la présence d'un polymère thermosensible¹⁸

La fonctionnalisation *via* un agent de transfert de type amino-mercaptan ou carboxy-mercaptan a également été utilisée par Torchilin *et al.*¹⁹ pour la polymérisation de la *N*-vinyl pyrrolidone. Le couplage avec un excès de lipides (palmityle ou stéaryle) est effectué suivant deux voies différentes selon les fonctions réactives mises en jeu (chlorure d'acide ou amine) (cf. Figure 3). La gamme de masses molaires utilisée est comprise entre 700 et 20000 g/mol. Aucun rendement de couplage n'a été déterminé. Ces polymères-lipides ont été utilisés pour stabiliser des liposomes ; ceux-ci sont des assemblages de lipides sous forme de sphères « creuses » très étudiés dans le cadre de la vectorisation de principes actifs.

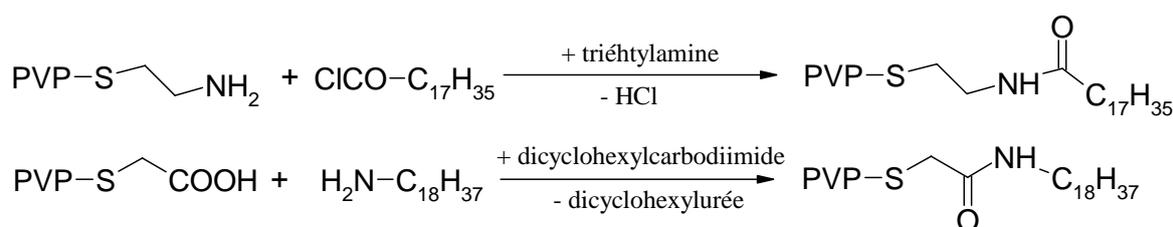


Figure 3 : Synthèse de conjugués PVP/Lipide par fonctionnalisation post-polymérisation (exemples avec des dérivés stéaryle)¹⁹

Le procédé de télomérisation en polymérisation radicalaire est donc une technique simple pour apporter des fonctions réactives en extrémité de chaîne. L'excès d'agent de transfert utilisé réduit en général la largeur de la distribution des masses molaires mais limite aussi fortement la gamme de masse molaire accessible (faible M_n voire oligomérisation dans certains cas).

I-3. Polymères synthétisés par polymérisation anionique/ROP ou ROMP

La mise en oeuvre de techniques de polymérisation anionique vivante assure un contrôle efficace de la distribution des masses molaires. Historiquement, il s'agit de la première méthode de polymérisation « contrôlée » : les masses molaires moyennes en nombre peuvent être finement ajustées par le rapport [monomère]/[amorceur] et les indices de polymolécularité des polymères obtenus sont faibles (souvent $I_p < 1,1$).

a. Introduction de la fonction réactive via l'amorceur

Le choix adéquat de l'amorceur permet d'introduire une fonction réactive en extrémité α des chaînes. Cependant, compte tenu de la faible tolérance de la polymérisation ionique envers les fonctions polaires, celles-ci doivent être protégées. Ainsi, l'introduction d'une fonction amine primaire passe, par exemple, par l'utilisation de la forme protégée de type *tert*-butoxycarbonyle (Boc). L'utilisation d'un composé alcoolate-Boc permet d'amorcer la polymérisation anionique du L-lactide. Il s'agit également d'une polymérisation par ouverture de cycle (Ring-Opening Polymerization, ROP). Après polymérisation, une déprotection par traitement à l'acide formique puis à la triéthylamine permet de régénérer l'amine primaire en bout de chaîne. C'est la stratégie de l'équipe de Ohya²⁰ mise en oeuvre pour synthétiser un conjugué poly(L-lactide)/lactose. Le couplage du polymère aminé ($M_n = 9500$ g/mol, $I_p = 1,3$) avec 20 équivalents de lactose ne mène qu'à 34% de rendement. En revanche, le couplage du même polymère avec 4 ou 8 équivalents de lactonolactone permet d'obtenir en 24h des rendements de couplage élevés (87% et 100% respectivement) (cf. Figure 4).

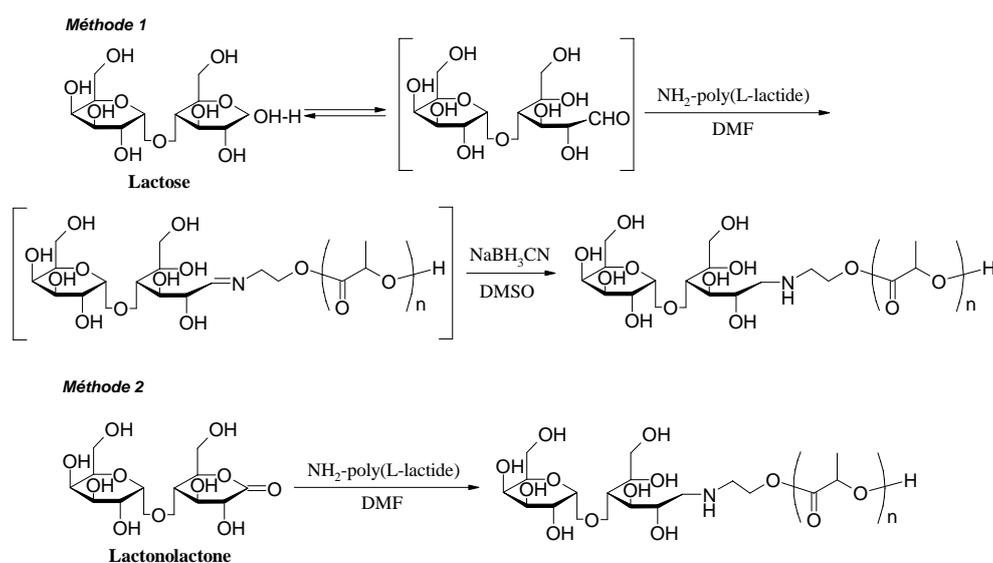


Figure 4 : Deux voies de couplage du lactose sur un polymère aminé.²⁰

Dans certaines conditions, comme l'utilisation d'un solvant anhydre aprotique (ex : THF) et d'un amorceur alcoolate très réactif²¹, il n'est pas nécessaire de protéger les fonctions amine. La polymérisation séquencée de l'oxyde d'éthylène et du méthylidène malonate (noté MM 2.1.2) amorcée par un 2-aminoéthanolate a permis à l'équipe de Riess²² d'obtenir un copolymère à blocs ($M_n \sim 6000\text{g/mol}$, $I_p=1,32$) avec un taux de fonctionnalisation terminale de 98%. En revanche, la mise en œuvre de la même stratégie pour introduire une fonction aldéhyde est passée par l'utilisation d'une protection par un groupe acétal. Ces copolymères à blocs ont servi au couplage de dérivés du mannose (Man) (Figure 5) :

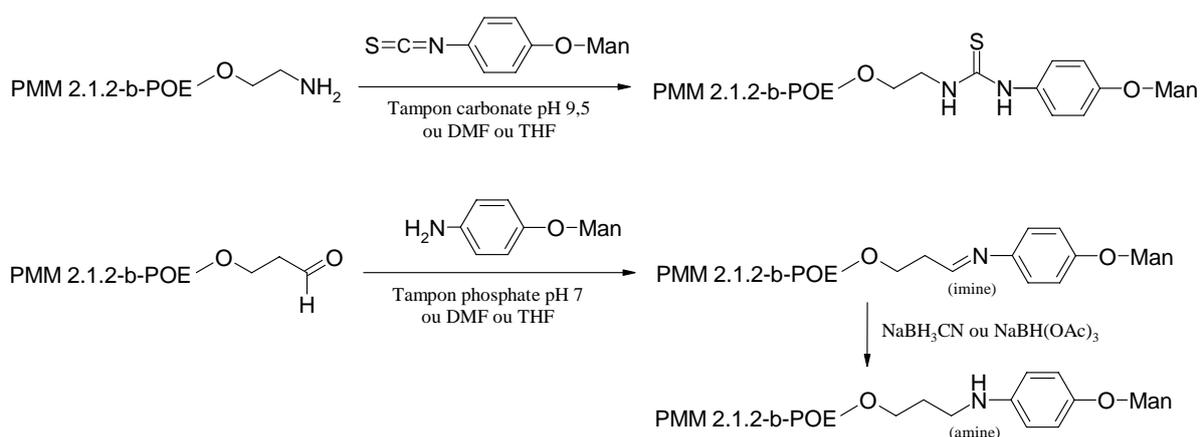


Figure 5 : Couplage de dérivés Mannose sur les extrémités de chaînes des copolymères synthétisés par polymérisation anionique.²²

La première voie (copolymère aminé) n'a pas permis de dépasser 59% de couplage malgré la présence de 25 équivalents de mannose-isothiocyanate dans du THF. La deuxième solution proposée par les auteurs (réaction d'amination réductrice) donne de meilleurs résultats dans le DMF : 85% de couplage, mais avec tout de même 10 équivalents de mannose aminé.

Le passage par une amine protégé (Boc) a également été utilisé par Metselaar *et al.*²³ pour la polymérisation par ouverture de cycle d'un précurseur d'acide aminé (α -benzyl L-glutamate N-carboxy anhydride). Après déprotection, le polymère possède une fonction amine primaire en extrémité α .

b. Présence de la fonction réactive à l'extrémité ω

La même étude²³ décrit la polymérisation d'un autre précurseur (β -benzyl L-aspartate N-carboxy anhydride) qui conduit ici directement à la présence d'une fonction amine primaire en extrémité ω . Dans ce cas, il n'est donc pas utile d'utiliser un amorceur fonctionnel particulier. Le couplage entre ce polymère aminé et un lipide (distearyl) portant un ester activé de type NHS a ensuite été réalisé. Les rendements de couplage sont d'environ 65%.

Un autre exemple de polymérisation par ouverture de cycle qui conduit directement à une fonction réactive en extrémité ω est donné par la polymérisation de l' ϵ -caprolactone. La fonction hydroxyle terminale des chaînes poly(ϵ -caprolactone) ($M_n = 3400\text{ g/mol}$, $I_p = 1,16$) peut ensuite être convertie en groupe phosphatidylcholine avec un rendement de l'ordre de 90%.²⁴ Ce groupe, naturellement présent dans les phospholipides constitutifs des membranes cellulaires, donne un caractère bio-mimétique au polymère biocompatible et biodégradable qu'est la poly(ϵ -caprolactone).

c. ω -fonctionnalisation par désactivation du centre actif

Les polymérisations anioniques dites « vivantes » présentent la particularité suivante : le centre actif (c-a-d le carbanion) reste présent en extrémité ω des chaînes en fin de polymérisation (c-a-d après la consommation totale du monomère). La conservation de ce centre actif très réactif peut être exploitée pour la fonctionnalisation des bouts de chaînes *in situ* : Hayashi *et al.*²⁵ ont synthétisé différents monosaccharides protégés chlorés qui ont servi à désactiver des chaînes anioniques suivant le principe illustré par la Figure 6. Il s'agit de polystyrène et de polyisoprène de masses molaires variant entre 2000 et 12000 g/mol avec des indices de polymolécularité inférieurs à 1,1. La terminaison de ces macro-anions polystyryl-lithium et polyisoprènyl-lithium s'effectue à -78°C en présence de 1,5 équivalents de monosaccharide chloré. Elle conduit à des taux de fonctionnalisation très proches de 100%.

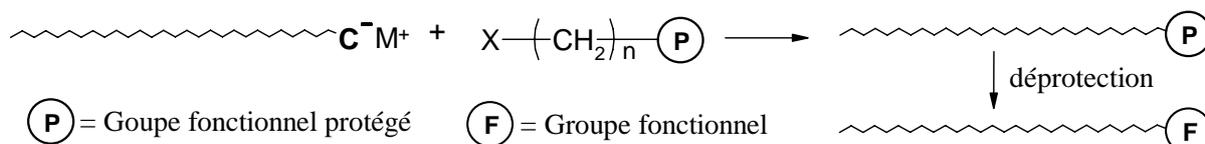


Figure 6 : Principe de fonctionnalisation *in situ* d'un polymère « vivant » synthétisé par polymérisation anionique.²⁵

Avec la même idée de terminaison *in situ* d'un centre actif par un composé d'intérêt, l'équipe de Sleiman²⁶ a synthétisé une structure macromoléculaire conjuguant un copolymère luminescent avec la biotine. Il s'agit là de polymérisation par ouverture de cycle par métathèse (Ring-Opening Metathesis Polymerization, ROMP) de deux monomères dont l'un porte un chromophore (ruthenium(II) bipyridine) (Figure 7). Les centres actifs créés par le complexe de Grubbs $(\text{PCy}_3)_2\text{Cl}_2\text{Ru}=\text{CHPh}$ sont désactivés en fin de polymérisation par 30 équivalents d'un énoïl portant une biotine. L'efficacité de cette désactivation est proche de 95%. Le copolymère à blocs résultant s'organise en agrégats micellaires dans un mélange acétonitrile/eau. Ces agrégats comportent le bloc luminescent au cœur des micelles et les biotines en surface. L'application de telles structures consiste en la capture et la détection de bio-molécules.

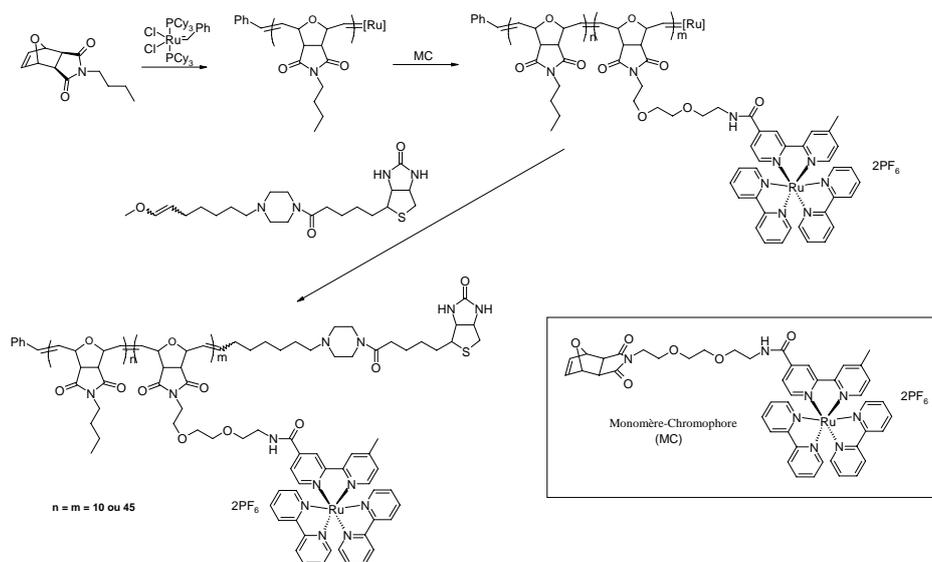


Figure 7 : Synthèse d'un conjugué copolymère luminescent/biotine par polymérisation par métathèse.²⁶

La synthèse de conjugués de type polymères α -bio-fonctionnels par la technique de désactivation du centre actif *in situ* est une méthode qui offre l'un des meilleurs rendements. Cependant, la ROMP est une technique limitée aux monomères cycliques. La polymérisation ionique n'est pas limitée à ce niveau là, mais les conditions expérimentales requises sont très contraignantes en comparaison à celles des polymérisations radicalaires.

I-4. Polymères synthétisés par polymérisation radicalaire contrôlée

Les techniques de polymérisation radicalaire contrôlée sont apparues après les techniques de polymérisation mentionnées précédemment. Elles combinent les facilités de mise en œuvre de la polymérisation radicalaire conventionnelle avec un contrôle efficace de la distribution des masses molaires jusque là réservé aux polymérisation ioniques vivantes. On recense trois techniques principales (NMP, ATRP, RAFT) dont les principes respectifs sont précisés dans la 3^{ème} partie de ce chapitre (pages 27, 34 et 48).

Il n'y a pas dans ce cas rétention du centre actif en bout de chaîne comme en polymérisation ionique. En revanche, les conditions expérimentales sont optimisées pour qu'une grande majorité de chaînes se trouvent sous forme dormante (P-X) en fin de polymérisation (cf. Schéma 1, page 26). Ainsi, il est possible de parler d'un certain « caractère vivant » de ces chaînes même s'il ne s'agit pas de polymérisation vivante au sens strict du terme. La fonction « dormante » (X) en extrémité de chaîne peut éventuellement être exploitée pour une ω -fonctionnalisation.

a. Fonctionnalisation via modification chimique de l'extrémité ω

Une modification très simple des extrémités de chaînes est possible avec les polymères obtenus par le procédé RAFT : le groupe thiocarbonylthio qui termine les chaînes se transforme facilement en thiol par hydrolyse en conditions basiques^{27,28} ou par aminolyse²⁹. La réaction ultérieure avec un composé portant une fonction maléimide permet la fonctionnalisation du polymère. Cette stratégie a été employée, lors de la polymérisation contrôlée du NIPAAm, par l'équipe de Hoffman³⁰ et, très récemment, par celle de McCormick.^{31,32} Dans le premier cas, les polymères hydrolysés (M_n dans la gamme 3000-26000 g/mol, $I_p < 1,2$) ont été mis en présence d'un excès de biotine-maléimide. Le bio-conjugué a été obtenu avec un rendement d'environ 60%. Après addition de streptavidine (qui reconnaît la biotine de manière très spécifique), une modification du comportement thermosensible du poly(NIPPAm) a été mise en évidence. Cela permet la formation thermo-réversible de particules stables.³⁰ Dans le deuxième cas, 150 équivalents de pyrène-maléimide ont été utilisés pour la fonctionnalisation d'un poly(NIPPAm) hydrolysé ($M_n = 39500$ g/mol, $I_p = 1.07$) (Figure 8). Le rendement de couplage a été déterminé grâce à une détection SEC/RI/UV* ; il est d'environ 83%.³² Le conjugué est ensuite longuement purifié par des étapes de précipitation, filtration et dialyse. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un conjugué biologique à proprement parler, les polymères fluorescents ont de nombreuses applications potentielles dans le diagnostic biologique ou génique et dans la libération contrôlée de principes actifs.

* SEC/RI/UV = size exclusion chromatography/refractive index/ultra-violet : chromatographie d'exclusion stérique avec mesures de l'indice de réfraction et de l'absorbance dans le domaine des ultra-violets.

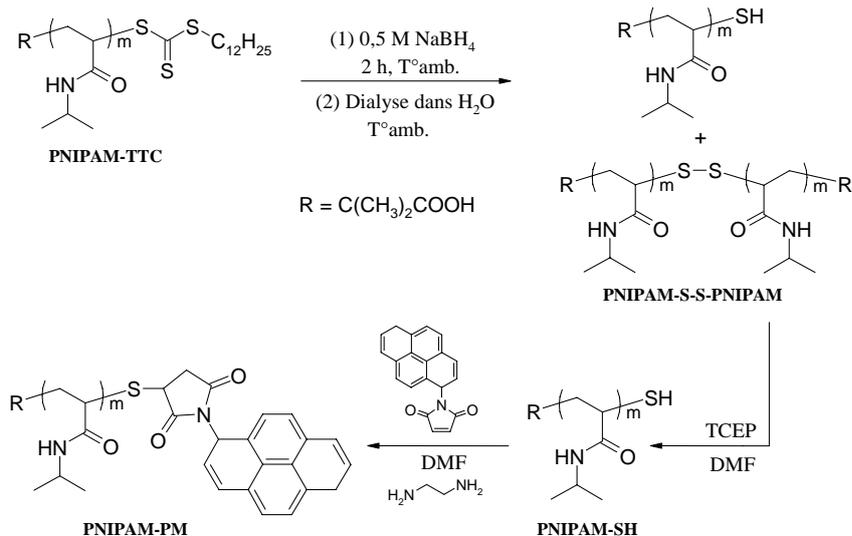


Figure 8 : Synthèse d'un polymère fluorescent après polymérisation de type RAFT.^{31,32}

(remarque : utilisation d'un agent réducteur, le tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), pour prévenir la formation de pont disulfure S-S)

De tels conjugués polymère-pyrène ont également été synthétisés par Nakayama et Okano²⁹ : la transformation en thiol de l'extrémité dithioester d'un copolymère poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-*N,N*-diméthylacrylamide-*b*-méthacrylate de benzyle) ($M_n = 17300$ g/mol, $I_p = 1,15$) a été réalisée par aminolyse en présence de 20 équivalents de 2-éthanamine. Ensuite, 20 équivalents de pyrène-maléimide ont été ajoutés. Aucun rendement de couplage n'a été déterminé.

Concernant également la synthèse de polymères marqués par un groupe pyrène, du polystyrène synthétisé par polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxydes (NMP) a été utilisé par Harth *et al.*³³ L'idée originale de fonctionnalisation *in situ* repose sur l'impossibilité à homopolymériser de l'anhydride maléique (ou ses dérivés maléimide). Ainsi, la réaction à 120°C pendant 4 heures d'un polystyrène-alcoxyamine ($M_n = 4400$ g/mol, $I_p = 1,08$) avec 4 équivalents de pyrène-maléimide est censée permettre l'addition d'un unique motif maléimide comme envisagé sur la Figure 9 (cas de l'anhydride maléique). Non seulement cette addition a bien lieu, mais il a également été observé dans certains solvants (DMF), une élimination totale de l'extrémité alcoxyamine (Figure 10). Ce protocole a été appliqué à une série d'échantillons polystyrène dont la masse molaire varie de 2000 g/mol à 50000 g/mol. Le taux d'insertion du pyrène-maléimide a été mesuré : il est de 98% **après purification** des échantillons, ce qui ne renseigne peut-être pas fidèlement sur le taux réel de « couplage » si les éventuelles chaînes non fonctionnalisées ont été éliminées. Cependant, cette valeur est confirmée, pour les échantillons de faibles masses molaires, par des analyses par RMN ¹H.

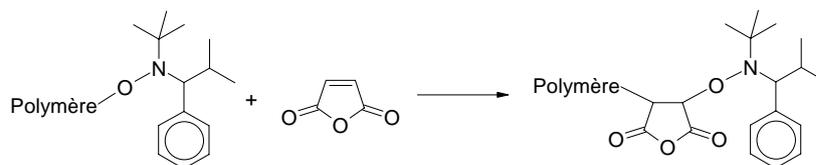


Figure 9 : Principe de l'addition d'une unité anhydride maléique.

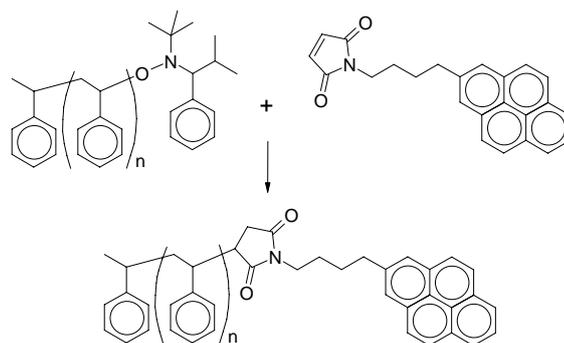


Figure 10 : Fonctionnalisation d'une extrémité de chaîne alcoxyamine par un maleimide-pyrène.³³

b. Fonctionnalisation via l'extrémité α

En utilisant la technique de polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome (ATRP), Haddleton et ses collaborateurs se sont fréquemment intéressés à l'introduction de fonctions réactives en bout de chaînes en vue du couplage avec des protéines.³⁴⁻³⁸ Bien qu'il soit possible de modifier chimiquement l'extrémité halogénée des polymères synthétisés par la technique ATRP (fonctionnalisation en ω)³, leur stratégie est tournée vers l'introduction d'une fonction réactive *via* l'utilisation d'un amorceur fonctionnel (fonctionnalisation en α). Le choix de cette fonction réactive découle directement de la nature des acides aminés présents sur la protéine considérée et du type de conjugaison souhaitée.

Un acide aminé très présent dans les protéines est la **lysine** ; celle-ci présente une fonction amine primaire latérale. Ainsi, l'introduction d'une fonction aldéhyde ou bien d'une fonction acide carboxylique à l'extrémité d'un poly(méthacrylate de polyéthylène glycol (PEG)) semble une voie intéressante pour la « PEGylation » des protéines. Cela a été réalisé en utilisant un amorceur portant un aldéhyde protégé (sous forme acétal) ou un ester activé de type succinimide (noté COONHS). Le premier a été synthétisé en deux étapes à partir du 2-chloro-1,1-diméthoxyethane avec un rendement final d'environ 50%³⁴ (cf. Figure 11), le second à partir du N-hydroxysuccinimide (NHS) avec un rendement de 35 ou 48% selon la nature de l'amorceur synthétisé³⁸ (cf. Figure 12). Après polymérisation contrôlée, les divers polymères fonctionnels ont été dissous en milieu aqueux en présence de lysozymes, choisis comme enzyme modèle. Bien qu'un lysozyme présente 7 acides aminés lysine en surface, les quantités employées correspondent à un large excès en polymère. Les réactions de couplage sont suivies par HPLC et électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Un polymère-aldéhyde ($M_n = 1100$ g/mol, $I_p = 1,14$)³⁴ et un polymère-COONHS ($M_n = 2800$ g/mol, $I_p < 1,15$) permettent effectivement la formation de bio-conjugués en ne laissant plus de lysozymes libres après 6h. Les résultats des électrophorèses sur gel semblent indiquer la fixation de 6 à 7 chaînes de poly(méthacrylate de PEG) par lysozyme. En revanche, un polymère-COONHS de masse molaire un peu plus importante ($M_n = 6400$ g/mol, $I_p < 1,15$) n'a permis aucun couplage même après 24 heures.³⁸

Des travaux très semblables ont également été entrepris à partir de l'amorceur-COONHS pour copolymériser le méthacrylate de méthyle avec un dérivé méthacrylate fluorescent. Le copolymère résultant a aussi été couplé à des lysozymes.³⁷

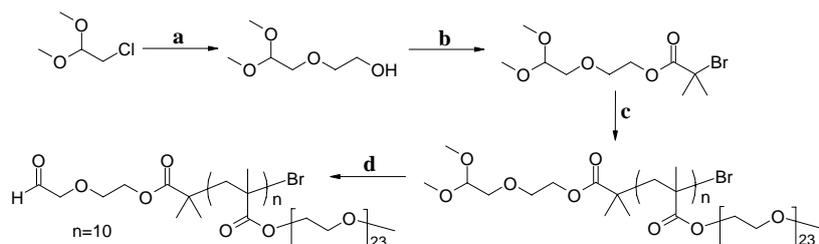


Figure 11 : Synthèse, par la technique ATRP, de poly(méthacrylate de polyéthylène glycol) portant une fonction **aldéhyde** en extrémité de chaîne (*d* : déprotection par traitement à l'acide trifluoroacétique (TFA)).³⁴

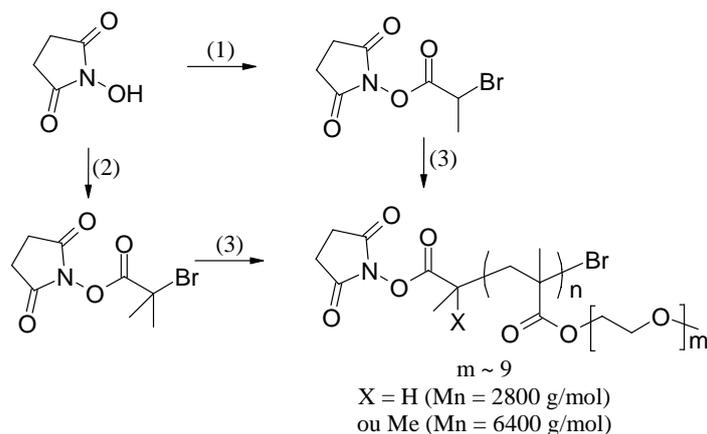


Figure 12 : Synthèse, par la technique ATRP, de poly(méthacrylate de polyéthylène glycol) portant une fonction **ester activé** en extrémité de chaîne.³⁸

Un autre type d'acide aminé fréquemment visé pour réaliser un bio-conjugué est la **cystéine** portée par certaines protéines. La cystéine présente une fonction thiol latérale. Un polymère terminé par un groupe maléimide est donc un candidat idéal pour la conjugaison. Cependant, l'utilisation d'un amorceur-maléimide en vue d'obtenir ce type de polymère se heurte au risque de copolymérisation de celui-ci avec le monomère. En effet, tout comme l'anhydride maléique, les dérivés maléimide possèdent une double liaison qui peut participer à une réaction d'addition radicalaire (cf. Figure 10, p.16) Ainsi, un amorceur portant une fonction maléimide protégée a été utilisé pour la polymérisation de type ATRP d'un méthacrylate de polyéthylène glycol. La fonction réactive est déprotégée de manière très efficace (100%) par une réaction de rétro-Diels-Alder³⁵ (cf. Figure 13). La disponibilité de la fonction maléimide sur un polymère de masse molaire de 9000 g/mol ($I_p = 1,09$) a été vérifiée par couplage avec une protéine modèle BSA (« bovine serum albumin ») qui présente un unique acide aminé cystéine. Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide montre effectivement la présence de conjugués après 18h de réaction.

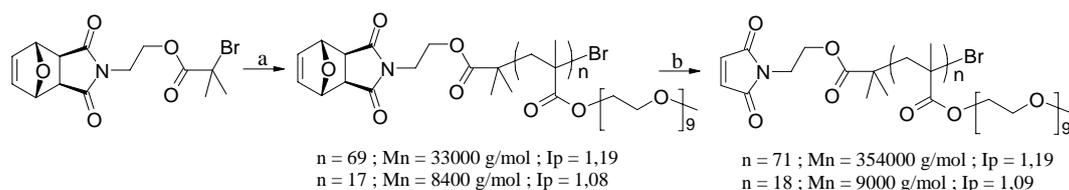


Figure 13 : Synthèse, par la technique ATRP, de poly(méthacrylate de polyéthylène glycol) portant une fonction **maléimide** en extrémité de chaîne (*b* : rétro-Diels-Alder, 7h dans le toluène à reflux).³⁵

Les acides aminés cystéine sont également réactifs vis-à-vis des fonctions disulfure de pyridyle. Ainsi, Bontempo *et al.* ont synthétisé divers polymères α -fonctionnels (M_n compris entre 4000 et 16000 g/mol, $I_p < 1,25$) de poly(méthacrylate de 2-hydroxyéthyle) en utilisant l'amorceur adéquat³⁹ (cf. Figure 14). Le risque de l'utilisation d'un tel amorceur-disulfure est qu'il puisse également jouer le rôle d'agent de transfert (irréversible). Cependant, il a été vérifié que 86 à 91% des chaînes portaient effectivement une fonction pyridyl disulfure à une extrémité. Tout comme l'exemple précédent, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide montre la présence de conjugué BSA/polymère après 30 min de réaction à température ambiante en présence d'un excès de polymère.

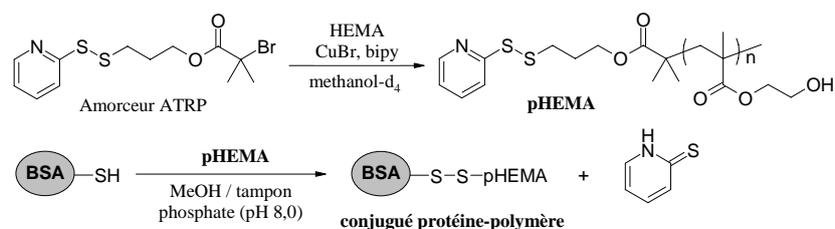


Figure 14 : Synthèse, par la technique ATRP, de poly(2-hydroxyethyl methacrylate) portant une fonction **disulfure de pyridyle** en extrémité de chaîne. Couplage avec la protéine BSA.³⁹

Depuis l'optimisation des conditions expérimentales effectuée par Joshi *et al.*⁴⁰, des conditions de réaction douces permettent l'utilisation des acides aminés **tyrosine** comme site de couplage avec des polymères. La chimie mise en jeu est basée sur une réaction de Mannich entre les trois réactifs que sont la tyrosine, un aldéhyde et l'aniline. Ainsi, une fonction aniline a été introduite à l'extrémité d'un poly(méthacrylate de polyéthylène glycol) ($M_n = 10000$ g/mol, $I_p = 1,1$) *via* l'utilisation d'un amorceur de polymérisation ATRP contenant une fonction aniline protégée par un groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc).³⁶ Après polymérisation et déprotection (TFA), l'introduction de formaldéhyde et d'un défaut de lysozymes, qui comportent 3 acides aminés tyrosine, conduit à la formation d'un bio-conjugué. Après 10 jours en milieu aqueux (pH = 6) et à température ambiante, une analyse par HPLC montre qu'il ne reste pas de lysozymes libres.

I-5. Conclusion

Comme l'indique le tableau récapitulatif (Tableau 1, pages suivantes), les stratégies de synthèse post-polymérisation de bio-conjugués sont assez variées et impliquent des polymères de diverses natures provenant de tous les types de procédés de polymérisation. Cependant, dans la grande majorité des cas, les rendements de couplage sont limités (inférieurs à 70%). Et cela, même en mettant en jeu plusieurs, voire beaucoup, d'équivalents du composé d'intérêt par rapport aux fonctions réactives terminales du polymère. Cela s'explique par une disponibilité limitée de ces fonctions, disponibilité qui diminue d'autant plus que les masses molaires des chaînes polymère augmentent. Ainsi, les polymères utilisés ont généralement une masse molaire moyenne en nombre inférieure à 10000 g/mol; très peu d'entre eux dépassent les 20000 g/mol. De plus, du fait des rendements de couplage limités, les procédés de purification des bio-conjugués résultants sont souvent complexes et fastidieux.

Tableau 1 : Synthèse de bio-conjugués à partir de polymères préformés.

Polymère	M_n [ou M_w] (g/mol)	Composé d'intérêt	Réactivité sur le polymère/sur le composé d'intérêt	Nombre d'équivalents /polymère	Rendement de couplage (%)	Référence (Figure)
<i>Polymères commerciaux</i>						
Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)	[10000]	Oligonucléotide	-COOH / -NH ₂ (DCC/NHS)	1	75	8
PtBA	4200	Lipide	-COOH / -NH ₃ ⁺ (TEA)	1	34	9
PEG	[2000]	Lipide Galactose	-NH ₂ / -COOH (DCC/NHS)	4	34 20	10
PEG	[3800]	Biotine	-NH ₂ / -COONHS	non précisé	non déterminé	11
PLA	[73000]	Galactose	-COOH / -NH ₂ (HOBT)	2	60-70	12
PEG	3400	Mannose	-MAL / -SH	non précisé	non déterminé	13
<i>Polymères synthétisés par télomérisation en polymérisation radicalaire conventionnelle</i>						
PNIPAAm	5000-19000	Enzyme	-COOH / -NH ₂ (DCC/NHS)	Large excès	non déterminé	16 (Figure 1, p.9)
PNIPAAm	11000	Streptavidine	-COONHS / -NH ₂	Large excès	20	17
Poly(DMA-co-AZAAM)	< 5000	Enzyme	-vinyl sulfone / -SH	50	"high"	18 (Figure 2, p.10)
PVP	700-20000	Lipide	-NH ₂ / -COCl (TEA) -COOH / -NH ₂ (DCC)	excès	non déterminé	19 (Figure 3, p.10)
<i>Polymères synthétisés par polymérisation anionique et/ou ROP</i>						
Poly(L-lactide)	9500	Lactose Lactonolactone	-NH ₂ / lactose -NH ₂ / lactonolactone	20 8	34 100	20 (Figure 4, p.11)
PMM 2.1.2-b-POE	6000	Mannose	-NH ₂ / -N=C=S -CHO / -NH ₂	25 10	59 85	22 (Figure 5, p.12)

PtBA : poly(acrylate de *tert*-butyle) ; DCC : dicyclohexyl carbodiimide ; NHS: *N*-hydroxysuccinimide ; TEA: triéthylamine ; PEG : poly(éthylène glycol) ; -COONHS = fonction acide carboxylique activée par le NHS (ester activé) ; PLA : poly(acide lactique) ; HOBT : 1-hydroxybenzotriazole ; -MAL = fonction maléimide ; DMA : diméthylacrylamide ; PNIPAAm : poly(*N*-isopropylacrylamide) ; AZAAM : 4-phenylazo-phenylacrylamide ; PVP : poly(vinyl pyrrolidone) ; PMM 2.1.2 : poly(méthylidène malonate 2.1.2) ; POE : poly(oxyde d'éthylène) ; ECP : phosphate de chloroéthylène ; BzMA : méthacrylate de benzyle ; PMAPEG : poly(méthacrylate de poly(éthylène glycol)) ; PMMA : poly(méthacrylate de méthyle) ; PHEMA : poly(méthacrylate de 2-hydroxyéthyle) ; FA : formaldéhyde.

Tableau 1 (suite) : Synthèse de bio-conjugués à partir de polymères préformés.

Polymère	M_n [ou M_w] (g/mol)	Composé d'intérêt	Réactivité sur le polymère/sur le composé d'intérêt	Nombre d'équivalents /polymère	Rendement de couplage (%)	Référence (Figure)
<i>Polymères synthétisés par polymérisation anionique et/ou ROP(suite)</i>						
Poly(ϵ -caprolactone)	3400	Phosphatidylcholine	-OH / ECP	excès	90	24
Poly(L-hydroxyethyl asparagine) Poly(hydroxyethyl glutamine)	3000-8000	Lipide	-NH ₂ / -NHS	non précisé	65	23
Polystyrène Polyisoprène	2000- 12000	Monosaccharides	-C ⁻ Li ⁺ / -Cl	1,5	100	25 (Figure 6, p.13)
<i>Polymères synthétisés par ROMP</i>						
Poly(<i>N</i> - butyloxanorbornenimide)	~11000	Biotine	=[Ru] / énoI éther	30	95	26 (Figure 7, p.13)
<i>Polymères synthétisés par le procédé RAFT</i>						
PNIPAAm	3000- 26000	Biotine	- SH / -MAL	excès	60	30
PNIPAAm	39500	Pyrène		150	83	31,32 (Figure 8, p.15)
Poly(NIPAAm-co-DMA- b-BzMA)	17300	Pyrène		20	non déterminé	29
<i>Polymères synthétisés par le procédé NMP</i>						
Polystyrène	2000- 50000	Pyrène	- Nitroxyde / -MAL	4	98	33 (Figure 10, p.16)
<i>Polymères synthétisés par le procédé ATRP</i>						
PMAPEG	1100	Lysozyme (protéine)	-CHO / -NH ₂	en défaut	non déterminé	34 (Figure 11, p.17)
PMAPEG	2800 6400		-COONHS / -NH ₂		non déterminé 0	38 (Figure 12, p.17)
PMMA	non précisé		-COONHS / -NH ₂		37	
PMAPEG	9000	BSA (protéine)	-MAL / -SH		non déterminé	35 (Figure 13, p.17)
PHEMA	4000- 16000		-disulfure de pyridyle / -SH		39 (Figure 14, p.18)	
PMAPEG	10000		lysozyme		-aniline / -tyrosine (FA)	36

II. Fonctionnalisation avant polymérisation (hors PRC)

Pour pallier les inconvénients de la fonctionnalisation post-polymérisation, une stratégie alternative consiste à introduire directement le composé d'intérêt *via* l'amorceur ou *via* un agent de transfert. Cette idée a été testée bien avant le développement des techniques de polymérisation radicalaire contrôlée.

II-1. Agents de transfert fonctionnels (télomérisation)

Ainsi, en se limitant toujours aux bio-conjugués, citons l'utilisation d'un agent de transfert lipidique, par Kitano *et al.*⁴¹ Celui-ci peut être synthétisé selon deux voies de synthèse, A et B, schématisées sur la Figure 15. Les rendements après purification sont assez faibles : 32% pour la voie A et 12% pour la voie B. Après polymérisation radicalaire conventionnelle du *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) ou de l'acide acrylique (AA) en présence de cet agent de transfert lipidique à diverses concentrations, différents oligomères-lipides sont obtenus (DP moyen compris entre 3 et 34). Leur utilisation en mélange équimassique avec un lipide non modifié conduit à la formation de liposomes thermosensibles (polyNIPAAm) ou pH-sensibles (polyAA). Ces caractéristiques sont très recherchées pour des vecteurs de principes actifs car elles en assurent une libération contrôlée.

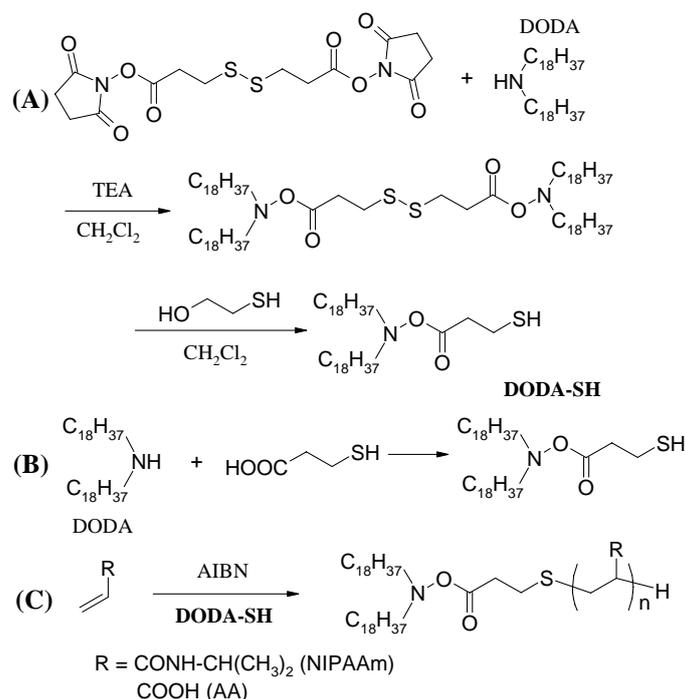


Figure 15 : Synthèse d'un agent de transfert lipidique (DODA-SH) selon deux voies (A et B) ; Polymérisation radicalaire conventionnelle à l'aide de cet agent de transfert irréversible (C).⁴¹

II-2. Amorceurs fonctionnels

a. Polymérisation radicalaire conventionnelle

Toujours pour la même application, l'équipe de H. Kitano avait précédemment utilisé un amorceur de type azo modifié par le même lipide⁴² (cf. Figure 16). Sa synthèse nécessite une activation par le NHS de l'amorceur commercial 4,4'-azobis(4-acide cyanopentanoïque) (ACPA) afin d'obtenir l'amorceur-ester activé nommé ACPS. La réaction de celui-ci avec la dioctadécylamine (amine secondaire) conduit à l'amorceur lipidique souhaité avec un rendement assez faible (27%). La polymérisation radicalaire conventionnelle de l'acide acrylique à partir de diverses concentrations initiales en amorceur permet l'obtention de polymères α -fonctionnels présentant des masses molaires plus élevées que celles de l'exemple précédent (DP moyen compris entre 7 et 156).

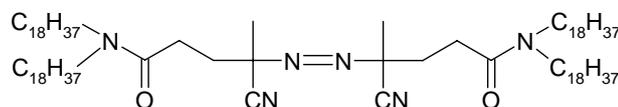


Figure 16 : Amorceur de polymérisation radicalaire de type lipidique.^{42,43}

Pour une autre application, mais en gardant une stratégie de bio-mimétisme, un amorceur azo porteur de groupes phosphatidylcholine a été utilisé lors de la polymérisation en émulsion du styrène.⁴⁴ Les particules obtenues permettent une réduction de l'adsorption en surface de la protéine BSA, par comparaison à celles obtenues avec un amorçage classique par le persulfate de potassium (KPS). Ce nouvel amorceur a été parfaitement caractérisé (point de trouble, concentration micellaire critique, constante de vitesse de décomposition,...).

Une autre étude comportant une caractérisation complète d'un amorceur azo fonctionnel est celle de Ganachaud *et al.*⁴⁵ : un amorceur-biotine a été synthétisé par couplage entre l'ACPS et une biotine aminée (amine primaire, rendement ~60%). La détermination de sa constante de vitesse de décomposition dans le DMF à différentes températures a permis d'obtenir les paramètres de la loi d'Arrhenius (énergie d'activation E_a et facteur pré-exponentiel A). De plus, l'exploitation des données cinétiques de plusieurs polymérisations de la N-vinylpyrrolidone a permis d'accéder à la valeur du facteur d'efficacité f : celle-ci est plutôt faible, aux environs de 0,15 (pour un rapport [monomère] / [amorceur] faible d'environ 200 ; valeur non déterminée pour d'autres rapports). L'ACPS a également un facteur d'efficacité faible (~0,3) pour le même rapport [monomère] / [amorceur]. Cependant, il atteint la valeur d'environ 0,7 au delà d'un rapport [monomère] / [amorceur] de 1000. Cet exemple met bien en avant l'inconvénient majeur de cette stratégie de fonctionnalisation : la recombinaison des radicaux primaires entraîne une perte du composé d'intérêt d'autant plus importante que le facteur d'efficacité est faible. Cela est assez dommageable dans le cas des composés biologiques qui sont souvent onéreux. Malgré cette faible valeur de f , un immun-essai réalisé avec un échantillon de poly(N-vinylpyrrolidone) de masse molaire moyenne en nombre de 6000 g/mol a confirmé la présence de biotine en extrémité de chaîne.

Bien plus récemment, Kitano *et al.*⁴³ se sont également intéressés aux glycopolymères, mais toujours avec un amorceur lipidique. Ils ont ré-utilisé l'amorceur azo de la Figure 16 pour la polymérisation radicalaire conventionnelle d'un monomère dérivé du mannose.

L'insertion des glycopolymères lipidiques obtenus (DP de 3 à 37) dans des liposomes permet à ces derniers d'acquérir des capacités de reconnaissance moléculaire vis-à-vis de protéines telles que des lectines.

b. Autres types de polymérisation

Un exemple de polymérisation cationique vivante utilisant un amorceur fonctionnel a également été reporté. Il s'agit d'un amorceur dérivé du glucose capable d'amorcer la polymérisation par ouverture de cycle de diverses 2-oxazolines⁴⁶ (cf. Figure 17). Après une étape de déprotection, les polymères de masses molaires contrôlées ($M_n = 1200-2700$ g/mol, $I_p < 1,4$) présentent une unité carbohydre en extrémité de chaîne à hauteur de 97-99%.

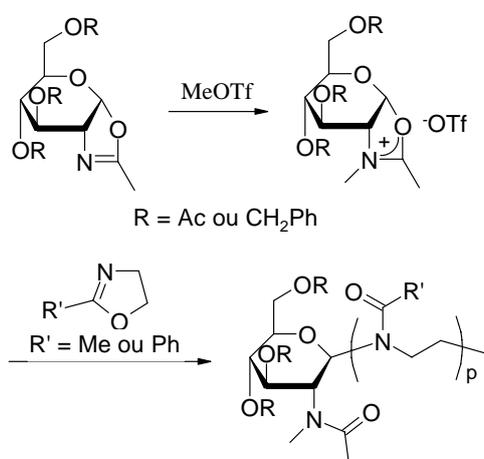


Figure 17 : Polymérisation cationique vivante par ouverture de cycle de 2-oxazolines à partir d'un dérivé glucose amorceur.⁴⁶

Un autre procédé de synthèse de glycopolymères lipidiques développé par l'équipe de H. Kitano utilise la polycondensation par ouverture de cycle d'un monomère précurseur de l'acide aminé lysine. L'amorçage par un lipide aminé puis une « déprotection » post-polymérisation conduit au polypeptide fonctionnalisé poly(lysine)-lipide⁴⁷ (cf. Figure 18). Le glycopolymère lipidique final est obtenu par couplage de maltose-lactone sur les fonctions amine portées par les lysines de la chaîne. Tout comme dans l'exemple précédent, ce lipoglycopolymère est inséré dans des liposomes.

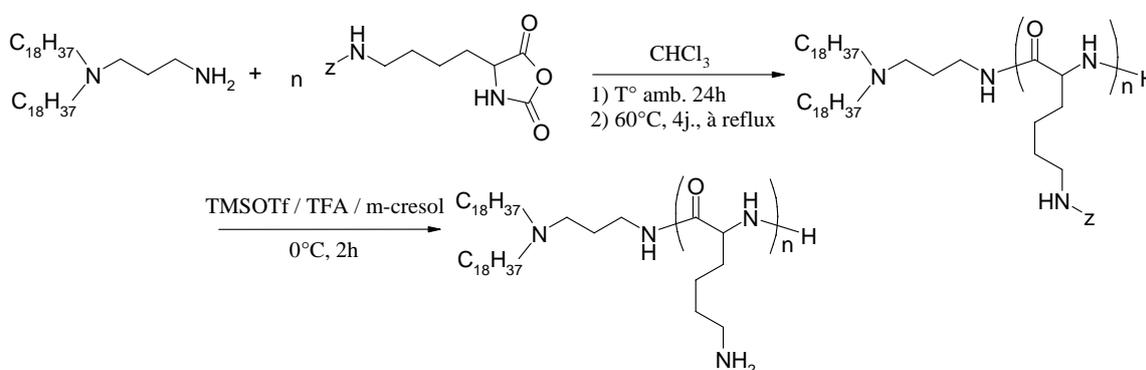


Figure 18 : Synthèse de poly(lysine)-lipide par polycondensation par ouverture de cycle.⁴⁷

II-3. Conclusion :

Malgré ces quelques exemples, la stratégie de synthèse d'amorceurs fonctionnels ne semble pas avoir été beaucoup développée pour plusieurs raisons :

- En polymérisation radicalaire conventionnelle, une faible valeur du facteur d'efficacité de l'amorceur peut induire une perte importante du composé d'intérêt. De plus, ce procédé ne permet pas la synthèse de conjugués bien définis (large distribution des masses molaires)
- La polymérisation ionique conduit à des conjugués bien définis mais requiert des conditions expérimentales très contraignantes et, en particulier, nécessite une protection des groupes fonctionnels.
- La polymérisation par ouverture de cycle (ionique ou non) est limitée à un nombre restreint de monomères.

De plus, le rendement de synthèse des amorceurs fonctionnels est souvent faible.

Avec l'apparition des techniques de polymérisations radicalaires contrôlées (PRC), la stratégie de fonctionnalisation de l'amorceur (ou du fragment amorceur de l'agent de contrôle) a pris un second souffle. Nous allons donc maintenant illustrer ce nouvel élan selon les trois techniques principales de PRC : la polymérisation contrôlée par les nitroxydes (NMP), la polymérisation par transfert d'atome (ATRP) et la polymérisation par transfert réversible de chaînes par addition-fragmentation (RAFT). Même si des ligands biologiques sont présents dans de nombreux exemples, cette troisième partie n'est plus limitée à la synthèse de bio-conjugués. De ce fait, elle ne peut prétendre à être totalement exhaustive malgré la large variété de composés d'intérêt présentés.

III. Fonctionnalisation avant polymérisation (par PRC)

Le principe général du contrôle de la polymérisation par les techniques de PRC est basé sur un équilibre entre des chaînes actives (P°) et des chaînes dormantes ($P-X$)⁴⁸. Une chaîne ($P-X$) est dite dormante lorsqu'elle peut être activée thermiquement, photochimiquement et/ou chimiquement pour donner un (macro)radical propageant (P°) (chaîne active). Sous sa forme active, une chaîne peut additionner des unités monomères jusqu'à sa désactivation conduisant à une nouvelle espèce dormante (ou jusqu'à une réaction de terminaison qui produit une chaîne morte, Schéma 1). Parmi les divers types de classement possibles, les techniques de polymérisation radicalaire contrôlée peuvent se différencier par la nature du groupe X.

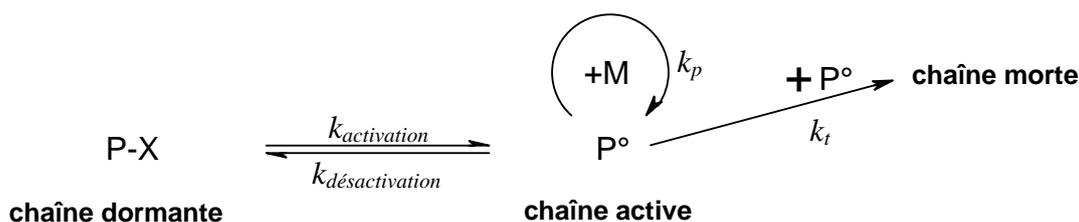


Schéma 1 : Equilibre entre chaînes actives et chaînes dormantes

Le nombre de chaînes dormantes étant déterminé par la quantité initiale en agent de contrôle (c-a-d le composé initial qui porte le groupe X), les masses molaires moyennes en nombre peuvent être calculées *a priori*. Cela permet de viser une masse molaire prédéterminée. Ainsi, trois critères expérimentaux permettent de valider le contrôle d'une polymérisation :

- Croissance linéaire des masses molaires moyennes en nombre avec la conversion et valeurs (très) proches des valeurs théoriques.
- Distribution étroite des masses molaires ; indice de polymolécularité proche de 1 (au moins inférieur à 1,5).
- Présence du groupe X en extrémité ω des chaînes dormantes. Celles-ci doivent constituer la population majoritaire de l'ensemble des chaînes ; d'où la possibilité de synthétiser des copolymères à blocs par polymérisation d'un deuxième monomère à partir des chaînes dormantes. Cette synthèse aisée de copolymères à blocs confère un certain « caractère vivant » aux procédés de PRC.

III-1. Amorceurs de polymérisation de type NMP

La technique de polymérisation contrôlée par les nitroxydes (nommée en anglais « Nitroxide Mediated Polymerization » NMP) est basée sur la stabilité relative des radicaux nitroxyles (= nitroxydes). En effet, ces derniers sont inertes vis-à-vis du monomère (pas de propagation) mais peuvent toutefois se recombinaison avec d'autres radicaux. En se couplant à un radical propageant P° , un nitroxyde forme une alcoxyamine qui a la faculté de se dissocier sous l'effet de la température ; d'où le caractère réversible de cette terminaison (Schéma 2).

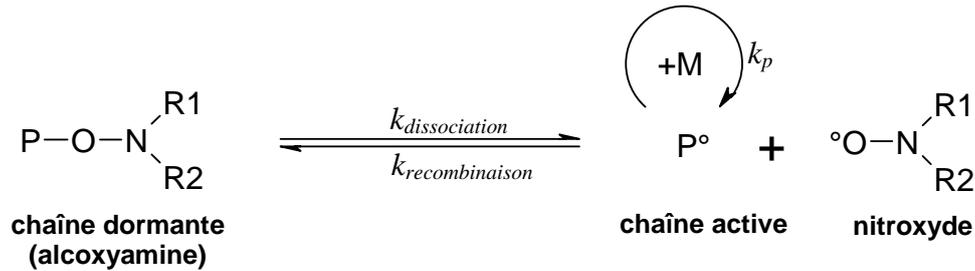


Schéma 2 : Principe de la terminaison réversible par les nitroxydes.

Historiquement, le nitroxyde nommé TEMPO (2,2,6,6-tetraméthylpiperidinyloxy, Schéma 3) fut le premier composé étudié dans des systèmes comprenant un amorceur radicalaire conventionnel (système bi-moléculaire).¹

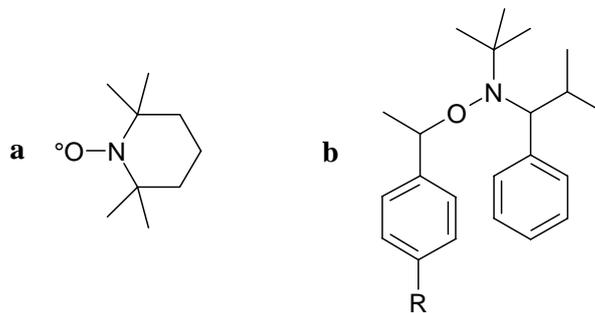


Schéma 3 : a) Structure du TEMPO ; b) Structure d'un type d'alcoxyamine fréquemment utilisé.

Par la suite, l'utilisation d'une alcoxyamine comme seul moyen d'amorçage a été développée (système mono-moléculaire) : sous l'effet de la température, l'alcoxyamine se dissocie en un fragment amorceur de la polymérisation et en un fragment nitroxyde (contrôlant la polymérisation). En début de polymérisation, la concentration en fragment amorceur étant relativement importante, les événements de terminaison irréversible impliquant ces fragments ne peuvent être évités. Ainsi, la stœchiométrie initiale entre les deux types de fragment est rapidement modifiée jusqu'à obtenir un léger excès en nitroxyde. Cet excès permet de rapidement limiter les événements de terminaison irréversible des chaînes en croissance ce qui permet un bon contrôle de la polymérisation. Ce phénomène est appelé « l'effet radical persistant » ou « effet Fisher ».⁴⁹

a. Amorceurs portant un ligand d'intérêt biologique

La technique de polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxydes peut répondre aux exigences d'une synthèse de bio-conjugués polymères parfaitement définis *via* l'introduction d'un composé d'intérêt biologique au sein de l'amorceur/contrôleur alcoxyamine.

✓ *Polypeptide :*

Becker *et al.*⁵⁰ ont décrit la synthèse supportée d'un conjugué polypeptide-polymère par cette voie (Figure 19 et Tableau 2, ligne 1) : l'extrémité aminée d'un polypeptide préalablement synthétisé sur support (résine Wang) est transformée en alcoxyamine (fluorée); cet amorceur supporté et fonctionnalisé est utilisé pour effectuer la polymérisation séquencée de l'acrylate de *tert*-butyle et de l'acrylate de méthyle à 130°C. Le bio-conjugué copolymère à blocs est ensuite séparé du support par traitement à l'acide trifluoroacétique qui transforme également le bloc poly(acrylate de *tert*-butyle) en bloc poly(acide acrylique). Sa structure a été vérifiée par RMN ¹H et RMN ¹⁹F : polypeptide-PAA₁₀₀-*b*-PMA₂₇₀-nitroxyde. Aucune analyse de la distribution des masses molaires n'ayant été effectuée, le contrôle efficace de la polymérisation n'est pas démontré. D'autre part, l'utilisation d'un amorceur supporté semble être un moyen potentiellement efficace de purification du bio-conjugué mais cette opportunité ne semble pas avoir été utilisée.

Les conjugués constitués d'un polymère biocompatible et d'un polypeptide adéquat peuvent faciliter le transfert de gènes (transfection) ou reconnaître spécifiquement des récepteurs cellulaires.

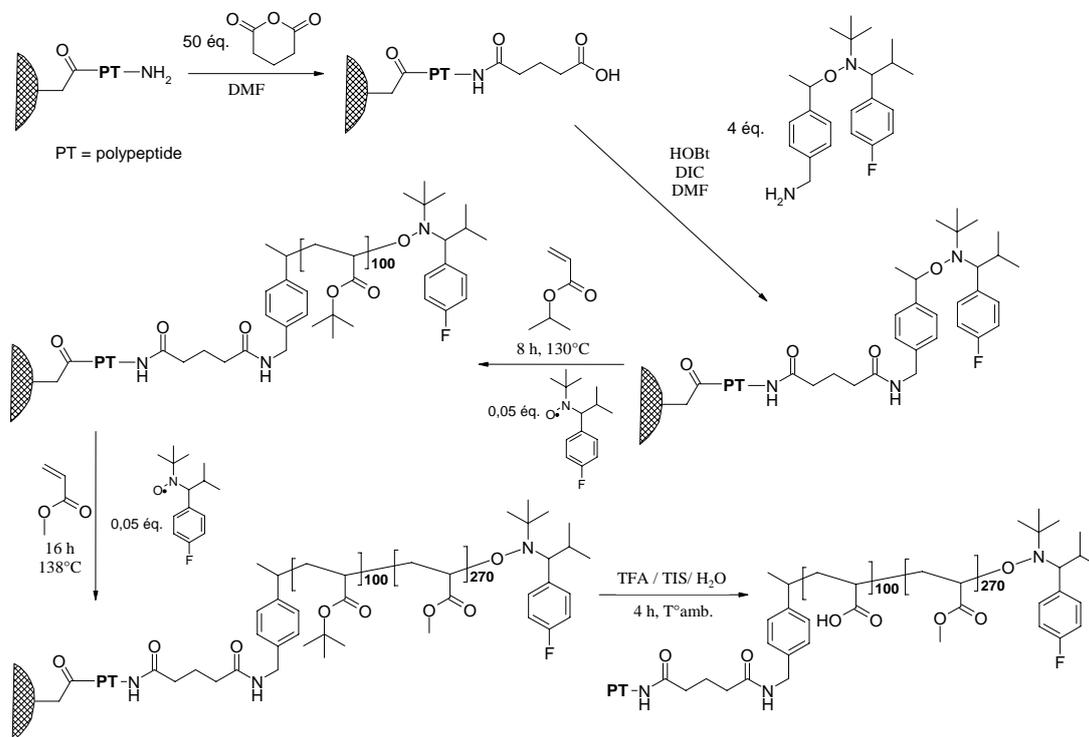


Figure 19 : Synthèse supportée de conjugués peptide-(co)polymère par la technique NMP⁵⁰

✓ *Base d'acide nucléique :*

Les bases d'acide nucléique peuvent également donner des capacités de reconnaissance moléculaire aux bio-conjugués. L'introduction de la base Uracile dans des alcoxyamines basées sur le TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy) ou le DEPN (*N*-tertbutyl-*N*-(1-diethylphosphono-2,2-dimethylpropyl)-*N*-oxyl) (Tableau 2, ligne 2) a permis la synthèse contrôlée à 130°C de chaînes polystyrène et poly(acrylate de *n*-butyle) α -fonctionnelles.⁵¹ Les masses molaires moyennes en nombre ont été déterminées par chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur de diffusion de la lumière et par RMN ¹H. Ces masses sont relativement proches des valeurs théoriques, et la bonne concordance entre les deux techniques d'analyse indique un taux de fonctionnalisation des chaînes proche de 100%.

En supplément des applications biologiques, l'introduction de bases d'acide nucléique dans les polymères permet de concevoir de nouveaux matériaux à mise en œuvre et recyclage facilités : par la formation de nombreuses liaisons hydrogènes entre les bases d'acide nucléique, les propriétés mécaniques et rhéologiques de tels matériaux sont thermo-réversibles et adaptables selon le nombre et l'agencement de ces liaisons.

✓ *Biotine :*

Un ligand extrêmement utilisé dans les applications bio-médicales est la biotine. Sa très forte affinité spécifique avec les protéines avidine et streptavidine en fait un ligand de choix pour la capture d'entités biologiques. D'autre part, pour parer aux problèmes d'adsorption non-spécifique des protéines sur les surfaces hydrophobes, ces dernières sont généralement modifiées par greffage d'un polymère hydrophile et neutre. C'est dans cette optique qu'a été utilisée une alcoxyamine modifiée par une biotine^{52,53} : bien que les « cheveux » de poly(acrylamide de *N,N*-diméthyle) soient synthétisés à partir d'une surface silicone par polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxydes, cette alcoxyamine-biotine n'est utilisée qu'en fin de polymérisation pour fonctionnaliser les extrémités de chaînes par le procédé d'échange de nitroxyde. Cela explique la présence de la biotine du côté du fragment nitroxyde et non du côté du fragment amorceur (cf. structure Tableau 2, ligne 3). Il s'agit donc d'un exemple de fonctionnalisation *in situ* post-polymérisation qui aurait pu être présenté dans la première partie de ce chapitre. Cependant, ce composé biotinylé a une structure *a priori* appropriée pour contrôler une polymérisation de type NMP et conduire directement à des chaînes ω -fonctionnelles.

✓ *Lipide :*

Enfin, une autre famille de composés biologiques fréquemment rencontrés dans les applications bio-médicales est la famille des lipides. Leur association à des glycopolymères forme des bio-conjugués très prometteurs pour la conception de bio-membranes synthétiques.⁵⁴ Ainsi, un monomère dérivé du glucose (1,2,5,6-di(isopropylidène)-*D*-glucose-2-propenoate) a été polymérisé de manière contrôlée à 105°C à l'aide d'une alcoxyamine modifiée par la *N,N*-di(octadecyl)amine⁵⁴ (cf. structure Tableau 2, ligne 4). La déprotection des motifs glucose conduit au bio-conjugué souhaité ayant une masse molaire moyenne en nombre d'environ 11000 g/mol avec un indice de polymolécularité de 1,2.

b. Amorceurs portant un fluorophore

Les chromophores Pyrène et Dansyl (Tableau 2, ligne 5 et 6) ont été utilisés par l'équipe de Hawker⁵⁵ pour confirmer l'aptitude des α -hydrido nitroxydes à contrôler la polymérisation du styrène et de l'acrylate de *tert*-butyle (à 120°C) tout en conservant d'excellents taux d' α -fonctionnalisation des chaînes polymères. En faisant l'hypothèse d'un coefficient d'extinction identique entre les alcoxyamines-chromophores et les polymères correspondants, les auteurs ont déterminé que plus de 95% des chaînes étaient α -fonctionnalisées, et ce même pour des chaînes de M_n allant jusqu'à 90.000 g/mol. Ce comportement tranche radicalement avec les alcoxyamines dérivées du TEMPO pour lesquelles de tels taux de fonctionnalisation n'étaient envisageables que pour de faibles masses molaires (<10000 g/mol).

Une étude comparable a été réalisée au sujet de l' ω -fonctionnalisation, en fixant les chromophores sur le fragment nitroxyde.

Ces conditions optimisées de fonctionnalisation des chaînes par la technique NMP ont été exploitées par Bowden *et al.*⁵⁶ pour introduire le fluorophore pérylène en extrémité de chaînes polystyrène, poly(styrène-*b*-isoprène) et poly(acrylate de *n*-butyle-*b*-styrène) (Tableau 2, ligne 7). Les polymérisations s'effectuent à 125°C et les indices de polymolécularité obtenus sont inférieurs à 1,1 pour les homopolymères et inférieurs à 1,3 pour les copolymères à blocs. Ces polymères marqués sont inclus dans des films d'un polymère hôte (PMMA) et permettent, par diverses techniques de fluorescence, de sonder la dynamique moléculaire à l'échelle locale et d'apprécier la présence d'hétérogénéités au sein du film.

c. Autre amorceur fonctionnel

Un précurseur de polymère fluorescent peut être synthétisé par l'introduction d'un groupe bipyridine ou terpyridine en extrémité de chaîne. En effet, ces groupes peuvent s'associer au ruthénium pour former un complexe fluorescent (cf. exemple Figure 7, p.13). Ainsi, une alcoxyamine portant un groupe terpyridine (cf. Tableau 2, ligne 8) a été utilisée pour contrôler la polymérisation en masse du styrène à 125°C.⁵⁷ Les analyses par chromatographie d'exclusion stérique semblent indiquer un bon contrôle de la polymérisation : les indices de polymolécularité sont inférieurs à 1,2 et les masses molaires moyennes en nombre sont proches des valeurs théoriques. Cependant, des analyses par RMN ¹H révèlent qu'une partie non négligeable des chaînes n'est pas fonctionnalisée. Cela est attribué à de l'amorçage thermique lors de la polymérisation du styrène à 125°C. Comme deux groupes terpyridine peuvent s'associer au même atome de ruthénium, les polymères α -fonctionnels obtenus peuvent facilement servir à la construction de copolymères à blocs AB par un lien supramoléculaire bis(terpyridine)-ruthénium (cf. Figure 34, p.56 pour un exemple d'une telle structure). Dans l'optique de créer des copolymères tri-blocs ABA suivant le même principe, une ω -fonctionnalisation basée sur un maléimide-terpyridine a également été réalisée afin d'obtenir des polymères α,ω -fonctionnels (cf. Figure 10, p.16 pour le principe de cette ω -fonctionnalisation).

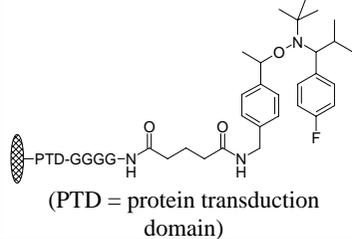
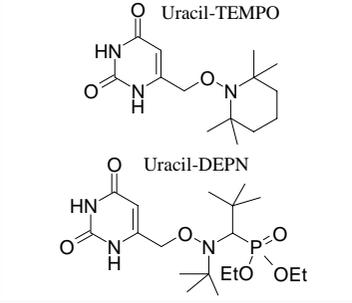
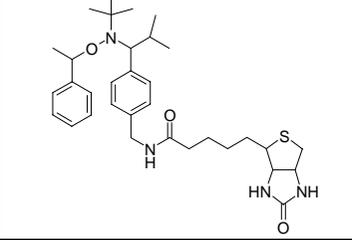
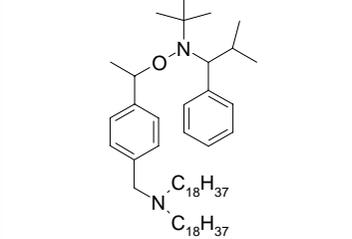
Bilan sur le procédé NMP

Dans tous ces exemples utilisant la technique NMP, l'amorceur fonctionnalisé (partie « alcoxy » de l'alcoxyamine) permet bien, en général, d'obtenir le conjugué souhaité. Cependant, il n'est jamais discuté de l'ampleur de l'effet « Fischer » au cours des polymérisations correspondantes. Celui-ci s'explique, succinctement, par la recombinaison d'une partie des fragments amorceurs au tout début de la polymérisation. Or, considérant la stratégie de fonctionnalisation du fragment amorceur, de tels événements de terminaison entraînent systématiquement une perte du composé d'intérêt. Malgré tout, une étude plus détaillée de « l'effet radical persistant »⁴⁹ semblerait indiquer que cette perte peut être considérée comme négligeable.

La fonctionnalisation de la partie « nitroxyde » de l'alcoxyamine peut permettre de résoudre ce problème éventuel. Selon cette stratégie alternative, le composé d'intérêt se retrouve lié à la chaîne polymère par l'intermédiaire de la liaison oxyamine. Néanmoins, selon l'application envisagée, on peut considérer cette liaison comme relativement stable étant donné qu'il est nécessaire d'atteindre une température relativement élevée pour la cliver.

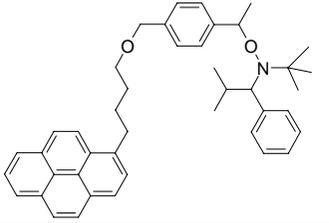
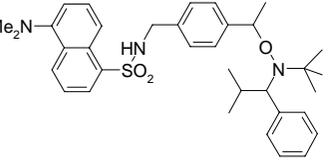
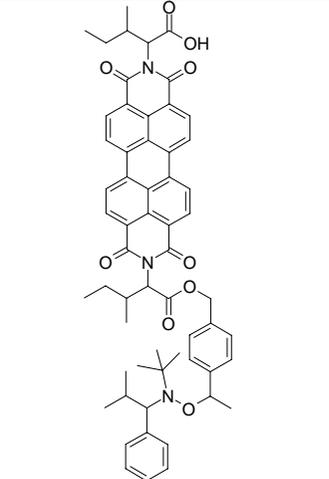
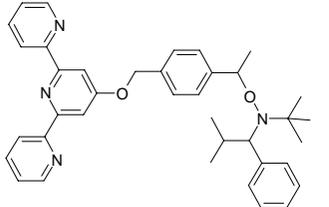
D'autre part, cette nécessité d'utiliser une température de polymérisation élevée (>100°C dans les exemples cités) peut éventuellement être un frein important à la synthèse de (bio)conjugués par le procédé NMP. En effet, il est essentiel de se poser la question de l'intégrité du composé d'intérêt après chauffage à une température élevée pendant une durée assez longue (quelques heures à quelques dizaines d'heures). Les polypeptides sont un exemple de ligands particulièrement sensibles à la température : ils peuvent être dénaturés (changement de conformation) sous l'effet de la température alors qu'une conformation précise est essentielle aux processus de reconnaissance moléculaire.

Tableau 2 : Amorceurs fonctionnels - Polymérisation de type NMP.

	Composé d'intérêt (C)	Amorceur (C-alcoxyamine)	Rendement de synthèse	Conjugué obtenu (C-Polymère _{DP})	Application potentielle	Référence, Remarque
1	Polypeptide	 <p>(PTD = protein transduction domain)</p>	non précisé	Polypeptide-PAA ₁₀₀ Polypeptide-PAA ₁₀₀ - <i>b</i> -PMA ₂₇₀	Transport trans-membranaire, Reconnaissance de récepteur cellulaire spécifique.	50 Amorceur supporté sur résine, clivage après polym. par traitement avec TFA, PtBA + TFA → PAA (Figure 19, p.28)
2	Base d'acide nucléique	 <p>Uracil-TEMPO</p> <p>Uracil-DEPN</p>	24% 71%	Uracil-PS ₉₅₀ Uracil-PnBA ₃₅₀	Matériaux à viscosité adaptée (possibilité multiples de liaisons hydrogène) Reconnaissance moléculaire.	51
3	Biotine		non précisé	Surface silicone-PDMA- nitroxyde biotinylé	Bio-détection : surface biotinylée limitant l'adsorption non-spécifique	52,53 Fonctionnalisation post-polymérisation via « nitroxide exchange »
4	Lipide		98% (avec un excès de lipide)	Lipide-PDMA ₁₁₀ Lipide-PGPP ₄₅	Lipo-glycopolymère : bio- membranes synthétiques	54

PAA : poly(acide acrylique); PMA: poly(acrylate de méthyle); PnBA : poly(acrylate de *n*-butyle) ; PtBA : poly(acrylate de *tert*-butyle); PDMA : poly(*N,N*-diméthyl acrylamide)
PGPP : poly(α -D-glucopyranose-2-propénoate) ; TFA : acide trifluoroacétique.

Tableau 2 (suite) : Amorceurs fonctionnels – Polymérisation de type NMP.

	Composé d'intérêt (C)	Amorceur (C-alcoxyamine)	Rendement de synthèse	Conjugué obtenu (C-Polymère _{DP})	Application potentielle	Référence, Remarque
5	Chromophore / Fluorophore		84%	Pyrène-PS ₆₇₀ Pyrène-PtBA ₇₀₀	Marquage/détection	55
6			79%	Dansyl-PS ₆₇₀ Dansyl-PtBA ₇₀₀		
7			non précisé	Pérylène-PS ₃₆₅ Pérylène-PS ₂₁₀ - <i>b</i> -PiP ₅₁₀ Pérylène-PnBA ₁₉₅ - <i>b</i> -PS ₁₂₅	Sonde fluorescente pour apprécier la dynamique moléculaire à l'échelle locale	56
8	Dérivé Pyridine (ligand de métaux)		61%	Terpyridine-PS ₅₃₀	Complexation avec du Ruthénium (Ru) → diverses applications	57

PiP: polyisoprène ; PS: polystyrène.

III-2. Amorceurs de polymérisation de type ATRP

La technique de polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome (en anglais, Atom Transfer Radical Polymerization ATRP; ou Metal-Catalyzed Living Radical Polymerization) est basée sur la réaction d'addition de type Kharasch, connue en chimie organique : ce type de réaction permet à un composé halogéné R-Ha d'ajouter un alcène $\text{CH}_2=\text{CR}_1(\text{R}_2)$ entre le carbone et l'halogène. Cette addition s'effectue suivant un processus radicalaire et est catalysée par un complexe métallique qui conduit à la formation d'un radical à partir du composé halogéné. Le résultat de l'addition est un autre composé halogéné de formule : $\text{R}-\text{CH}_2-\text{CR}_1(\text{R}_2)-\text{Ha}$. D'où l'application à la polymérisation en chaîne... et il ne reste plus qu'à adapter les conditions expérimentales pour réaliser une polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome^{2,4} (Schéma 4).

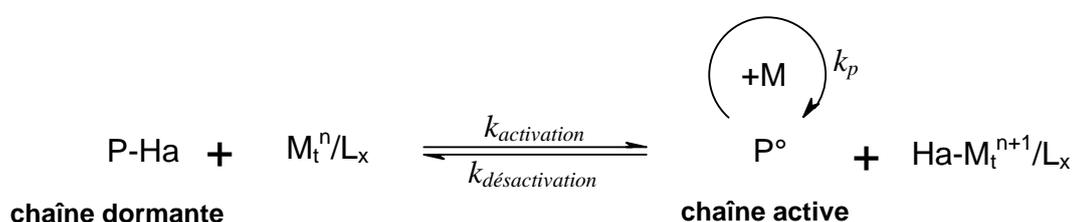


Schéma 4 : Principe de la polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome

Le complexe métallique est constitué d'un métal de transition ($\text{M}_t = \text{Cu}, \text{Ru}, \text{Fe}, \text{Ni}, \text{Rh}, \text{Cr}, \text{Mo}, \text{Re}$) et d'un ou plusieurs ligands L_x ; quant à l'halogène Ha, il s'agit le plus souvent du chlore, Cl ou du brome, Br.^{2,4} L'amorceur de polymérisation de type ATRP est le composé initial qui porte cet halogène (Schéma 5). Cependant, un amorceur classique de polymérisation radicalaire est parfois utilisé en parallèle en tant qu'accélérateur de la polymérisation.

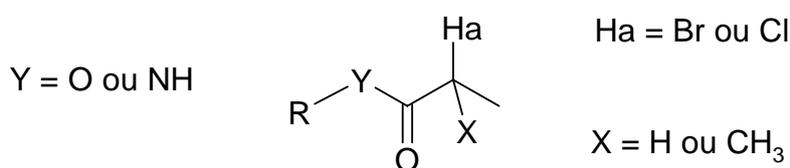


Schéma 5 : Structure générale des amorceurs de polymérisation de type ATRP fréquemment utilisés.

a. Amorceurs portant un ligand d'intérêt biologique

✓ Polypeptide :

Pour la synthèse d'un bio-conjugué polypeptide/polymère, la stratégie mise en œuvre pour la technique NMP (cf. p.28 et Figure 19 p.28) a été transposée à la technique ATRP⁵⁸ : toutes les synthèses sont supportées sur une résine « Wang » puis le conjugué est clivé par un traitement à l'acide trifluoroacétique (TFA) (cf. Figure 20). La conversion du peptide aminé en peptide-amorceur est réalisée par l'utilisation de 5 équivalents de bromure de 2-bromopropionyle. Des analyses par RMN ¹³C indiquent que près de 100% des peptides sont modifiés; Cependant après filtration sous vide, le rendement de synthèse « n'est que » de 92%. La polymérisation du méthacrylate de 2-hydroxyéthyle (HEMA) s'effectue à 50°C et conduit à un polymère de masse molaire moyenne en nombre de 4400 g/mol avec un indice

de polymolécularité de 1,47 déterminé par chromatographie d'exclusion stérique. Cette dernière valeur est un peu élevée pour une polymérisation censée être bien contrôlée mais elle se réfère à une calibration polystyrène. Il a été vérifié que, dans les conditions de clivage utilisées (TFA), aucune hydrolyse des motifs de la chaîne n'avait lieu.

Le polypeptide choisi ayant une affinité particulière pour certains récepteurs de membranes cellulaires, le bio-conjugué a conduit à des résultats positifs lors d'un test d'adhésion sur des cellules vivantes. La possibilité de présence de résidus des catalyseurs métalliques utilisés peut être un frein à l'utilisation des polymères synthétisés par ATRP dans le domaine bio-médical. Cependant, la croissance de lignées cellulaires en présence du conjugué indique une bonne élimination de ces catalyseurs (lavages préalables du polymère).

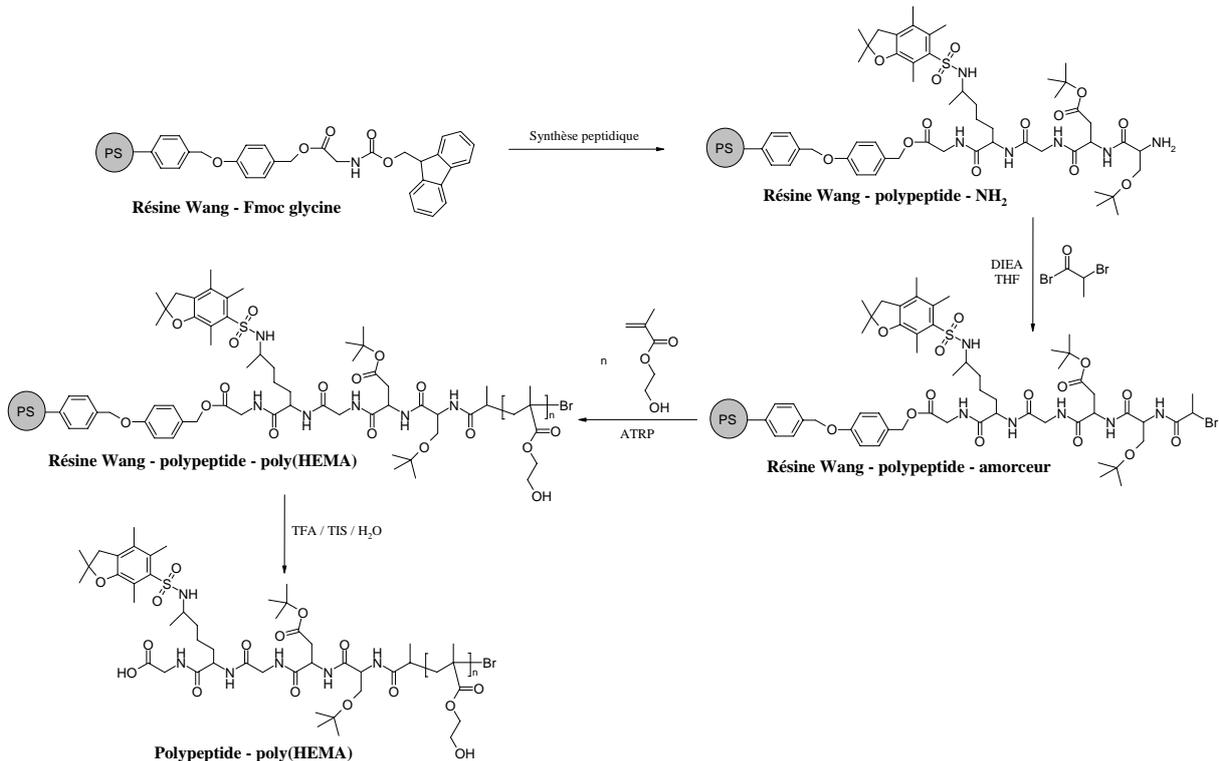


Figure 20 : Synthèse supportée de polypeptide puis polymérisation supportée de type ATRP.⁵⁸

Un autre conjugué polypeptide/polymère a été synthétisé par Rettig *et al.*⁵⁹ Le début de la stratégie de synthèse est quasiment identique, avec la conversion de l'extrémité aminée du polypeptide supporté en amorceur de type ATRP à l'aide de 20 équivalents d'acide 2-bromopropanoïque. Le taux de conversion est quantitatif et la présence du support permet une purification aisée. Contrairement à l'exemple précédent, l'amorceur peptidique (cf. Tableau 3, ligne 2) est détaché du support avant la polymérisation de l'acrylate de *n*-butyle. Celle-ci présente tous les critères d'un contrôle efficace (croissance linéaire des M_n , $I_p < 1,2$). Cependant, une interaction néfaste entre le polypeptide (polyamide) et le catalyseur métallique a clairement été mise en évidence dans des polymérisations modèles. Cela peut être un facteur limitant l'utilisation de la technique ATRP pour la synthèse de conjugués polypeptide/polymère bien définis.

✓ *Ribo-nucléoside* :

Des structures qui apportent aussi des capacités de reconnaissance aux conjugués sont les ribonucléosides. La réaction de ribonucléosides tels que l'uridine ou l'adénosine avec 3 équivalents de bromure de bromoisobutyroyle conduit à des amorceurs de type ATRP avec des rendements assez modestes (53% et 28% respectivement)⁶⁰. Les formes protégées ont également été synthétisées (cf. Tableau 3, ligne 7). Ces quatre amorceurs fonctionnalisés ont été utilisés lors de la polymérisation du méthacrylate de méthyle à 90°C ou du styrène à 120°C. La polymérisation est contrôlée : I_p inférieur à 1,25 et croissance linéaire des masses molaires avec la conversion. Cependant, les valeurs de M_n (3000 à 22000 g/mol) sont supérieures aux valeurs théoriques. Cela est le signe d'une efficacité d'amorçage réduite : au maximum de 0,83 et 0,46 selon les différents essais réalisés ! Une perte, parfois importante, du composé d'intérêt est donc à craindre, tout comme dans le cas des amorceurs fonctionnels de polymérisation radicalaire conventionnelle (facteur d'efficacité parfois faible, cf. p.23).

✓ *Biotine* :

L'équipe de K. Wooley a conçu des nanoparticules cœur-écorce présentant des ligands biotine en surface.^{61,62} La synthèse de telles structures repose sur l'utilisation d'un amorceur de polymérisation ATRP biotinylé, obtenu en deux étapes dont une réaction d'estérification présentant un rendement de 43% (cf. Figure 21). Il sert à la polymérisation contrôlée de l'acrylate de *tert*-butyle à 55°C puis de l'acrylate de méthyle à 50°C. Les masses molaires de l'homopolymère puis du copolymère à blocs sont déterminées par chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur de diffusion de la lumière et par RMN ¹H. Les différences entre les valeurs données par les deux techniques sembleraient indiquer que seuls 80 % des chaînes portent une biotine à leur extrémité α . De plus, la comparaison entre la masse molaire théorique de l'homopolymère et celle déterminée par RMN semble dévoiler une efficacité d'amorçage de l'ordre de 0,8.

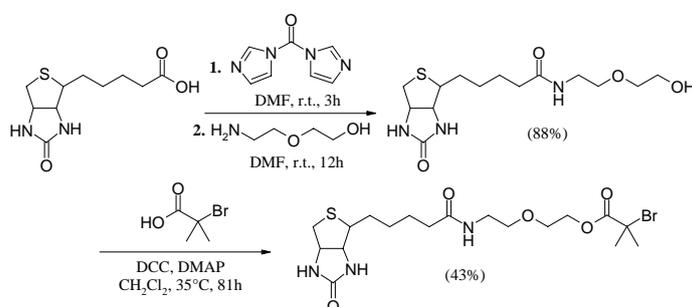


Figure 21 : Synthèse d'un amorceur-biotine de polymérisation de type ATRP.⁶¹

Quoi qu'il en soit, le copolymère à blocs poly(tBA-*b*-MA) ($M_n = 20100$ g/mol, $I_p = 1,01$) est hydrolysé par traitement à l'acide trifluoroacétique pour transformer le premier bloc en un bloc hydrophile de poly(acide acrylique) (PAA). Il a bien sûr été vérifié que la liaison ester, grâce à laquelle est fixée la biotine, est stable dans les conditions de pH utilisées. Après micellisation du copolymère amphiphile en mélange avec du copolymère non biotinylé, l'écorce de PAA est réticulée à l'aide d'une diamine afin d'obtenir des nanoparticules stables en milieu aqueux.

Des nanoparticules similaires présentant des antigènes (2,4-dinitrophenyle) en surface ont également été synthétisées selon la même stratégie de synthèse⁶³ (cf. Tableau 3, ligne 6). Ces particules sont potentiellement de très bons vecteurs d'antigènes pour la fabrication de vaccins.

Pour revenir à la biotine, le même amorceur biotinylé a été utilisé par Bontempo *et al.* pour contrôler la polymérisation du méthacrylate de 2-hydroxyéthyle à température ambiante. D'autres amorceurs également biotinylé ont servi à la polymérisation, toujours à température ambiante, du *N*-isopropylacrylamide et de l'acrylate de méthyle⁶⁴ (cf. Tableau 3, ligne 4). La disponibilité des ligands biotine présents en bout de chaîne des polymères ($M_n \sim 11000-16000$ g/mol, $I_p < 1,24$) a été vérifiée par interaction avec de la streptavidine puis analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Une étude plus approfondie a été réalisée dans le cas du *N*-isopropylacrylamide⁶⁵ : l'évolution des masses molaires avec la conversion a été suivie par chromatographie d'exclusion stérique (CES) et par RMN ¹H. Les valeurs obtenues par CES montrent bien une progression linéaire mais sont significativement supérieures aux valeurs théoriques. Cependant, les valeurs provenant des analyses par RMN sont au contraire très proches des valeurs théoriques. Les auteurs concluent alors à une très bonne efficacité d'amorçage (~ 1) et rappellent que les mesures de CES dépendent d'une calibration relative à des étalons de poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA).

Toujours avec un amorceur de type ATRP biotinylé (cf. Tableau 3, ligne 5), un poly(méthacrylate de PEG) a été synthétisé par Ladmiral *et al.* en vue d'une immobilisation par reconnaissance spécifique sur un film d'avidine. Cette immobilisation est suivie à l'aide d'une microbalance à cristal de quartz (QCM).⁶⁶ Les auteurs précisent bien, qu'en utilisant une calibration relative à des étalons PMMA, les valeurs de masses molaires déterminées par CES sont incorrectes... mais donnent une valeur d'indice de polymolécularité (1,13) sans émettre aucune réserve sur sa validité.* La valeur de M_n déterminée par RMN (7200 g/mol) permet d'estimer l'efficacité d'amorçage à 0,85.

✓ Protéines :

Après les nombreux travaux décrivant la synthèse par ATRP de polymères α -fonctionnels ayant une réactivité adaptée au couplage avec des protéines³⁴⁻³⁹ (cf. § I-4.b, p.16 à 18), D. Bontempo et H. D. Maynard ont validé la stratégie de synthèse qui consiste à utiliser un amorceur-protéine en synthétisant, comme composé modèle, un macroamorceur-streptavidine⁶⁷. Pour ce faire, un excès d'amorceur-biotine précédemment synthétisé^{61,64} est mis en présence de streptavidine pendant 1h à température ambiante (cf. Tableau 3, ligne 8). La protéine modifiée est ensuite purifiée par dialyse puis lyophilisée. Des polymérisations du *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) ou du méthacrylate de PEG ont été effectuées en présence du macroamorceur-streptavidine et d'un amorceur sacrificiel fixé sur un support. Ce dernier permet de réaliser les essais de polymérisation sur une quantité de monomère classique tout en utilisant une faible quantité d'amorceur bio-fonctionnel onéreux. Grâce au support, l'élimination des chaînes non fonctionnalisées est aisée. Des essais contrôle ainsi que des analyses par CES et par électrophorèse sur gel étayent une croissance des chaînes polymère uniquement à partir des sites d'amorçage introduit sur la protéine. Cependant, après dissociation (par traitement thermique) de ces chaînes de la streptavidine, les analyses par CES montrent une distribution relativement large des masses molaires ($I_p = 1,7$; calibration PMMA) ce qui signale une perte de contrôle des polymérisations.

Ce principe a été étendu à d'autres protéines, en se basant cette fois-ci sur la présence de fonctions thiol portées par les acides aminés cystéine de la BSA (« bovine serum albumin ») et d'un lysozyme génétiquement modifié.⁶⁸ La synthèse des amorceurs ATRP

* Dans l'éventualité où les colonnes du système chromatographique utilisé sépareraient moins bien le poly(méthacrylate de PEG) que le PMMA, il serait possible que la calibration PMMA conduise à des valeurs d' I_p faibles non représentatives de la réalité des échantillons. Une discussion sur la validité des indices de polymolécularité lorsqu'une calibration relative est employée est malheureusement absente dans beaucoup de publications !

correspondants a été effectuée à l'aide d'un amorceur portant soit une fonction disulfure de pyridyle, soit une fonction maléimide (cf. Figure 22 et Figure 23). Après polymérisation du NIPAAm en présence d'amorceur sacrificiel, les analyses par CES des échantillons bruts indiquent la présence de protéines non modifiées ; Le taux de formation de bio-conjugués est estimé à 65% pour l'amorceur-BSA, 75% et 65% respectivement pour les deux amorceur-lysozymes. Cela est bien sûr le signe d'une efficacité d'amorçage réduite, et implique des étapes de purification supplémentaires. La possibilité de clivage des liaisons disulfure a été exploitée pour caractériser le polymère poly(NIPAAm) formé à partir de la protéine BSA. : $M_n = 11300$ g/mol et $I_p = 1,34$ relatif à une calibration PMMA. Enfin, la rétention de l'activité enzymatique du lysozyme après polymérisation a été vérifiée.

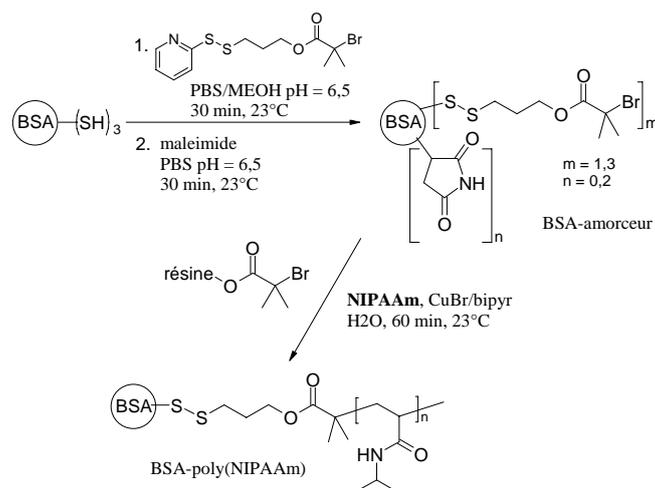


Figure 22 : Synthèse d'un amorceur-protéine (BSA) puis polymérisation de type ATRP du *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm).⁶⁸

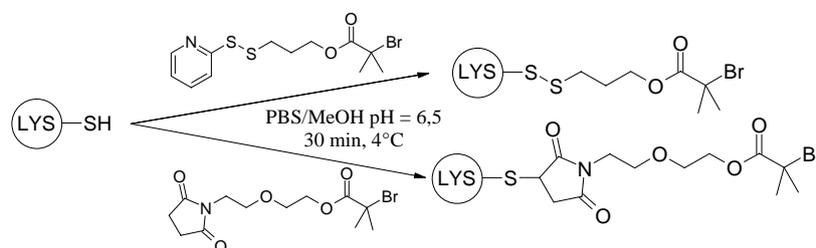


Figure 23 : Synthèse d'amorceur-protéine (lysozyme) pour polymérisation de type ATRP.⁶⁸

✓ Sucres :

Une autre famille de composés qui jouent des rôles biologiques important est celle des sucres et dérivés, plus généralement nommés carbohydrates. Ainsi, plusieurs travaux concernent l'introduction de sucres en extrémité de chaînes polymères *via* la technique ATRP. Par exemple, des dérivés du glucose ou du galactose sous leur forme protégée sont transformés en amorceur de polymérisation par réaction d'estérification (Figure 24) : les rendements de synthèse sont respectivement 78 et 67%.⁶⁹ La polymérisation d'un méthacrylate de PEG puis du méthacrylate de benzyle (en une ou deux étapes) conduit à des copolymères à blocs amphiphiles de longueurs variables (2500-9600 g/mol pour le premier bloc, 1400-2300 g/mol pour le second) présentant des distributions de masses molaires étroites ($I_p < 1,2$). Il est à noter que l'utilisation des sucres sous leur forme protégée pendant la polymérisation de type ATRP est nécessaire sous peine de se confronter à des problèmes de complexation et/ou coordination compétitive du métal (cuivre) par les fonctions hydroxyle

libres ce qui réduit considérablement les vitesses de polymérisation. Après déprotection, les micelles formées en milieu aqueux présentent les sucres à leur périphérie. Dans le cas du dérivé de galactose, ces micelles conduisent à des résultats positifs lors d'un test de reconnaissance de lectines appropriées.

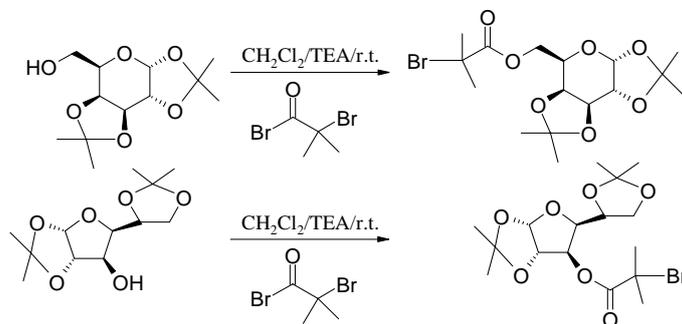


Figure 24 : Synthèse d'amorceurs de type ATRP à partir de dérivés protégés de glucose et de galactose.⁶⁹

Une méthode originale pour synthétiser un amorceur « sucré » est de partir d'un composé facilement disponible et relativement peu onéreux, la β -cyclodextrine.⁷⁰ Cependant, la synthèse de l'amorceur-oligosaccharide correspondant nécessite quatre étapes et n'offre un rendement global que de 20-25% (Figure 25). La polymérisation de type ATRP du méthacrylate de méthyle à l'aide de cet amorceur présente toutes les caractéristiques d'une polymérisation contrôlée ainsi qu'une efficacité d'amorçage proche de l'unité. La polymérisation d'un méthacrylate de PEG, du méthacrylate de diméthylaminoéthyle et d'un monomère dérivé du glucose ont également été réalisées. Cependant, dans ces cas, les caractérisations moins complètes des échantillons obtenus ne peuvent indiquer avec certitude un bon contrôle de la polymérisation.

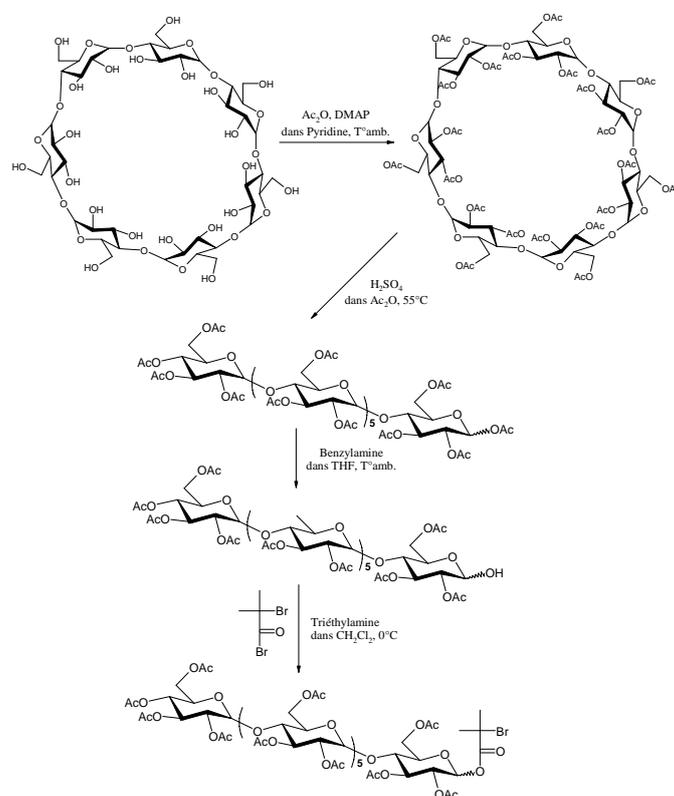


Figure 25 : Synthèse d'un amorceur de type ATRP à partir de la β -cyclodextrine.⁷⁰

✓ *Lipides :*

Une autre famille de composés commerciaux facilement disponibles est celle des « Span » : il s'agit de sorbitol (dérivé carbohydrate) modifié par divers lipides. Ainsi, le sorbitan tristéarate (Span 65) ou le sorbitan trioléate (Span 85) ont été utilisés par Bon *et al.*^{71,72} comme base pour la synthèse d'amorceurs (cf. Tableau 3, ligne 12). Ces amorceurs lipidiques ont été utilisés pour la polymérisation ATRP du méthacrylate de diméthylaminoéthyle et du méthacrylate de méthyle.

Certains projets de conception de bio-capteurs nécessitent la fixation de bi-couches lipidiques sur des surfaces. Pour une fixation efficace, de nouvelles surfaces adaptées doivent être imaginées. Dans cette optique, des lipo-poly(acrylamide) ont été synthétisés en utilisant divers amorceurs lipidiques⁷³ (cf. Tableau 3, ligne 13). Leur synthèse par réaction d'amidation offre des rendements de 42 à 57%. Les auteurs rappellent que la polymérisation de type ATRP de l'acrylamide n'est pas parfaitement contrôlée, mais cela n'est pas vérifié dans l'étude proposée puisque les échantillons ne sont caractérisés que par RMN ¹H pour estimer les degrés moyens de polymérisation. De plus, aucune comparaison avec les valeurs théoriques n'est mentionnée. D'autre part, l'élimination des sels métalliques après polymérisation a posé quelques soucis : la méthode la plus efficace semble être la dialyse (échantillons dialysés 6 fois), mais c'est également la méthode la plus longue parmi toutes celles testées.

Enfin, un lipide particulier, appartenant à la famille des stéroïdes, a également été converti en amorceur de polymérisation de type ATRP : il s'agit du cholestérol.⁷⁴ Sa fonction alcool sert à la réaction avec du bromure de 2-bromoisobutyryle pour former l'amorceur correspondant (cf. Tableau 3, ligne 14). La polymérisation du méthacrylate de méthyle à 90°C conduit bien à un polymère contrôlé ($I_p = 1,13$) avec une masse molaire moyenne en nombre (3300 g/mol) proche de la valeur théorique.

b. Amorceurs portant un fluorophore

Les fluorophores constituent une famille de marqueurs très utilisés dans le domaine bio-médical. L'incorporation sur chaque chaîne d'un groupe fluorescent permet au polymère d'être aisément détectable par les techniques analytiques de fluorescence, telle que la microscopie confocale par exemple, et augmente ainsi sa traçabilité dans les dispositifs biologiques. C'est dans cet objectif qu'a été utilisé un amorceur ATRP basé sur le fluorophore Hostasol⁷⁵ (cf. Tableau 3, ligne 15). Par polymérisation du *N*-méthacryloxysuccinimide à 50°C en présence de cet amorceur, un polymère précurseur portant des fonctions latérales réactives est obtenu. Le couplage avec un dérivé aminé du composé stéroïdien, l'acide cholique, puis avec le 1-amino-propan-2-ol conduit à un polymère bio-compatible dérivé du poly(méthacrylamide) (cf. Figure 26).

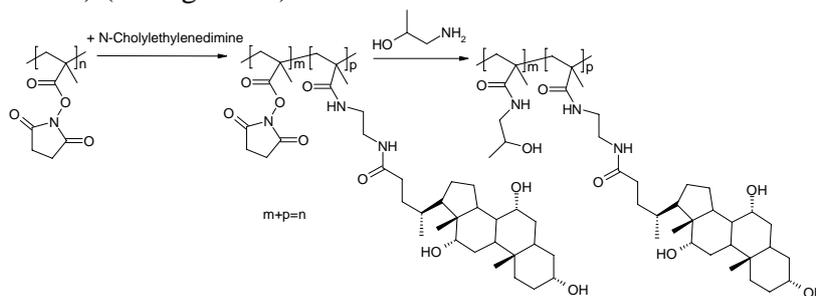


Figure 26 : Conversion du poly(*N*-méthacryloxysuccinimide) en poly(méthacrylamide) bio-compatible.⁷⁵

Le poly(*N*-isopropylacrylamide) est largement étudié en raison de son caractère thermosensible. Miura *et al.*⁷⁶ ont montré que le marquage par un groupe pyrène des extrémités de chaînes de poly(NIPAAm) de longueur contrôlée induit une modification significative de la température limite de solubilité (LCST). Ces chaînes ont été synthétisées par polymérisation de type ATRP à 20°C à partir d'un amorceur pyrène chloré (cf. Tableau 3, ligne 16). Les caractérisations des extrémités de chaîne par RMN ¹H, RMN ¹³C et spectrométrie de masse MALDI-ToF confirment l'introduction du groupe pyrényle en extrémité de chaîne de manière quantitative.

c. Autres amorceurs fonctionnels

Des copolymères poly(acide acrylique-*b*-styrène) présentant un groupe CF₃ en extrémité de chaîne ont été synthétisés *via* la technique ATRP à l'aide de l'amorceur adéquat⁷⁷ (cf. Tableau 3, ligne 17). Ce groupe fluoré est une sonde appropriée pour l'analyse de polymères par la technique de RMN à l'angle magique à l'état solide appelée REDOR-RMN (Rotational-echo double resonance-RMN). Cette technique permet de déterminer des distances internucléaires à partir de l'analyse des paires de spins des hétéroatomes. Elle a été utilisée par l'équipe de K. Wooley pour réaliser une étude fondamentale sur la structure interne de particules cœur-écorce fonctionnalisées (cf. p.36)

Une application plus connue du fluor réside dans la conception de matériaux à faible énergie de surface. Dans ce cadre, de nouveaux polymères perfluorés ayant des propriétés de mouillabilité ajustées ont été synthétisés. Ainsi, après avoir confirmé l'inactivité du fluor dans le processus d'échange d'halogène du procédé ATRP, Boutevin *et al.*⁷⁸ ont synthétisé des chaînes de poly(méthacrylate de méthyle) de longueur contrôlée ($I_p < 1,3$) portant un oligomère perfluoré en extrémité α . Pour ce faire, des amorceurs perfluorés adéquats (cf. Tableau 3, ligne 18) ont été utilisés (rapports [monomère]/[amorceur] différents : 40,60,100). Les évolutions des masses molaires suivent, plus ou moins bien suivant les cas, les droites théoriques. (Il est dommage que dans cette étude, l'ordonnée à l'origine soit indiquée comme nulle, alors que la masse molaire des amorceurs n'est pas négligeable en comparaison à la gamme de masses molaires visées. Par conséquent, les écarts à la droite théorique sont légèrement réduits ou au contraire légèrement accrus selon les cas).

Par ailleurs, Zhou *et al.*⁷⁹ ont utilisé une structure assez originale comme base d'amorceur ATRP : il s'agit du fullerène C₆₀. Sa mono-fonctionnalisation par un composé bromé adéquat (cf. Tableau 3, ligne 19) permet la synthèse de conjugués bien définis. Cependant, la polymérisation du styrène à 110°C doit être limitée à de faibles conversions (<10%) pour garder toutes les caractéristiques d'une polymérisation contrôlée. Au-delà, la probabilité de transfert sur les doubles liaisons du fullerène n'est plus négligeable et cela conduit à des structures portant plusieurs chaînes polymères. Des agrégats de conjugués fullerène/polymère peuvent être une base très intéressante pour la conception de matériaux ayant des propriétés optiques et/ou électriques particulières.

Bilan sur le procédé ATRP

La technique ATRP a été utilisée pour la synthèse de conjugués de nature très variée (3/4 d'entre eux étant toutefois des bio-conjugués). Les valeurs des rendements de synthèse des amorceurs fonctionnels sont très hétérogènes : certaines synthèses relativement simples présentent des rendements supérieurs à 80% alors que d'autres plus complexes présentent des rendements modestes (voire parfois faibles).

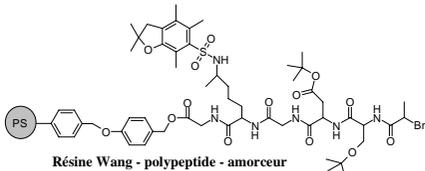
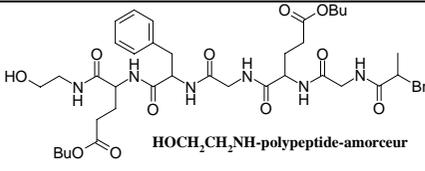
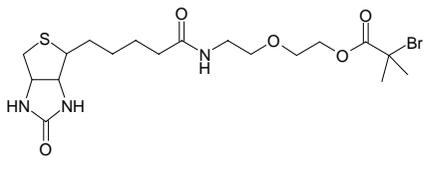
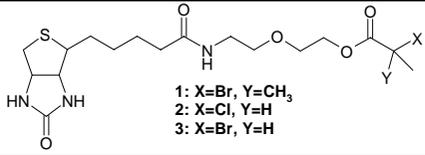
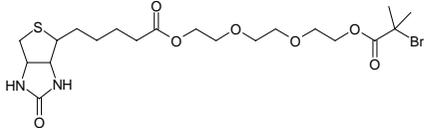
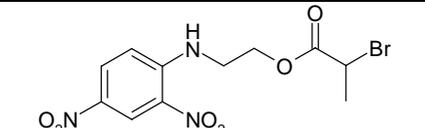
Un autre paramètre d'importance qui valide la stratégie de synthèse de (bio-)conjugués à partir d'amorceurs fonctionnels (souvent relativement onéreux) est la valeur de leur efficacité d'amorçage ; elle est souvent supérieure à 0,8 ce qui limite effectivement la perte du composé d'intérêt.

Enfin, pour les conjugués à applications bio-médicales, la technique ATRP présente l'inconvénient de nécessiter des étapes de purification extrême afin d'éliminer le catalyseur métallique.

Remarque : les améliorations récentes de la technique ATRP (procédés AGET (activators generated by electron transfer)⁸⁰, ARGET (activators re-generated by electron transfer)⁸¹, et ICAR (initiators for continuous activator regeneration)) permettent de réduire considérablement la quantité de catalyseur métallique utilisée durant la polymérisation mais, à notre connaissance, ces nouvelles techniques n'ont pas encore été utilisées avec des amorceurs fonctionnels.

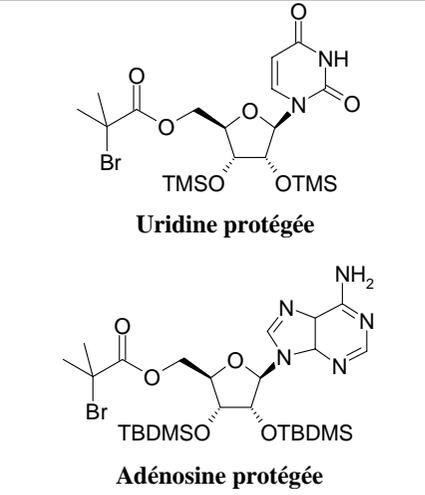
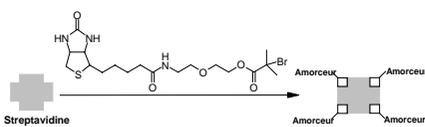
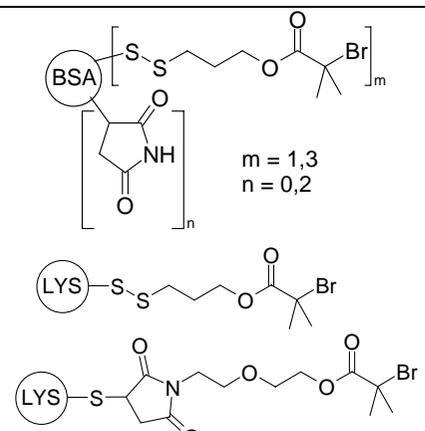
Tableau récapitulatif des amorceurs fonctionnels pour la polymérisation de type ATRP : pages suivantes.

Tableau 3 : Amorceurs fonctionnels – Polymérisation de type ATRP

	Composé d'intérêt (C)	Amorceur	Rendement de synthèse	Conjugué obtenu (C-Polymère _{DP})	Application potentielle	Référence, Remarque
1	Polypeptide	 Résine Wang - polypeptide - amorceur	92%	Polypeptide-PHEMA ₃₄	Reconnaissance de récepteur cellulaire spécifique. Adhésion cellulaire d'implants médicaux	58 Amorceur supporté sur résine, clivage après polymérisation par traitement avec TFA (Figure 20, p.35)
2		 HOCH ₂ CH ₂ NH-polypeptide-amorceur	~100%	Polypeptide-PnBA ₈₆	Reconnaissance cellulaire.	59
3	Biotine	 Biotine-PAA ₁₁₀	43%	Biotine-PAA ₁₁₀ Biotine-PAA ₁₁₀ - <i>b</i> -PMA ₆₆	Particules biotinylées : système modèle des processus de reconnaissance protéine-cellule	61,62 PAA ← PtBA + TFA (Figure 21, p.36)
4		 1: X=Br, Y=CH ₃ 2: X=Cl, Y=H 3: X=Br, Y=H	1 : non précisé 2 : 72% 3 : non précisé	1: Biotine-PHEMA ₁₁₅ 2: Biotine-PNIPAAm ₂₆₅ 3: Biotine-PMA ₁₃₀	Bio-détection	64,65
5		 Biotin-PMAPEG ₂₄	non précisé	Biotin-PMAPEG ₂₄	Reconnaissance spécifique sur un « film Avidine »	66
6	Antigène	 2,4-Dinitrophenyl-PAA	28%	2,4-Dinitrophenyl-PAA 2,4-Dinitrophenyl -PAA- <i>b</i> -PMA	Vaccin antigénique	63 PAA ← PtBA + TFA

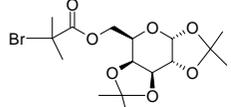
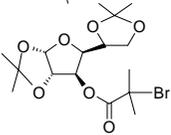
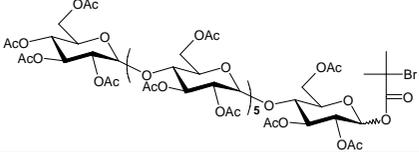
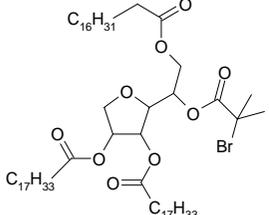
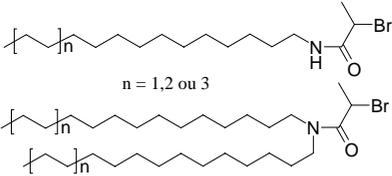
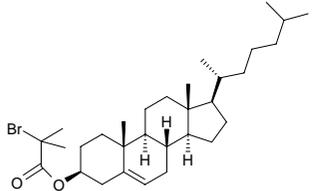
PAA : poly(acide acrylique) ; PHEMA: poly(méthacrylate de 2-hydroxyéthyle) ; PMA : poly(acrylate de méthyle) ; PMAPEG : poly(méthacrylate de poly(éthylène glycol)) ; PnBA : poly(acrylate de *n*-butyle) ; PNIPAAm : poly(*N*-isopropylacrylamide) ; TFA : acide trifluoroacétique.

Tableau 3 (suite): Amorceurs fonctionnels - Polymérisation de type ATRP

	Composé d'intérêt (C)	Amorceur	Rendement de synthèse	Conjugué obtenu (C-Polymère _{DP})	Application potentielle	Référence, Remarque
7	Ribo-nucléoside	 <p>Uridine protégée</p> <p>Adénosine protégée</p>	<p>53% (rendement protection 93%)</p> <p>28% (rendement protection 82%)</p>	<p>Uridine-PMMA₂₂₅ Uridine protégée-PMMA₁₃₀ Uridine protégée-PS₁₆₀</p> <p>Adenosine-PMMA₁₇₀ Adenosine protégée-PMMA₁₃₀</p>	Bio-détection	60
8			non précisé	Streptavidine-(PNIPAAm ₂₄₀) ₄	Conjugué polymère-protéine : bio-technologie	67 Ip = 1,7 !
9	Protéine	 <p>m = 1,3 n = 0,2</p>	non précisé	<p>BSA-PNIPAAm₁₀₀ BSA-PNIPAAm₅₁₀ (Ip~1,5)</p> <p>Lysozyme-PNIPAAm</p>	Conjugué polymère-protéine : bio-technologie	68 <i>(Figure 22 et Figure 23, p.38)</i>

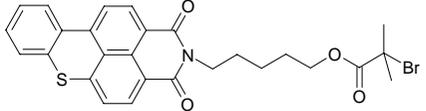
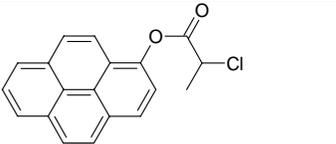
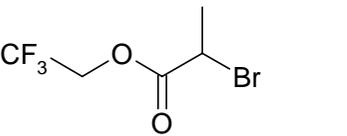
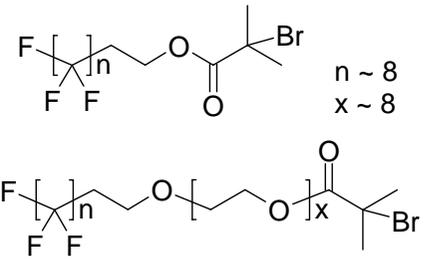
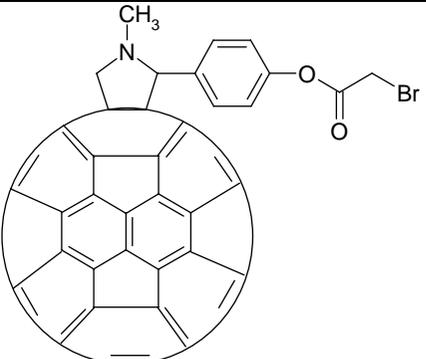
PMMA : poly(méthacrylate de méthyle) ; PS: polystyrène.

Tableau 3 (suite): Amorceurs fonctionnels - Polymérisation de type ATRP

	Composé d'intérêt (C)	Amorceur	Rendement de synthèse	Conjugué obtenu (C-Polymère _{DP})	Application potentielle	Référence, Remarque
10	Sucre		78%	Glucose- PMAPEG_{18} - b - PBzMA_8 Glucose- PMAPEG_5 - b - PBzMA_{13}	Micelles présentant des sucres à leur périphérie : délivrance ciblée de principes actifs.	69 <i>(Figure 24, p.39)</i>
			67%	Galactose- PMAPEG_{19} - b - PBzMA_8 Galactose- PMAPEG_7 - b - PBzMA_{16}		
11			25%	Olisosaccharide- PMMA_{101} Olisosaccharide- PDMAEMA Olisosaccharide- PMAPEG Olisosaccharide- PMSucre	Reconnaissance biomoléculaire de lectines.	70 <i>(Figure 25, p.39)</i>
12	Lipide		non précisé	Lipide- PDMAEMA Lipide- PMMA	Bio-mimétisme	71,72
13			42 à 57%	Lipide- PAAm_{50} Lipide- PAAm_{100}	Surfaces compatibles avec des bi-couches lipidiques : conception de bio-capteurs	73
14	Cholestérol		80%	Cholestérol- PMMA_{33}	Bio-mimétisme	74

PAAm : poly(acrylamide) ; PBzMA : poly(méthacrylate de benzyle) ; PDMAEMA : poly(méthacrylate de diméthyl aminoéthyle) ; PMAPEG : poly(méthacrylate de poly(éthylène glycol)) ; PMMA : poly(méthacrylate de méthyle) ; PMSucre : polymère d'un monomère dérivé d'un sucre.

Tableau 3 (suite): Amorceurs fonctionnels - Polymérisation de type ATRP

	Composé d'intérêt (C)	Amorceur	Rendement de synthèse	Conjugué obtenu (C-Polymère _{DP})	Application potentielle	Référence, Remarque
15	Fluorophore		89%	Hostasol-PMANS ₄₄	Traçabilité dans les dispositifs biologiques	75 (Figure 26, p.40)
16			87%	Pyrene-PNIPAAm		76
17	Marqueur ¹⁹ F		non précisé	CF ₃ -PAA- <i>b</i> -PS	Marquage pour analyse par REDOR-NMR	77 PAA ← PtBA + TFA
18	Chaînon perfluoré		non précisé	Groupe fluoré-PMMA ₈₀	Matériaux à faible énergie de surface	78
19	Fullerène C ₆₀		70%	C ₆₀ -PS ₁₇₀	Matériaux à nouvelles propriétés optiques et/ou électriques	79

PAA : poly(acide acrylique) ; PMANS : poly(méthacrylate de *N*-oxysuccinimide) ; PNIPAAm : poly(*N*-isopropylacrylamide) ; PtBA : poly(acrylate de *tert*-butyle) ; PS : polystyrene ; REDOR-NMR = Rotational-Echo Double Resonance-Nuclear Magnetic Resonance.

III-3. Agents de contrôle de polymérisation de type RAFT

La polymérisation de type RAFT (Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer) repose sur les capacités de transfert réversible des composés thio-carbonylthio de formule générale R-S-C(=S)-Z : l'addition d'une espèce radicalaire sur un tel composé conduit au transfert du radical sur le groupe R (Schéma 6). Ce nouveau radical peut à nouveau s'ajouter sur le groupe thio-carbonylthio, ce qui rend le processus de transfert réversible.

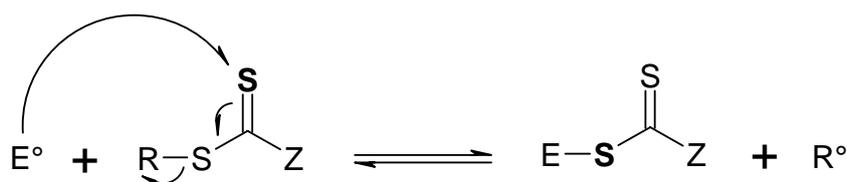


Schéma 6 : Réaction de transfert réversible avec un composé thio-carbonylthio.

Ainsi, l'introduction d'un composé thio-carbonylthio, appelé agent de contrôle ou plus précisément agent de transfert de chaîne (ATC), dans une polymérisation radicalaire permet la mise en place d'un équilibre entre chaînes dormantes et chaînes actives (Schéma 7)* :

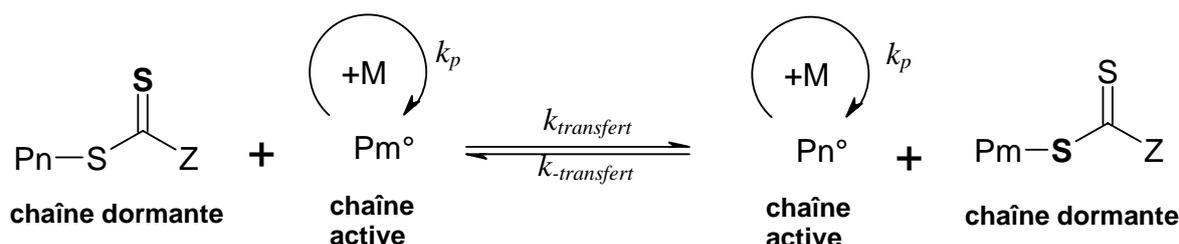


Schéma 7 : Equilibre entre chaînes actives et chaînes dormantes dans une polymérisation de type RAFT.

Cet équilibre est en compétition avec les réactions de propagation et de terminaison. Ainsi, pour un contrôle efficace de la polymérisation, la concentration en radicaux propageant P° doit être bien inférieure à la concentration en espèces dormantes. Pour cette raison, la quantité d'amorceur utilisée en polymérisation RAFT est généralement moins importante que celle classiquement utilisée en polymérisation radicalaire conventionnelle. De manière générale, le rapport initial $[ATC]_0/[amorceur]_0$ doit être suffisamment élevé pour permettre un bon contrôle de la polymérisation... mais un rapport trop élevé peut conduire à une cinétique de polymérisation très lente, néfaste au contrôle^{82,**}. Le choix du rapport $[ATC]_0/[amorceur]_0$ est souvent un compromis entre contrôle de la polymérisation et cinétique et il n'y a pas de rapport optimum « universel », car ce dernier dépend du trio ATC/monomère/amorceur.

Pour un monomère donné, l'agent de transfert de chaîne est généralement choisi de telle sorte que le fragment radical R° soit un bon groupe partant (déplacement de l'équilibre du Schéma 6 vers la droite) et soit également un bon ré-amorceur de nouvelles chaînes. Ainsi, plus le rapport $[ATC]_0/[amorceur]_0$ est élevé, plus la proportion de chaînes amorcées par ce fragment est grande. Dans une stratégie d' α -fonctionnalisation *via* l'ATC, il est donc

* cf. chapitre 2, schéma 1, p.67 pour le mécanisme complet du procédé RAFT.

** notamment lorsque un rapport $[ATC]_0/[amorceur]_0$ trop élevé induit une longue période d'induction (stagnation de la conversion à quelques % en début de polymérisation)

intéressant d'utiliser un rapport $[ATC]_0/[amorceur]_0$ le plus élevé possible, de telle sorte que le maximum de chaînes portent le composé d'intérêt à leur extrémité α .^{**}

Les agents de transfert de chaîne utilisés en polymérisation de type RAFT peuvent être classés en grandes familles selon la nature du groupe Z :

- les dithioesters $Z = -R'$ (très souvent benzyle ou phényle)
- les dithiocarbonates (ou xanthates) $Z = -OR'$
- les trithiocarbonates $Z = -SR'$
- les dithiocarbamates $Z = -N(R')R''$

a. Agents de transfert de chaîne portant un ligand d'intérêt biologique

✓ *Polypeptide :*

Après l'utilisation de la technique ATRP pour la formation de bio-conjugués polypeptide/polymère⁵⁹ (cf. p.35), l'équipe de Hans G. Börner s'est aussi intéressée à la polymérisation de type RAFT. Les polypeptides synthétisés sur support ont été ré-exploités. Dans un premier temps, un essai de conversion du polypeptide aminé en agent RAFT à l'aide d'un dithioester portant une fonction acide carboxylique a été effectuée⁸³ (cf. 1^{ère} ligne de la Figure 27) : en raison de la fragilité connue des dithioesters vis à vis des amines primaires (et secondaires),⁸⁴ un sous-produit issu d'une réaction de thioamidation s'est également formé. Malgré plusieurs tentatives d'optimisation, cette réaction secondaire n'a pu être évitée et le produit final contient 24% de sous-produit (polypeptide-thioamide). Considérant que ce sous-produit est inerte vis-à-vis du mécanisme RAFT, la polymérisation de l'acrylate de *n*-butyle a été réalisée dans les conditions suivantes : 60°C pendant 35 heures, $[ATC]/[AIBN] = 20$, masse visée à 100% de conversion = 134000 g/mol. Malgré environ 4 heures de période d'induction (conversion de quelques %), 48% de conversion sont atteints en fin de réaction ; la masse molaire moyenne en nombre est très proche de la masse théorique, avec un indice de polymolécularité d'environ 1,2.

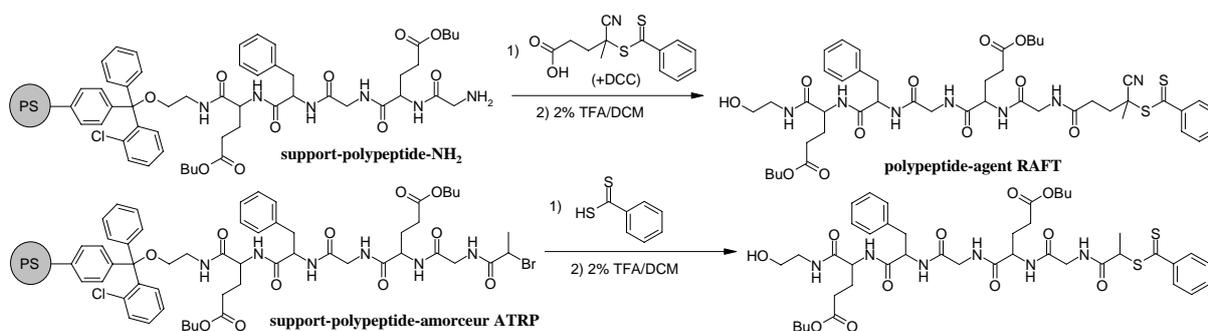


Figure 27 : Deux voies de synthèse de polypeptide-agent RAFT (en haut : dithioester « tertiaire » ; en bas : dithioester « secondaire »).⁸³

Afin d'éviter la formation de sous-produits, une autre voie de synthèse a été mise en place : elle consiste à convertir l'amorceur ATRP-polypeptide précédemment synthétisé⁵⁹ en agent RAFT à l'aide, entre autres, de l'acide dithiobenzoïque (cf. 2^{ème} ligne de la Figure 27). Une période d'induction de 8 heures est observée pour la polymérisation de l'acrylate de *n*-butyle avec un rapport $[ATC]/[AIBN]$ égal à 5 et une masse visée à 100% de conversion de

^{**} c'est le même principe que le procédé de télomérisation en polymérisation radicalaire conventionnelle (cf. § I-2, p.8)

48000 g/mol. Malgré cela, 45% de conversion sont atteints après environ 15 heures de réaction à 60°C. Les indices de polymolécularité sont faibles ($\sim 1,1$) avec des masses molaires relativement proches des masses théoriques. L'analyse par RMN ^1H d'un échantillon de faible masse molaire moyenne (spécialement synthétisé pour cette analyse) a confirmé la présence du polypeptide en extrémité de chaîne. Enfin, comme les polypeptides présentent des risques de dénaturation sous l'effet de la température, la conservation de la conformation initiale après polymérisation a été vérifiée par une technique de spectrométrie adaptée.

✓ *Biotine* :

La stratégie de synthèse de particules présentant des ligands biotine en surface *via* la conception de copolymères à blocs adaptée développée par K. Wooley (cf. p.36) a ensuite été exploitée par C-Y Hong et C-Y Pan.⁸⁵ Ainsi, un trithiocarbonate biotinylé a été synthétisé par couplage d'une biotine hydroxylée sur un trithiocarbonate porteur d'une fonction acide carboxylique (en présence de DCC). Après purification, le rendement est de 48% (33% pour la synthèse préalable du trithiocarbonate acide).

Les polymérisations RAFT à 70°C du méthacrylamide de N-(2-hydroxypropyle) (HPMA) et du N-isopropylacrylamide (NIPAAm) ont été étudiées séparément avant la synthèse d'un copolymère à blocs. Avec un rapport [ATC]/[AIBN] de 10, tous les critères de contrôle sont validés : I_p inférieurs à 1,2 et valeurs de M_n proches des valeurs théoriques (analyses par CES et par RMN ^1H). Après environ 40 heures de polymérisation, des conversions de 60-70% ont conduit à des homopolymères d'environ 16000-18000 g/mol. Le copolymère à blocs a été obtenu par polymérisation contrôlée du NIPAAm en présence d'un macro-agent RAFT poly(HPMA) précédemment synthétisé (cf. Figure 28).

Notons que dans le cas des trithiocarbonates symétriques ($Z = \text{SR}'$ avec $\text{R}' = \text{R}$ bon groupe partant), il y a croissance de deux chaînes de part et d'autre du centre S-C(=S)-S . L'utilisation, ici, d'un trithiocarbonate asymétrique (R' mauvais groupe partant et R bon groupe partant) favorise la fragmentation d'un seul côté, ce qui conduit à la croissance d'une seule chaîne par trithiocarbonate. Le copolymère à blocs obtenu permet la formation thermo-réversible de particules chevelues présentant des ligands biotine à l'extrémité des cheveux de poly(HPMA). Le diamètre hydrodynamique de ces nanoparticules est de l'ordre de 42 nm (copolymère de masse molaire de 18100 g/mol).

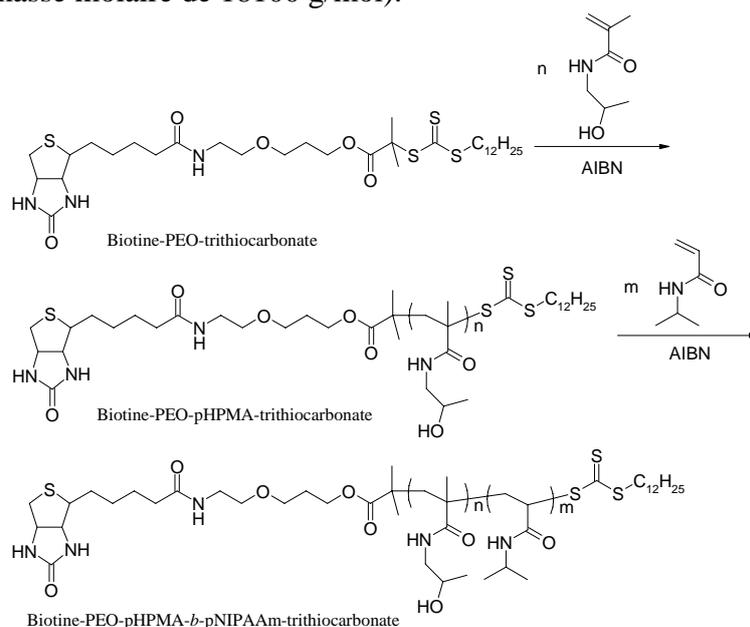


Figure 28 : Synthèse d'un copolymère à blocs biotinylé, hydrosoluble et thermosensible.⁸⁵

✓ *Sucres :*

L'introduction de dérivés carbohydrates en extrémité de chaîne par polymérisation RAFT a été réalisée par Stenzel *et al.*⁸⁶ La modification sélective de certains hydroxyle du α -D-glucose et de la β -cyclodextrine à l'aide d'un trithiocarbonate porteur d'une fonction chlorure d'acyle conduit aux agents RAFT mono ou multi-thiocarbonylés (cf. Figure 29). On peut noter que ce chlorure d'acyle est utilisé immédiatement après synthèse car c'est un composé très réactif mais aussi très instable. D'après leur structure respective, l'agent RAFT dérivé du glucose est censé conduire à des chaînes linéaires fonctionnalisées en ω tandis que celui dérivé de la β -cyclodextrine est censé conduire à une structure en étoile à 7 branches (cf. Figure 29).

La polymérisation du styrène amorcée par l'AIBN à 60°C dans la *N*-méthylpyrrolidone a été réalisée. Ces polymérisations ne sont pas très bien contrôlées : déviation systématique des masses molaires par rapport à la droite théorique et indices de polymolécularité relativement élevés (1,25 à 1,4 pour les chaînes glucosylées et 1,6 à 1,9 pour les bras hydrolysés de la structure en étoile). Malgré ce manque relatif de contrôle, les polymères obtenus ont été mis en œuvre dans un procédé de fabrication de film poreux. La structure et la masse molaire des chaînes ont une influence significative sur la taille moyenne et la distribution en taille des pores. L'utilisation de chaînes fonctionnalisées conduit à une très bonne homogénéité de la taille des pores. Un réarrangement des dérivés carbohydrates ainsi que leur accumulation au sein des pores est le but recherché afin de concevoir de nouveaux types de supports pour la culture cellulaire.

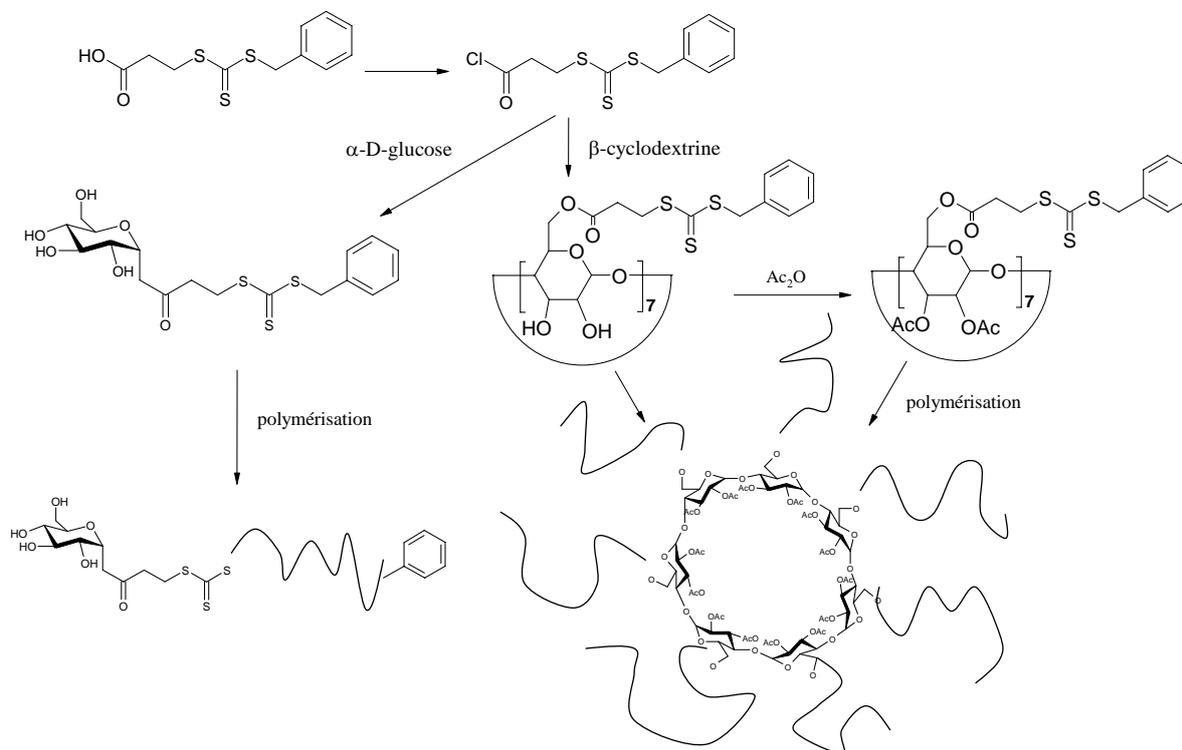


Figure 29 : Synthèse de conjugués à partir des carbohydrates α -D-glucose et β -cyclodextrine.⁸⁶

✓ *Lipides* :

Après l'utilisation d'un agent de transfert irréversible de type lipide-thiol⁴¹ ou d'un amorceur azo-lipidique⁴², Kitano *et al.* ont décrit l'introduction d'un lipide en extrémité de chaînes *via* l'utilisation de dithiocarbamates fonctionnalisés⁸⁷. Bien que les dithiocarbamates peuvent potentiellement être utilisés dans le procédé RAFT, les dithiocarbamates lipidiques synthétisés dans cette étude ne sont pas utilisés en tant qu'ATC mais en tant qu'« iniferter ». Un iniferter* peut jouer le rôle d'agent de transfert de chaîne, cependant, il est également amorceur de polymérisation et agent de terminaison de chaînes : sous irradiation U.V., une partie des molécules d'iniferter se décompose en un fragment radicalaire amorceur de polymérisation et en un autre fragment (non-amorceur) qui peut venir terminer les chaînes en croissance. Cette terminaison conduit à un macro-iniferter qui peut à nouveau se fragmenter sous l'effet du rayonnement U.V.. Ce principe de polymérisation radicalaire contrôlée développé par Otsu *et al.*⁸⁸ dans les années 1980 est à l'origine des techniques actuelles de PRC (en particulier à l'origine de la technique NMP dont le principe est similaire : terminaison réversible sous l'effet de la température et non des U.V.).

Dans le travail de Kitano *et al.*, la dernière étape de la synthèse des dithiocarbamates lipidiques repose sur le couplage de lipides aminés sur un dithiocarbamate porteur d'une fonction acide carboxylique activée par le NHS (cf. Figure 30). Dans ce cas, il n'y a pas de risque de thioamidation compétitive car, contrairement aux dithioesters, aux trithiocarbonates et aux xanthates, les dithiocarbamates ne sont pas réactifs vis à vis des amines.⁸⁹ La polymérisation du méthacrylate de méthyle à l'aide du dithiocarbamate-stéaryle (**1**) a conduit à des oligomères (DP~5-10) dont les indices de polymolécularité (<1,2) ont été déduits d'analyses par spectrométrie de masse MALDI-ToF. Le dithiocarbamate (**2**) a servi à la synthèse de copolymères à blocs à la fois pH-sensibles et porteurs de dérivés saccharidiques : acide méthacrylique (AMA) pour le premier bloc, et monomère dérivé du glucose pour le second. Les degrés moyens de polymérisation sont au maximum de 13 pour chacun des blocs. Grâce à l'insertion de ces copolymères à blocs lipidiques au sein de liposomes, ces derniers présentent des propriétés d'agrégation à pH acide (rôle du polyAMA) ou en présence de la lectine Concanavalin A (rôle des groupes D-glucopyranoside).

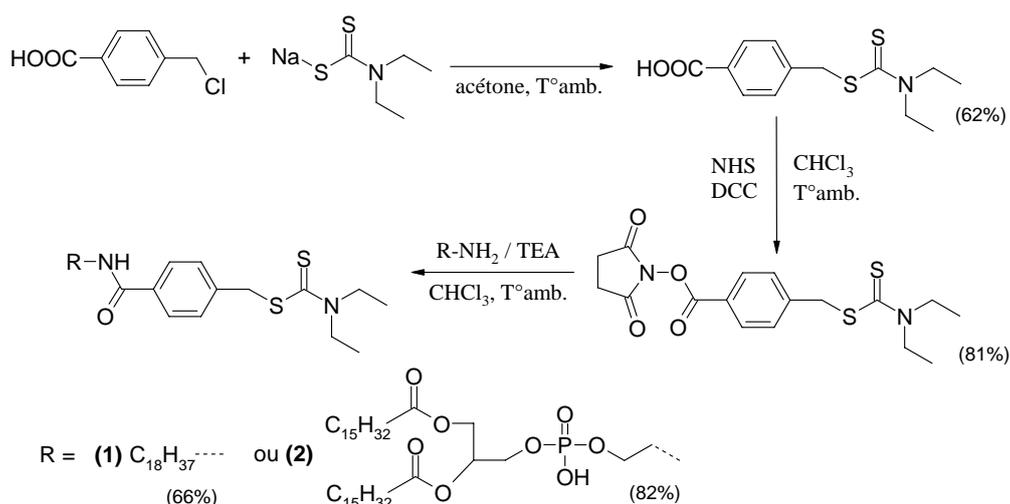


Figure 30 : Synthèse de dithiocarbamates lipidiques [(**1**) Stéaryl, (**2**) L- α -dipalmitoyl Phosphatidylethanyl].⁸⁷

* iniferter : *initiator* – chain *transfer* agent - *terminator*

Très récemment, un autre type de synthèse d'agent RAFT lipidique a été proposé par l'équipe de F.M. Winnik⁹⁰ : il s'agit d'un trithiocarbonate asymétrique portant deux groupes stéaryle (cf. Figure 31). La première étape consiste en la synthèse d'un trithiocarbonate portant une fonction acide carboxylique. Une réaction d'amidation sur cette dernière à l'aide de la *n*-octadécylamine (et en présence de carbonyle di-imidazole) conduit au composé désiré. Cependant, après purification, le rendement de cette deuxième étape est faible (16%). Bien que les auteurs n'expliquent pas ce faible rendement, une aminolyse compétitive est envisageable. En effet, même si les trithiocarbonates sont beaucoup moins réactifs que les dithioesters vis-à-vis des amines⁸⁹, l'utilisation de deux équivalents du composé aminé et une durée de réaction longue (~12h) ont certainement favorisé la formation de sous-produits.

La polymérisation du *N*-isopropylacrylamide à 65°C à l'aide de cet agent RAFT bifonctionnel a conduit à des polymères α,ω -fonctionnels (dits téléchéliques) de masses molaires contrôlées ($I_p < 1,2$). La bonne corrélation entre les trois techniques de mesure des masses molaires (CES/DDL*, UV-vis., RMN ¹H) confirme cette fonctionnalisation des extrémités et cela de manière quantitative. Comme attendu, ces poly(NIPAAm) modifiés par des groupements hydrophobes présentent une température limite de solubilité (LCST) plus faible que du poly(NIPAAm) non modifié.

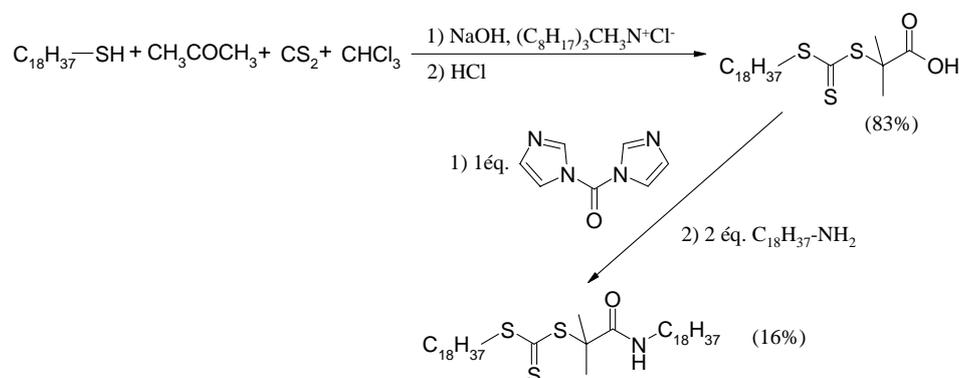


Figure 31 : Synthèse d'un trithiocarbonate asymétrique portant deux groupes stéaryle.⁹⁰

b. Agents de transfert de chaîne portant un fluorophore

Des polymères photosensibles dont les applications potentielles sont relativement variées sont les polymères dits « à effet d'antenne lumineuse »^{**}. Ces polymères sont généralement constitués de deux types de composés photo-actifs : le premier absorbe de l'énergie lumineuse puis il la transfère au second composé*. Cette énergie transférée peut être re-émise sous forme de lumière ou être utilisée à d'autres fins (réaction photochimique par exemple). La distance entre le composé donneur et le composé accepteur doit être faible pour que le transfert d'énergie ait lieu. Ainsi, la fixation des deux composés sur une même chaîne polymère est un moyen de promouvoir ce transfert d'énergie. Chen et *al.* ont effectué plusieurs travaux concernant la conception de telles structures en utilisant le procédé RAFT : le composé accepteur (A) est introduit sur un dithioester puis celui-ci sert à contrôler la polymérisation d'un monomère porteur d'un groupe donneur (D). Un premier exemple est

* CES/DDL : chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur de diffusion de la lumière.

** en anglais : "light harvesting polymers".

* transfert d'énergie possible car le spectre d'émission du premier composé se superpose au spectre d'absorption du second.

illustré par la Figure 32 avec le couple anthryle(A)/acénaphthyle(D).⁹¹ Le dithioester-anthryle est synthétisé par couplage du 9-anthracèneméthanol sur un agent RAFT porteur d'une fonction acide carboxylique (en présence de DCC et DMAP). Le rendement de cette réaction n'est pas précisé. Après polymérisation, la structure du polymère a été vérifiée par spectrométrie de masse MALDI-ToF.

(Remarque : il est un peu étonnant que les auteurs proposent un calcul de masse mono-isotopique sans chiffres après la virgule alors que ce calcul nécessite les masses exactes de l'isotope majoritaire de chacun des éléments considérés et que la technique de mesure de masse soit très précise.)

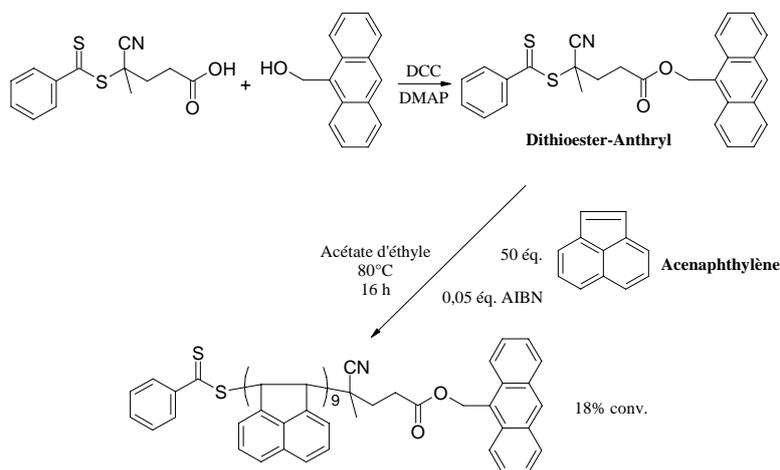


Figure 32 : Synthèse d'un polymère à effet d'antenne lumineuse par polymérisation de type RAFT⁹¹

Conscients de la fragilité de la liaison ester pour certaines applications (risque d'hydrolyse) et de l'impossibilité d'utiliser un composé aminé pour la formation d'une liaison amide plus stable (aminolyse compétitive du dithioester), les auteurs ont développé une stratégie alternative de synthèse du dithioester fluorescent : l'introduction d'une fonction polymérisable sur le composé d'intérêt lui permet de s'insérer au sein d'un dithioester selon le même mécanisme qu'une polymérisation RAFT. Ce type de synthèse revient à faire un oligomère de degré de polymérisation égal à 1 (cf. Figure 33). Les rendements de synthèse par cette voie sont respectivement de 85% et 65% pour un dithioester-coumarine⁹² et un dithioester-diphénylanthryle.⁹³ Ces deux dithioesters ont permis de polymériser l'acenaphthylène ou de le copolymériser avec l'anhydride maléique⁹³. Celui-ci génère des fonctions acide après hydrolyse, ce qui confère au copolymère une bonne solubilité dans l'eau. Un autre moyen pour rendre le polymère fluorescent soluble en phase aqueuse est de rajouter un bloc de poly(acide acrylique)⁹². Comme il a été observé que l'extrémité dithiobenzoate réduit fortement le transfert de fluorescence, les (co)polymères sont tous hydrolysés pour obtenir une extrémité thiol non perturbatrice.

Les indices de polymolécularité (dérivant d'une calibration polystyrène) sont inférieurs à 1,2. Les masses molaires absolues sont déterminées par chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur U.V.-visible. Elles sont proches des valeurs théoriques.

Les mêmes auteurs ont également conçu des polymères à effet d'antenne lumineuse avec le complexe métallique Ru(II)-tris(bipyridine) en tant qu'accepteur et un monomère styrénique modifié par la coumarine en tant que donneur.⁹⁴ Pour cela des agents RAFT bi- ou hexa-thiocarbonylés ont été synthétisés à partir d'une bipyridine di-hydroxylée et d'un dithioester-acide carboxylique (cf. Tableau 4, ligne 10). Ces agents RAFT ne conduisent pas véritablement à des polymères α -fonctionnels mais la stratégie de synthèse est identique aux

exemples précédents. Les masses molaires de différents échantillons (déterminées par la détection U.V.-visible) sont proches des valeurs théoriques. Enfin, pour valider le contrôle des polymérisations à travers des indices de polymolécularité qui dépendent d'une calibration polystyrène ($I_p < 1,1$), ceux-ci sont comparés à la valeur obtenue lors de l'analyse d'un poly(styrène-coumarine) synthétisé par polymérisation radicalaire conventionnelle ($I_p = 1,6$).

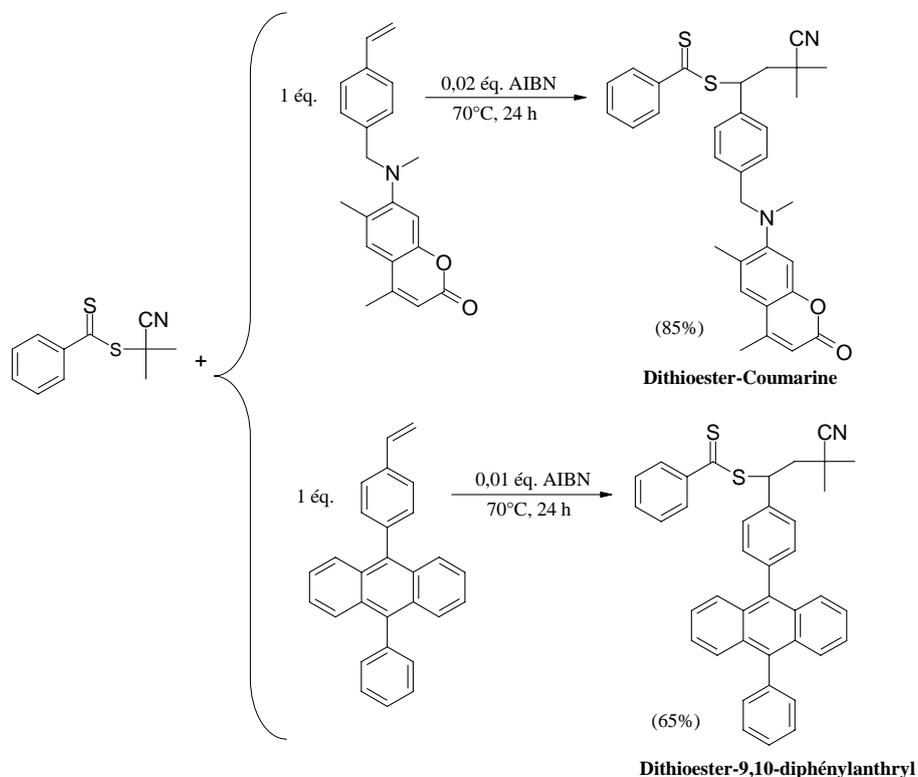


Figure 33 : Synthèse de dithioesters fluorescents par voie radicalaire.^{92,93}

Des structures polymères à base de bipyridine ont également été élaborées par G. Zhou et I.I. Harruna.⁹⁵ L'agent RAFT correspondant (cf. Tableau 4, ligne 11) a été synthétisé par réaction de S-thioacylation d'une dithiolméthyl-bipyridine par le dithioester commercial dithiobenzoate de carboxyméthyle (DBCM). La polymérisation du styrène amorcée thermiquement (100°C) a conduit à des polymères dont les indices de polymolécularité sont inférieurs à 1,2. Les masses molaires déterminées par CES sont supérieures aux masses calculées. Les auteurs expliquent cette différence par l'utilisation d'un étalon de masse molaire bien supérieure à celle des échantillons analysés. Cependant, ils concluent à un très bon contrôle de la polymérisation en se basant sur l'excellente corrélation entre les masses molaires moyennes déterminées par RMN ¹H et les masses théoriques.[§] Contrairement à l'exemple précédent, la complexation avec le ruthénium a été effectuée après polymérisation.

[§] *Remarque importante* : l'examen de la méthode de détermination des masses molaires par RMN ¹H (comparaison des intégrales des résonances des protons du groupe bipyridine avec les intégrales des protons vinyliques des motifs styrène) révèle que ce calcul ne donne pratiquement aucune information ! Pour réaliser le calcul, les auteurs supposent que toutes les chaînes portent un groupe bipyridine. Ils précisent bien que les chaînes amorcées thermiquement n'en portent pas. Ensuite, grâce à la (trop) bonne corrélation entre ces masses molaires calculées et les masses molaires théoriques, ils concluent que la proportion de chaînes amorcées thermiquement est négligeable... sans se rendre compte que, **quel que soit le pourcentage réel de telles chaînes dans l'échantillon**, leur calcul les fera toujours retomber sur la valeur théorique !! Avec un amorçage thermique, il est très probable que

la proportion de chaînes non fonctionnalisées soit négligeable mais ce ne sont pas des analyses par RMN qui peuvent le confirmer.

En étant sûr que l'agent RAFT est bien soluble dans le solvant de précipitation du polymère (dans l'étude citée, le polymère a été précipité dans du méthanol), les auteurs auraient pu conclure que la totalité de l'agent RAFT initial a été consommé au moment du prélèvement...

Un travail identique a été réalisé par les mêmes auteurs à partir d'un dithioester-terpyridine.⁹⁶ La polymérisation thermique du styrène à 100°C ainsi que la polymérisation (amorcée par l'AIBN) du *N*-isopropylacrylamide à 75°C ont été effectuées. Les deux types de polymères α -fonctionnels ont ensuite servi à la complexation du ruthénium (cf. Figure 34).

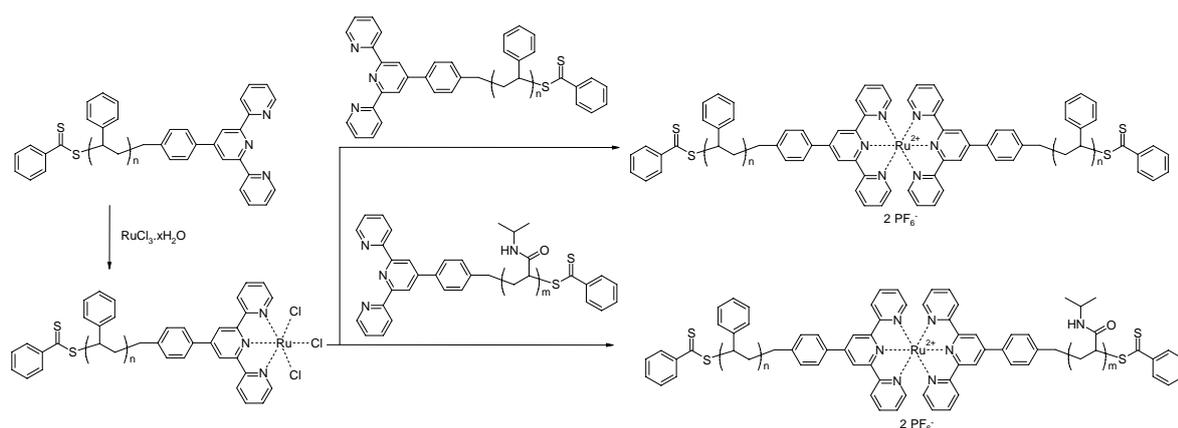


Figure 34 : Formation de complexes Bis(terpyridine)ruthénium(II) à partir de polymères dont une des extrémités est un groupe terpyridine.⁹⁶

c. Agents de transfert de chaîne fonctionnels divers

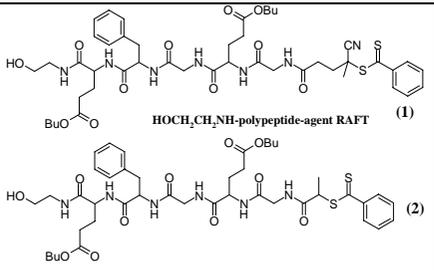
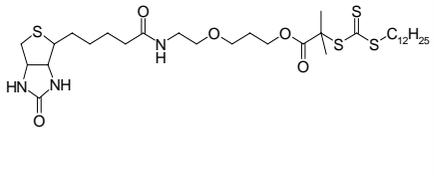
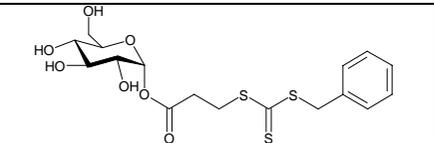
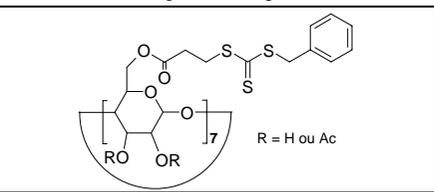
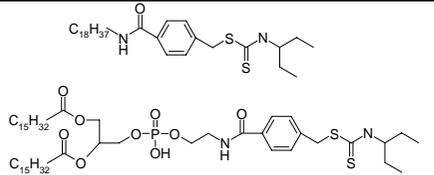
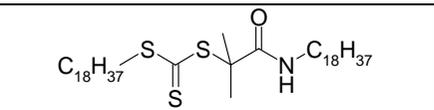
Un peu avant la publication d'un amorceur de type ATRP porteur d'un groupe perfluoré (cf. § III-2.c, p.41), l'équipe de B. Boutevin avait précédemment décrit l'utilisation d'une série de 5 dithioesters perfluorés (cf. Tableau 4, ligne 13) pour la synthèse de polymères α -fonctionnels ayant des propriétés tensioactives potentiellement intéressantes.⁹⁷ Ces 5 agents RAFT ont été synthétisés suivant une réaction de type Grignard : insertion de disulfure de carbone CS₂ dans la liaison C-Mg d'un phénylmagnésien PhMgBr, puis substitution nucléophile par un des halogénures ω -perfluorés préalablement synthétisés. Les dithioesters présentant un carbone primaire en α du soufre ne permettent pas de contrôler la polymérisation du styrène et du méthacrylate de méthyle : les masses molaires sont largement supérieures aux masses théoriques et les indices de polymolécularité sont supérieurs à 1,5. En revanche, les autres agents RAFT ont permis l'obtention de polymères (ou oligomères) contrôlés ($I_p < 1,2$) à partir du styrène (Sty), du méthacrylate de méthyle (MMA) et de l'acrylate d'éthyle (AE). La présence des groupements perfluorés en extrémité de chaîne a été vérifiée par RMN ¹H. Des copolymères à blocs, poly(MMA-*b*-Sty) et poly(AE-*b*-Sty) ont également été synthétisés. En fonction de leurs propriétés tensioactives, ces divers (co)polymères perfluorés peuvent servir à la conception de nouvelles formulations de produits aqueux de lutte contre le feu.

Enfin, citons l'existence de nombreux travaux traitant de la modification de divers matériaux par ancrage de chaînes polymères à leur surface. La voie « grafting from » en utilisant le procédé RAFT nécessite au préalable la modification de surface à l'aide de composés thiocarbonyl-thio afin d'obtenir des macro-agents RAFT. Par exemple, des matériaux aussi divers que la cellulose^{98,99}, des fibres de coton¹⁰⁰, des particules de silice^{101,102} ou des nanotubes de carbone¹⁰³ ont ainsi été transformés en agents de transfert de chaîne efficaces pour des polymérisations de type RAFT (cf. Tableau 4, ligne 14 à 17).

Bilan sur le procédé RAFT

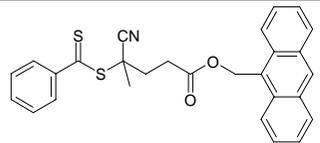
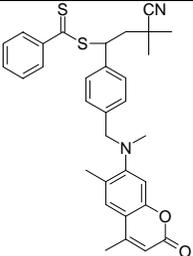
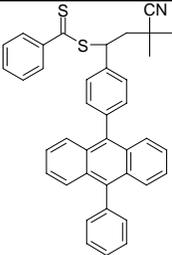
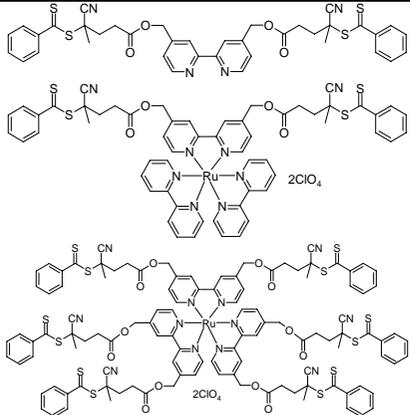
Tout comme la technique ATRP, le procédé RAFT permet la synthèse de conjugués de nature très variée. Bien que la synthèse d'ATC fonctionnels semble souvent plus complexe que la synthèse d'amorceurs fonctionnels (cas de l'ATRP) et que par conséquent les rendements de synthèse dépassent rarement 70%, le procédé RAFT ne souffre pas de problème d'efficacité d'amorçage. En effet, l'amorçage est assuré par un amorceur classique et, en utilisant un ATC efficace (c-a-d, pour simplifier, un ATC qui ne libère pas un fragment ré-amorceur « primaire »), la totalité du composé d'intérêt se retrouve en extrémité de chaîne. Cependant, le rapport [ATC]/[amorceur] doit être optimisé afin de limiter la proportion de chaînes non fonctionnalisées.

Tableau 4 : Agents de transfert fonctionnels - Polymérisation de type RAFT

	Composé d'intérêt (C)	Amorceur	Rendement de synthèse	Conjugué obtenu (C-Polymère _{DP})	Application potentielle	Référence, Remarque
1	Polypeptide	 <p>(1) HOCH₂CH₂NH-polypeptide-agent RAFT</p> <p>(2)</p>	76%* ~100%*	Polypeptide-PnBA ₅₀₀ Polypeptide-PnBA ₂₀₀	Reconnaissance cellulaire.	*synthèse supporté sur résine. 83 (Figure 27, p.49)
2	Biotine		48%	Biotine-PNIPAAm ₁₂₀ Biotine-PHPMA ₁₀₅ Biotine-PHPMA _{52-b} -PNIPAAm ₉₁	Particules biotinylées : système modèle des processus de reconnaissance protéine-cellule	85 (Figure 28, p.50)
3	Sucre		35%	α-D-glucose-PS ₂₀	Film poreux présentant des sucres dans les pores : Substrat de culture cellulaire.	86 (Figure 29, p.51)
4		 <p>R = H ou Ac</p>	40%	β-cyclodextrine-(PS ₂₀) ₇		
5	Lipide		66%	Stéaryle-PMMA ₁₀ Dipalmitoyle-PMA _{13-b} -PMSucre ₁₂	Liposomes porteurs de sucres : reconnaissance et capture de bactéries	87 (Figure 30, p.52)
6			82%			

PHPMA : poly((2-hydroxypropyl)méthacrylamide) ; PMA : poly(acrylate de méthyle) ; PMMA : poly(méthacrylate de méthyle)
PMSucre : polymère d'un monomère dérivé d'un sucre ; PnBA : poly(acrylate de n-butyle) ; PNIPAAm : poly(N-isopropylacrylamide).

Tableau 4 (suite) : Agents de transfert fonctionnels - Polymérisation de type RAFT

	Composé d'intérêt (C)	Amorceur	Rendement de synthèse	Conjugué obtenu (C-Polymère _{DP})	Application potentielle	Référence, Remarque
7	Fluorophore		non précisé	Anthryl-PAcN ₉ Anthryl-PAcN ₉ - <i>b</i> -PAA ₂₅	Conception de polymères à effet d'antenne lumineuse → Diverses applications (dont dispositifs de conversion ou stockage d'énergie par exemple).	91 (Figure 32, p.54)
8			85%	Coumarine- PAcN ₂₂ Coumarine- PAcN ₂₂ - <i>b</i> -PAA ₃₀₀		92 (Figure 33, p.55)
9			65%	Diphénylanthryl-P(AcN- <i>co</i> -AM) ₃₈		93 (Figure 33, p.55)
10	Chromophore		40-50%	PStC ₁₄₀ -Bipyridine-PStC ₁₄₀ PStC ₁₄₀ -Bipyridine[Ru]-PStC ₁₄₀ (PStC ₁₄₀ -Bipyridine-PStC ₁₄₀) ₃ -[Ru] (structure en étoile)	94	

AM : anhydride maléique ; PAA : poly(acide acrylique); PAcN : poly(acénaphthylène) ; PStC : poly(styrène modifié coumarine)

Tableau 4 (suite) : Agents de transfert fonctionnels - Polymérisation de type RAFT

	Composé d'intérêt (C)	Amorceur	Rendement de synthèse	Conjugué obtenu (C-Polymère _{DP})	Application potentielle	Référence, Remarque
11	Dérivé Pyridine (ligand de métaux)		85%	PS ₁₃₅ -Bipyridine-PS ₁₃₅	Complexation avec du Ruthénium (Ru) → diverses applications (dont détecteur de lumière ou affichage électroluminescent par exemple)	95
12			70%	Terpyridine-PS ₁₂₅ Terpyridine-PNIPAAm ₁₁₀		96 (Figure 34, p.56)
13	Groupe perfluoré		57 à 88%	Groupe fluoré-PS ₃₃₀ Groupe fluoré-PMMA ₁₉₀ Groupe fluoré-PAE ₁₄₀ Groupe fluoré-PB ₄₅ Groupe fluoré-PMMA ₂₂₀ - <i>b</i> -PS ₁₂₀₀ Groupe fluoré-PAE ₁₄₀ - <i>b</i> -PS ₁₈₀	Propriétés tensioactives → Formulation de produits aqueux de lutte contre le feu.	97
14	Supports divers		non précisé	Fibre de Cellulose-(PS) _x	Nouveaux matériaux composites	98,99
15			non précisé	Fibre de Coton-(PS) _x Fibre de Coton-(PMA) _x Fibre de Coton-(PMMA) _x	Nouveaux textiles	100
16			35%	Particule Silice-(PS) _x Particule Silice-(PnBA) _x Particule Silice-(poly(<i>n</i> BA- <i>b</i> -S)) _x Particule Silice-(PMMA) _x	Matériaux nanocomposites	101,102
17			non précisé	Nanotubes de carbone-(PS) _x	Matériaux nanocomposites	103

PAE : poly(acrylate d'éthyle) ; PB : poly(1,3-butadiène) ; PMA : poly(acrylate de méthyle) ; PMMA : poly(méthacrylate de méthyle) ; PnBA : poly(acrylate de *n*-butyle) ; PNIPAAm : poly(N-isopropylacrylamide) ; PS : polystyrène ; X > 1 (plusieurs chaînes polymère sur les divers supports)

Conclusion de l'étude bibliographique

L'introduction d'une entité d'intérêt en extrémité d'une chaîne polymère permet de créer de nouveaux composés (conjugués polymères) qui allient les propriétés spécifiques des deux composants initiaux.

La fonctionnalisation des extrémités de chaîne d'un polymère préformé est une voie de synthèse qui permet de localiser de manière précise* le composé d'intérêt sur la chaîne. Les propriétés finales du conjugué peuvent être ajustées, entre autres, par la longueur des chaînes. Ainsi, l'utilisation d'un polymère synthétisé par une technique de polymérisation contrôlée permet de créer un conjugué parfaitement bien défini. Avec l'apparition de tels polymères dans les catalogues de certains fournisseurs, la conception de conjugués à base de polymères contrôlés est facilitée et ne demande pas de compétences particulières concernant les procédés de polymérisation.

L'ensemble des exemples donnés dans la première partie de ce chapitre bibliographique (exemples volontairement restreints aux bio-conjugués) a montré que les techniques de synthèse des conjugués sont relativement variées tout comme les fonctions réactives présentes en extrémité de chaîne. Ces dernières imposent un certain type de réaction chimique lors du couplage entre le polymère et le composé d'intérêt. Malheureusement, malgré une réactivité *théorique* généralement importante entre les deux fonctions impliquées, le manque d'accessibilité des fonctions réactives présentes aux extrémités de la macromolécule limite fortement les rendements de couplage. Cette accessibilité dépendant de la longueur des chaînes, l'utilisation de polymères de masses molaires supérieures à 20000 g/mol n'est pas recommandé. Enfin, ces rendements de couplage limités nécessitent des procédés de purification des (bio-)conjugués obtenus souvent complexes et fastidieux.

Pour pallier ces inconvénients, des stratégies d'introduction du composé d'intérêt en extrémité de chaîne *avant la polymérisation* ont été développées. Elles impliquent l'utilisation d'amorceurs ou d'agents de transfert de chaîne préalablement fonctionnalisés. La nature chimique de ces composés dépend du type de polymérisation mis en jeu.

La synthèse de composés adaptés aux techniques classiques telles que la polymérisation radicalaire conventionnelle, la polymérisation ionique vivante ou la polymérisation par ouverture de cycle, permet bien l'introduction d'un composé d'intérêt à une extrémité de la chaîne, mais ces techniques souffrent de limitations : respectivement, une large distribution des masses molaires, des conditions expérimentales contraignantes et la nécessité de protéger les groupes fonctionnels, un nombre restreint de monomères utilisables.

Récemment, les techniques de polymérisation radicalaire contrôlée ont permis d'écartier ces limitations et ont mis en valeur les avantages de la stratégie d'introduction d'un composé d'intérêt avant la polymérisation. En effet, ces techniques sont généralement insensibles à la présence de groupes fonctionnels et peuvent conduire à des polymères α - ou ω -fonctionnalisés de masses molaires relativement importantes (>20000 g/mol), tout en assurant un taux de fonctionnalisation élevé et une distribution des masses molaires étroite. Cependant, malgré cette capacité à obtenir des conjugués de masses molaires relativement élevées, un certain nombre d'exemples cités dans cette étude se contentent de masses molaires inférieures à 20000 g/mol pour répondre aux critères requis par les applications envisagées. C'est

* Contrairement à la fonctionnalisation *via* l'utilisation de fonctions latérales dont la position est souvent plus ou moins aléatoire le long de la chaîne.

généralement le cas pour les bio-conjugués, qui représentent un peu plus de la moitié des travaux répertoriés ici.

En ne considérant que les bio-conjugués, une différence notable apparaît concernant *le type de liaison formée* entre le composé biologique et le polymère, selon la stratégie de synthèse suivie. La majorité des couplages post-polymérisation impliquent un composé aminé permettant la formation d'une liaison stable de type amide (ou amine), alors qu'une liaison de type ester est souvent présente dans les amorceurs (ATRP) ou agents de contrôle (RAFT) fonctionnalisés (sauf pour quelques amorceurs de polymérisation NMP). Concernant la technique RAFT, la sensibilité de la plupart des agents de contrôle vis-à-vis des composés aminés explique ce choix. Concernant la technique ATRP, la possibilité d'une complexation compétitive des catalyseurs métalliques par le doublet non-liant de l'azote est une autre explication.

Par ailleurs, même si la voie de fonctionnalisation avant polymérisation permet souvent d'éviter une étape fastidieuse de purification du conjugué final, celle-ci est remplacée par des étapes de synthèse de l'amorceur ou de l'agent de contrôle fonctionnalisé. Bien que ces étapes semblent plus simples pour la technique ATRP que pour les techniques NMP et RAFT, les rendements de synthèse sont rarement proches des 100%.

Enfin, il faut bien avouer que les trois principales techniques de PRC ont chacune leur petit bémol à différentes étapes de la synthèse du polymère α -fonctionnel. La polymérisation contrôlée par les nitroxydes (NMP) est limitée par le procédé même : elle n'est efficace que pour une gamme restreinte de monomères et les températures élevées de polymérisation ($>100^{\circ}\text{C}$)^{*} ne sont pas le gage d'un taux de fonctionnalisation élevé (risque d'amorçage thermique et/ou risque de dénaturation du composé d'intérêt). Les conditions expérimentales de la polymérisation par transfert d'atome (ATRP) sont plus souples, mais l'élimination totale des catalyseurs métalliques est souvent une étape problématique. L'utilisation du procédé RAFT ne se confronte pas à ces problèmes, mais sa limite réside essentiellement dans la synthèse, souvent fastidieuse, des agents de contrôle thiocarbonylés.

Ainsi, ces difficultés de synthèse étant, semble-t-il, la limitation pratique majeure du procédé RAFT en vue de l'obtention de polymères α -fonctionnels, le développement de nouvelles stratégies de synthèse, simples et efficaces, d'agents RAFT fonctionnalisés est un sujet d'importance que nous avons abordé.

^{*} Certains travaux récents rapportent des conditions plus « douces » mais, à notre connaissance, ils ne concernent pas (encore) l'utilisation d'amorceurs fonctionnalisés.

Références du chapitre 1

- (1) Hawker, C. J.; Bosman, A. W.; Harth, E. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3661-3688.
- (2) Matyjaszewski, K.; Xia, J. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2921-2990.
- (3) Coessens, V.; Pintauer, T.; Matyjaszewski, K. *Prog. Polym. Sci.* **2001**, 337-377.
- (4) Kamigaito, M.; Ando, T.; Sawamoto, M. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3689-3745.
- (5) Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Aust. J. Chem.* **2005**, *58*, 349-410.
- (6) Perrier, S.; Takolpuckdee, P. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* **2005**, *43*, 5347-5393.
- (7) Favier, A.; Charreyre, M.-T. *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 653-692.
- (8) Jeong, J. H.; Park, T. G. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 917-923.
- (9) Hay, D. N. T.; Rickert, P. G.; Firestone, M. A. *Polymer Preprints* **2005**, *46(2)*, 816-817.
- (10) Frisch, B.; Carrière, M.; Largeau, C.; Mathey, F.; Masson, C.; Schubert, F.; Scherman, D.; Escriou, V. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 754-764.
- (11) Cannizzaro, S. M.; Padera, R. F.; Langer, R.; Rogers, R. A.; Black, F. E.; Davies, M. C.; Tandler, S. J. B.; Shakesheff, K. M. *Biotechnology and Bioengineering* **1998**, *58*, 529-535.
- (12) Kassab, R.; Fenet, B.; Fessi, H.; Parrot-Lopez, H. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 877-881.
- (13) Coullerez, G.; Bath, K.; Textor, M. *Polymer Preprints* **2005**, *46(2)*, 1218.
- (14) Vocabulaire de la chimie et des matériaux, 2004 ; Termes, expressions et définitions publiés au Journal Officiel ; Commission générale de terminologie et de néologie.
- (15) Chen, G. H.; Hoffman, A. S. *Polymer Preprints* **1992**, *33*, 468-469.
- (16) Ding, Z.; Chen, G.; Hoffman, A. S. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 121-125.
- (17) Malmstadt, N.; Hyre, D. E.; Ding, Z.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 575-580.
- (18) Shimoboji, T.; Larenas, E.; Fowler, T.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 517-525.
- (19) Torchilin, V. P.; Levchenko, T. S.; Whiteman, K. R.; Yaroslavov, A. A.; Tsatsakis, A. M.; Rizos, A. K.; Michailova, E. V.; Shtilman, M. I. *Biomaterials* **2001**, *22*, 3035-3044.
- (20) Ouchi, T.; Uchida, T.; Arimura, H.; Ohya, Y. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 477-480.
- (21) Mosquet, M.; Chevalier, Y.; Le Perchec, P.; Guicquero, J. P. *Macromol. Chem. Phys.* **1997**, *198*, 2457-2474.
- (22) Studer, P.; Limal, D.; Breton, P.; Riess, G. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 223-229.
- (23) Metselaar, J. M.; Bruin, P.; Boer, L. W. T. d.; Vringer, T. d.; Snel, C.; Oussoren, C.; Wauben, M. H. M.; Crommelin, D. J. A.; Storm, G.; Hennink, W. E. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1156-1164.
- (24) Nederberg, F.; Bowden, T.; Hilborn, J. *Macromolecules* **2004**, *37*, 954-965.

- (25) Hayashi, M.; Loykulnant, S.; Hirao, A.; Nakahama, S. *Macromolecules* **1998**, *31*, 2057-2063.
- (26) Chen, B.; Metera, K.; Sleiman, H. F. *Macromolecules* **2005**, *38*, 1084-1090.
- (27) Levesque, G.; Arsène, P.; Fanneau-Bellenger, V.; Pham, T.-N. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 400.
- (28) Thomas, D. B.; Convertine, A. J.; Hester, R. D.; Lowe, A. B.; McCormick, C. L. *Macromolecules* **2003**, *37*(5), 1735-1741.
- (29) Nakayama, M.; Okano, T. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2320-2327.
- (30) Kulkarni, S.; Schilli, C.; Müller, A. H. E.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 747-753.
- (31) Scales, C. W.; Convertine, A. J.; McCormick, C. L. *Polymer Preprints* **2005**, *42*(2), 393-394.
- (32) Scales, C. W.; Convertine, A. J.; McCormick, C. L. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1389-1392.
- (33) Harth, E.; Hawker, C. J. *Macromolecules* **2001**, *34*, 3856-3862.
- (34) Tao, L.; Mantovani, G.; Lecolley, F.; Haddleton, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13220-13221.
- (35) Mantovani, G.; Lecolley, F.; Tao, L.; Haddleton, D. M.; Clerx, J.; Cornelissen, J. J. L. M.; Velonia, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2996-2973.
- (36) Tao, L.; Mantovani, G.; Limer, A.; Haddleton, D. M. *Polymer Preprints* **2005**, *46*(2), 309-310.
- (37) Sait, D.; Bon, S.; Haddleton, D. *Polymer Preprints* **2005**, *46*(2), 146-147.
- (38) Lecolley, F.; Tao, L.; Mantovani, G.; Durkin, I.; Lautru, S.; Haddleton, D. M. *Chem. Commun.* **2004**, 2026-2027.
- (39) Bontempo, D.; Heredia, K. L.; Fish, B. A.; Maynard, H. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15372-15373.
- (40) Joshi, N. S.; Whitaker, L. R.; Francis, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15942-15943.
- (41) Kitano, H.; Maeda, Y. *Langmuir* **1994**, *10*, 403-406.
- (42) Kitano, H.; Akatsuka, Y.; Ise, N. *Macromolecules* **1991**, *24*, 42-46.
- (43) Kitano, H.; Ishino, Y.; Yabe, K. *Langmuir* **2000**, *17*, 2312-2316.
- (44) Sugiyama, K.; Ohga, K.; Kikukawa, K. *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, *195*, 1341-1352.
- (45) Ganachaud, F.; Theretz, A.; Erout, M. N.; Llauro, M. F.; Pichot, C. *J. Appl. Polym. Sc.* **1995**, *58*, 1811 - 1824.
- (46) Aoi, K.; Suzuki, H.; Okada, M. *Macromolecules* **1992**, *25*, 7073-7075.
- (47) Kitano, H.; Sumi, Y.; Tagawa, K. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 56-61.
- (48) Matyjaszewski, K. *Controlled/Living Radical Polymerization : Progress in ATRP, NMP, and RAFT*; ACS Symposium Series 768 ed. American Chemical Society, 2000.
- (49) Fischer, H. *J. Polym. Science : Part A : Polymer Chemistry* **1999**, *37*, 1885-1901.
- (50) Becker, M. L.; Liu, J.; Wooley, K. L. *Chem. Commun.* **2002**, 2003, 180-181.
- (51) Mather, B. D.; Lizotte, J. R.; Long, T. E. *Macromolecules* **2004**, *37*, 9331-9337.

- (52) Qi, K.; Zhou, C.; Walker, A. V.; Wooley, K. L.; Jhaveri, S. B.; Soguh, D. Y.; Malkoch, M.; Beinkoff, M.; Carter, K. R.; Hawker, C. J. *Polymer Preprints* **2005**, *46(1)*, 363.
- (53) Werne, T. A. v.; Beinhooff, M.; Hagberg, E. C.; Jhaveri, S. B.; Sogah, D. Y.; Hawker, C. J.; Carter, K. R. *Polymer Preprints* **2005**, *46(2)*, 46-47.
- (54) Ötz, H.; Harth, E.; Schiller, S. M.; Frank, C. W.; Knoll, W.; Hawker, C. J. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* **2002**, *40*, 3379-3391.
- (55) Rodlert, M.; Harth, E.; Rees, I.; Hawker, C. J. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* **2000**, *38*, 4749-4763.
- (56) Bowden, N. B.; Willets, K. A.; Moerner, W. E.; Waymouth, R. M. *Macromolecules* **2002**, *35*, 8122-8125.
- (57) Lohmeijer, B. G. G.; Schubert, U. S. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* **2004**, *42*, 4016-4027.
- (58) Mei, Y.; Beers, K. L.; Byrd, H. C. M.; VanderHart, D. L.; Washburn, N. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3472-3476.
- (59) Rettig, H.; Krause, E.; Börner, H. G. *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 1251-1256.
- (60) Marsh, A.; Khan, A.; Haddleton, D. M.; Hannon, M. J. *Macromolecules* **1999**, *32*, 8725-8731.
- (61) Qi, K.; Ma, Q.; Remsen, E. E.; Clark, C. G.; Wooley, K. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6599-6607.
- (62) Becker, M. L.; Joralemon, M. J.; Pan, D.; Qi, K.; Turner, J. L.; Wooley, K. L. *Polymer Preprints* **2005**, *46(1)*, 123.
- (63) Joralemon, M. J.; Smith, N. L.; Holowka, D.; Baird, B.; Wooley, K. L. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1246-1256.
- (64) Bontempo, D.; Li, R. C.; Maynard, H. D. *Polymer Preprints* **2005**, *46(2)*, 435-436.
- (65) Bontempo, D.; Li, R. C.; Ly, T.; Brubaker, C. E.; Maynard, H. D. *Chem. Commun.* **2005**, 4702-4704.
- (66) Admiral, V.; Mantovani, G.; Macpherson, J.; Haddleton, D. M.; Ohno, K.; Tsujii, Y.; Fukuda, T. *Polymer Preprints* **2005**, *46(2)*, 366-367.
- (67) Bontempo, D.; Maynard, H. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6508-6509.
- (68) Heredia, K. L.; Bontempo, D.; Ly, T.; Byers, J. T.; Halstenberg, S.; Maynard, H. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16955-16960.
- (69) Bes, L.; Angot, S.; Limer, A.; Haddleton, D. M. *Macromolecules* **2002**, *36*, 2493-2499.
- (70) Haddleton, D. M.; Ohno, K. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 152-156.
- (71) Bon, S. A. F.; Haddleton, D. M. *Polymer Preprints* **1999**, *40*, 248-249.
- (72) Edmonds, R.; Bon, S. A. F.; Haddleton, D. M. *Polymer Preprints* **2000**, *41(1)*, 444-445.
- (73) Théato, P.; Preis, E.; Brehmer, M.; Zentel, R. *Macromol. Symp.* **2001**, *164*, 257-267.
- (74) Haddleton, D. M.; Edmonds, R.; Heming, A. M.; Kelly, E. J.; Kukulj, D. *New J. Chem.* **1999**, *23*, 477-479.
- (75) Melia, E.; Haddleton, D. M. *Polymer Preprints* **2005**, *46(2)*, 166-167.
- (76) Miura, Y.; Duan, Q.; Narumi, A.; Satoh, T.; Kaga, H.; Kakuchi, T. *Polymer Preprints* **2005**, *46(2)*, 428-429.

- (77) Venkataraman, S.; Schaefer, J.; Wooley, K. L. *Polymer Preprints* **2005**, 46(2), 361.
- (78) Perrier, S.; Jackson, S. G.; Haddleton, D. M.; Améduri, B.; Boutevin, B. *Macromolecules* **2003**, 36, 9042-9049.
- (79) Zhou, P.; Chen, G.-Q.; Li, C.-Z.; Du, F.-S.; Li, Z.-C.; Li, F.-M. *Chem. Commun.* **2000**, 797-798.
- (80) Jakubowski, W.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **2005**, 38, 4139-4146.
- (81) Jakubowski, W.; Min, K.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **2006**, 39, 39-45.
- (82) Favier, A.; Charreyre, M.-T.; Pichot, C. *Polymer* **2004**, 45, 8661-8674.
- (83) ten Cate, M. G. J.; Rettig, H.; Bernhardt, K.; Börner, H. G. *Macromolecules* **2005**, 38, 10643-10649.
- (84) Delêtre, M.; Levesque, G. *Macromolecules* **1990**, 23, 4733-4741.
- (85) Hong, C.-Y.; Pan, C.-Y. *Macromolecules* **2006**, 39, 3517-3524.
- (86) Stenzel, M. H.; Davis, T. P.; Fane, A. G. *J. Mater. Chem.* **2003**, 13, 2090.
- (87) Kitano, H.; Chibashi, M.; Nakamata, S.; Ide, M. *Langmuir* **1999**, 15, 2709-2713.
- (88) Otsu, T.; Yoshida, M. *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **1982**, 3, 127-133.
- (89) Haraoubia, R.; Bonnans, C.; Gressier, J.-C.; Levesque, G. *Makromol. Chem.* **1982**, 183, 2383-2397.
- (90) Kujawa, P.; Segui, F.; Shaban, S.; Diab, C.; Okada, Y.; Tanaka, F.; Winnik, F. M. *Macromolecules* **2006**, 39, 341-348.
- (91) Chen, M.; Ghiggino, K. P.; Mau, A. W. H.; Rizzardo, E.; Thang, S. H.; Wilson, G. J. *Chem. Commun.* **2002**, 2276-2277.
- (92) Chen, M.; Ghiggino, K. P.; Mau, A. W. H.; Rizzardo, E.; Sasse, W. H. F.; Thang, S. H.; Wilson, G. J. *Macromolecules* **2004**, 37, 5479-5481.
- (93) Chen, M.; Ghiggino, K. P.; Mau, A. W. H.; Sasse, W. H. F.; Thang, S. H.; Wilson, G. J. *Macromolecules* **2005**, 38, 3475-3481.
- (94) Chen, M.; Ghiggino, K. P.; Launikonis, A.; Mau, A. W. H.; Rizzardo, E.; Sasse, W. H. F.; Thang, S. H.; Wilson, G. J. *J. Mater. Chem.* **2003**, 13, 2696-2700.
- (95) Zhou, G.; Harruna, I. I. *Macromolecules* **2004**, 37, 7132-7139.
- (96) Zhou, G.; Harruna, I. I. *Macromolecules* **2005**, 38, 4114-4123.
- (97) Lebreton, P.; Ameduri, B.; Boutevin, B.; Corpart, J.-M. *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, 203, 522-537.
- (98) Roy, D.; Guthrie, J. T.; Perrier, S. *Macromolecules* **2005**, 38, 10363-10372.
- (99) Roy, D.; Guthrie, J. T.; Perrier, S. *Polymer Preprints* **2005**, 46(2), 324-325.
- (100) Perrier, S.; Takolpuckdee, P.; Westwood, J.; Lewis, D. M. *Macromolecules* **2004**, 37, 2709-2717.
- (101) Li, C.; Benicewicz, B. C. *Macromolecules* **2005**, 38, 5929-5936.
- (102) Li, C.; Benicewicz, B. C. *Polymer Preprints* **2005**, 46(2), 274-275.
- (103) Cui, J.; Wang, W.; You, Y.; Liu, C.; Wang, P. *Polymer* **2004**, 45, 8717-8721.

Chapitre 2

Synthèse d'agents de contrôle (bio)-fonctionnels
pour la polymérisation de type RAFT.

Sommaire du chapitre 2

Introduction : Stratégie de synthèse.....	67
I. Synthèse des dithioesters précurseurs.....	70
I-1. Synthèse du SEDB.....	70
a) Principe de la synthèse.	70
b) Essais d'amélioration des conditions de synthèse.	71
c) Purification.	73
d) Limitation de la dégradation du SEDB au stockage.....	75
I-2. Caractérisations du SEDB.	76
I-3. Synthèse du SCBDB.....	78
I-4. Conclusion.....	80
II. Validation de la stratégie de synthèse de dithioesters-ligands.	81
II-1. Compétition amidation/thioamidation.....	81
a) Cas des dithioesters-acides carboxyliques	81
b) Cas du SEDB : synthèse de la MEDBA (dithioester-ligand modèle)	82
c) Cas du SCBDB.....	85
d) Conclusion sur la synthèse de dithioesters fonctionnels à partir de dithioesters précurseurs.....	85
II-2. Purification de la MEDBA.....	86
II-3. Caractérisation de la MEDBA.....	87
II-4. Conclusion : récapitulatif des conditions optimales de synthèse.	88
III. Synthèse et caractérisation de dithioesters-ligands d'intérêt biologique.	89
III-1. Synthèse d'un dithioester-biotine (BEDBA).	89
III-2. Synthèse d'un dithioester-sucre (SEDDBA).	91
III-3. Synthèse d'un dithioester-lipide (LEDDBA).	92
III-4. Effet de l'utilisation combinée de SEDB dégradé et de triéthylamine.	95
a) Identification du problème.....	95
b) Analyse par spectrométrie de masse MALDI-ToF.....	95
c) Origine de la LTPA.....	97
III-5. Caractérisation des dithioesters-ligands.....	100
III-6. Conclusion.....	101
IV. Conclusion du chapitre 2.....	102
Tableau récapitulatif des synthèses de dithioesters-ligands.....	104
V. Partie expérimentale.....	105
V-1. Synthèse des agents RAFT.....	105
a) Synthèse du SEDB.....	105
b) Synthèse du SCBDB.....	106
c) Synthèse des dithioesters-ligands.....	107
V-2. Caractérisation.....	109
a) Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	109
b) Spectrométrie de masse MALDI-ToF.....	113
c) Analyse élémentaire et spectrométrie de masse FAB.....	114
Références du chapitre 2.....	115

Introduction : Stratégie de synthèse.

La stratégie de synthèse d'un composé organique dépend en général de la structure visée. La structure des agents de contrôle d'une polymérisation de type RAFT (nommés « agents RAFT » par la suite) est généralement conçue pour assurer une bonne efficacité du contrôle de la polymérisation d'un monomère donné. Ainsi, cette structure répond aux critères imposés par le mécanisme général de la polymérisation de type RAFT (Schéma 1) : l'addition des premiers oligomères formés (ou des radicaux primaires) sur l'agent RAFT conduit à la formation d'un radical intermédiaire (**I**). Sa fragmentation du « bon » côté génère une chaîne dormante et un radical R° . Ce transfert du radical constitue l'étape de pré-équilibre qui co-existe avec les autres étapes tant que l'agent RAFT n'est pas totalement consommé. Les radicaux R° amorcent de nouvelles chaînes (étape de ré-amorçage). Parallèlement, les chaînes dormantes, qui portent une fonction thio-carbonylthio, subissent également l'addition de chaînes actives, ce qui permet l'établissement d'un équilibre entre ces deux types de chaînes via le passage par un radical intermédiaire (**II**) (équilibre principal).

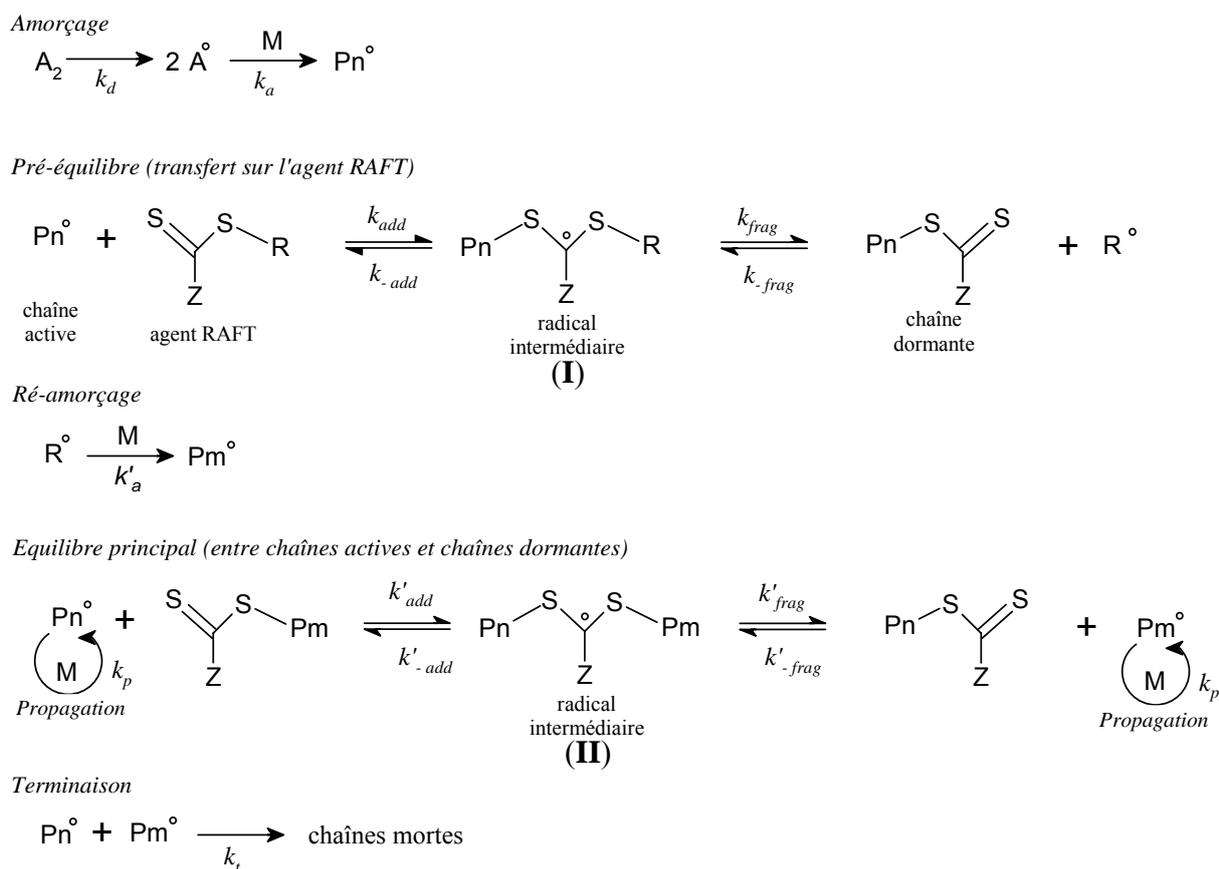


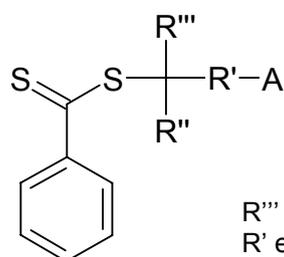
Schéma 1 : Mécanisme général de la polymérisation par le procédé RAFT.

Ainsi, un choix adéquat de la nature des groupements R et Z de l'agent RAFT est primordial pour le bon déroulement des étapes propres au procédé RAFT, que sont le pré-équilibre, l'étape de ré-amorçage et l'équilibre principal.

D'après les études fondamentales sur le procédé RAFT compilées dans trois revues récentes¹⁻³, le groupement Z doit activer la double liaison C=S pour favoriser l'étape d'addition (augmentation de k_{add}) sans trop stabiliser le radical intermédiaire ce qui nuirait à l'étape de fragmentation. La vitesse de ces étapes d'addition et de fragmentation dépend également de la nature des chaînes actives, Pn° , donc de la nature du monomère. La famille des dithioesters ($Z =$ groupe alkylaryle, aryle,...) offre un très bon compromis pour une large gamme de monomères, particulièrement dans le cas des dithiobenzoates ($Z = Ph$) qui représentent le type d'agents RAFT le plus communément utilisé.³

Le groupement R doit à la fois être un bon groupe partant pour favoriser la fragmentation du radical intermédiaire (**I**) du côté souhaité et avoir la capacité d'amorcer de nouvelles chaînes. De ce fait, les agents RAFT conduisant à l'expulsion d'un fragment radical primaire sont généralement peu efficaces, à moins qu'ils ne portent un substituant stabilisant.³

Ainsi, un agent RAFT fonctionnalisé (par A) est potentiellement efficace pour une large gamme de monomères s'il correspond à la structure ci-dessous (Schéma 2) : la nature du fragment radical expulsé est secondaire ($R'''=H$) ou tertiaire ($R'''=$ substituant carboné).



$R''' = H$ ou substituant carboné (alkyle, aryle,...)
 R' et R'' : substituant carboné (alkyle, aryle,...)

Schéma 2 : Structure d'un dithiobenzoate fonctionnalisé potentiellement efficace en polymérisation de type RAFT (c-a-d dithiobenzoate « secondaire » ou « tertiaire »)

L'introduction de l'entité d'intérêt (A) dans une telle structure peut être réalisée selon deux voies générales de synthèse :

- 1- *Synthèse du dithioester à partir du composé d'intérêt* : Cela implique souvent une modification chimique de ce dernier. Exemples : introduction d'une fonction polymérisable⁴ (cf. chapitre 1, p.54), modification en composé halogéné pour une synthèse de type Grignard^{5,6} (cf. chapitre 1, p.56). Cette stratégie de synthèse ne limite pas le type de chimies possibles mais implique, en pratique, la mise en oeuvre d'une synthèse adaptée à chaque composé d'intérêt différent que l'on souhaite introduire au sein de l'agent RAFT.
- 2- *Synthèse d'un dithioester précurseur possédant une fonction réactive puis couplage avec le composé d'intérêt* : Cette voie a l'avantage pratique de permettre un changement de composé d'intérêt sans repasser par des étapes - parfois fastidieuses - de synthèse organique*. Cependant la nature de la fonction réactive du précurseur limite les possibilités de réactions de couplage. Une autre limitation d'importance est la nécessité de conserver la fonction dithioester au cours du couplage. Ainsi, bien que de nombreux composés d'intérêt peuvent se présenter sous la forme d'un dérivé aminé (notamment les ligands d'intérêt biologique), l'utilisation d'amine est très peu recommandée compte tenu du risque très important d'aminolyse des dithioesters,⁷ à moins de se contenter d'un

* Cela est d'autant plus avantageux lorsque le composé d'intérêt est une molécule « fragile » ne supportant pas tout type de conditions réactionnelles.

mélange de produits⁸ (cf. chapitre 1, p.49). Dans la plupart des travaux qui utilisent un agent RAFT précurseur, le composé d'intérêt porte une fonction hydroxyle et est couplé au précurseur portant une fonction acide carboxylique. Dans ce cas, l'hydroxyle n'est pas réactif vis-à-vis du dithioester. Cependant, la liaison formée est de type ester, liaison relativement fragile car potentiellement hydrolysable. L'utilisation de dithioesters précurseurs tolérant l'utilisation de composés aminés en vue de la formation d'une liaison stable de type amide serait donc très intéressante. Les dithioesters suivants (Schéma 3) ont alors été imaginés pour tenter de répondre à cette exigence :

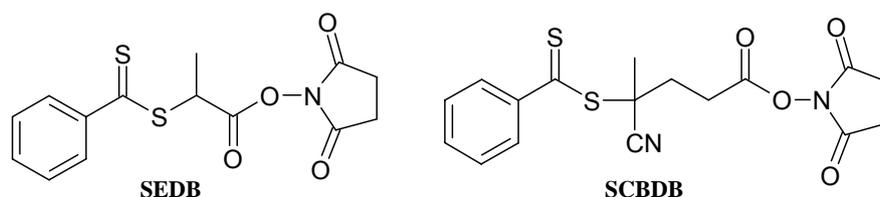


Schéma 3 : Structure des dithiobenzoates précurseurs synthétisés.

Le fragment radical R° libéré au cours du mécanisme RAFT en présence de ces dithioesters est respectivement secondaire et tertiaire, ce qui est *a priori* gage d'une bonne efficacité. Mais leur principale particularité est la présence d'une fonction N-oxysuccinimide (ester activé) très réactive vis-à-vis des fonctions amines primaires. Cette réactivité est espérée être plus importante que celle de la fonction dithioester afin d'éviter la formation de produits indésirables. Cela permettrait également de limiter la perte de composé d'intérêt (parfois onéreux) et de simplifier d'éventuelles étapes de purification.

Avant de vérifier les propriétés de ces deux dithiobenzoates, il a bien sûr fallu les synthétiser. C'est le sujet de la première partie de ce chapitre. Après avoir pris soin de valider la stratégie de synthèse d'agents RAFT fonctionnels à partir de ces précurseurs et d'un composé modèle (2^{ème} partie), la synthèse de dithioesters porteurs de ligands d'intérêt biologique a été effectuée (3^{ème} partie).

I. Synthèse des dithioesters précurseurs.

I-1. Synthèse du SEDB.

Parmi les deux précurseurs synthétisés, le SuccinimidoxycarbonylEthyIDithioBenzoate (SEDB) a été le dithiobenzoate le plus étudié durant ce travail de thèse.

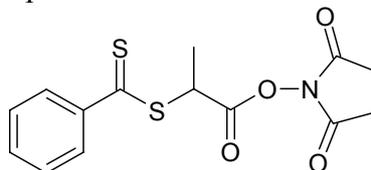


Schéma 4 : Structure du SuccinimidoxycarbonylEthyIDithioBenzoate (SEDB)

a) Principe de la synthèse.

La synthèse du SEDB comporte deux étapes principales brièvement schématisées ci-après. Elles sont réalisées sous atmosphère inerte (argon) :

- *Etape 1* : Synthèse du CAEDB (Carboxylic Acid EthyIDithioBenzoate)

Cette synthèse a été décrite par D'Agosto *et al.*⁹. Il s'agit d'une réaction de type Grignard : insertion du disulfure de carbone dans la liaison carbone-métal d'un phényl magnésien, puis *in-situ*, substitution nucléophile avec l'acide 2-bromopropanoïque.

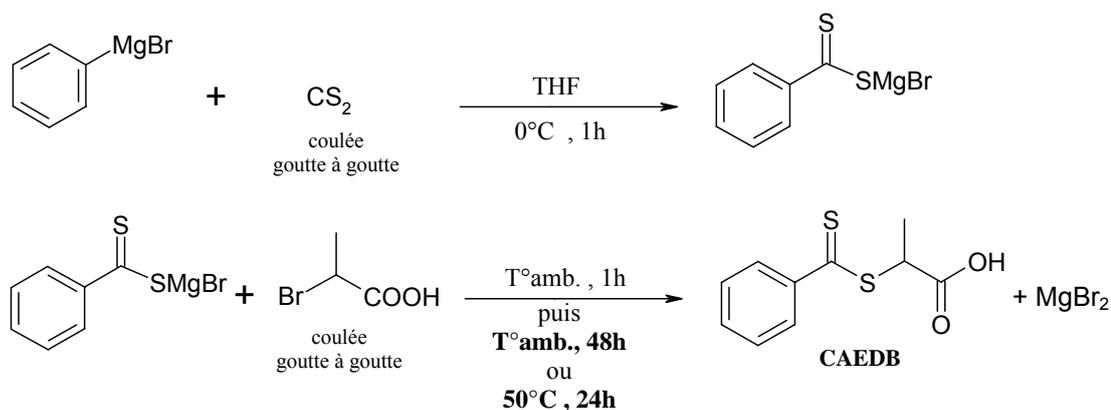


Schéma 5 : Première étape de la synthèse du SEDB

Après acidification du milieu réactionnel à l'aide d'acide chlorhydrique concentré, la phase organique est extraite à l'acétate d'éthyle ou au dichlorométhane. Le produit brut obtenu est un produit rouge foncé très visqueux. Il peut être semi-cristallisé en cas de séchage prolongé sous vide. Après purification par chromatographie sur gel de silice, le CAEDB pur obtenu est un produit rouge, cristallisé. Le rendement de cette étape est d'environ 50%.

- *Etape 2* : Activation de l'acide carboxylique par le NHS :

La formation de l'ester activé est réalisée par couplage entre l'acide carboxylique et la N-hydroxysuccinimide (NHS) en présence de l'agent activateur N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC).

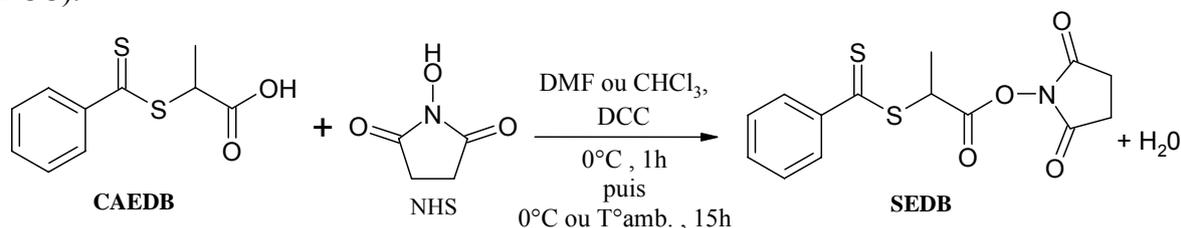


Schéma 6 : Deuxième étape de la synthèse du SEDB

En fin de réaction, une grande partie de la dicyclohexylurée (DCU) formée est éliminée par filtration. En comparaison avec d'autres solvants (dichlorométhane, acétone), les reprises dans l'acétate d'éthyle semblent être le moyen le plus efficace pour éliminer la DCU résiduelle. Après séchage, le SEDB obtenu est un produit très visqueux rouge orangé. Le rendement de cette étape est d'environ 97%.

b) Essais d'amélioration des conditions de synthèse.

- *Etape 1* : La substitution nucléophile voulue repose sur l'attaque, par le soufre lié au magnésien, du carbone électrophile en position α du brome. Cependant, l'acide 2-bromopropanoïque possède également un proton acide qui pourrait facilement s'échanger avec le magnésien (réaction acide/base). Ces deux possibilités réactionnelles (Schéma 7) peuvent expliquer le rendement modeste ($\sim 50\%$) de la synthèse du CAEDB.

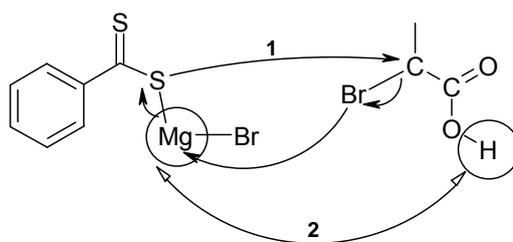


Schéma 7 : Deux possibilités réactionnelles entre PhCS₂MgBr et l'acide 2-bromopropanoïque (1 = attaque nucléophile ; 2 = réaction acide/base)

Remarques sur des stratégies de synthèse alternatives:

1- L'activation préalable de l'acide 2-bromopropanoïque par le NHS ne permet pas une augmentation du rendement de synthèse*. Dans ce cas, il n'y a plus de proton acide qui détruit une partie du magnésien mais il y a désormais un deuxième carbone électrophile. Il y a donc deux possibilités d'attaque nucléophile (Schéma 8).

* F. D'Agosto, résultats internes

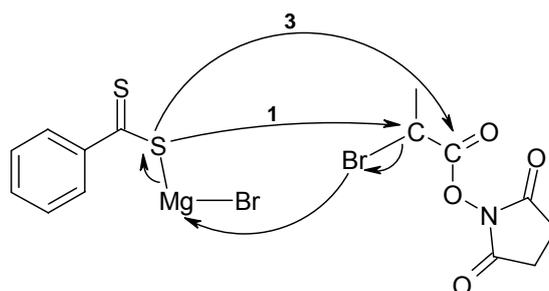


Schéma 8 : Deux possibilités d'attaque nucléophile sur l'acide 2-bromopropanoïque activé par le NHS.

2- Pour éviter cette attaque compétitive, il serait possible de faire réagir au préalable un composé aminé d'intérêt sur l'acide 2-bromopropanoïque activé par le NHS, afin de former un composé d'intérêt bromé portant une liaison amide stable. Avec cet ordre de réaction, la stratégie de synthèse évite la réaction non désirée (attaque nucléophile sur le carbone en α du brome), mais elle perd les avantages liés à l'utilisation d'un dithioester précurseur. Cet ordre de synthèse a en particulier été utilisé par le groupe de Mc Cormick^{10,11} pour la synthèse de divers agents RAFT solubles en milieu aqueux.

Une première synthèse de CAEDB a été réalisée selon les conditions expérimentales précédemment décrites⁹ : réaction à température ambiante pendant 48 heures. A l'occasion d'une seconde synthèse et afin d'étudier l'effet de la température (et son éventuel effet sur la formation des impuretés), le milieu réactionnel a été chauffé à 50°C. L'introduction du bromoacide s'effectue tout de même à température ambiante et le milieu réactionnel est laissé pendant 1 heure à cette température avant le chauffage. La Figure 1 présente la comparaison des spectres RMN ¹H des produits obtenus après l'étape d'extraction. Malheureusement, cette extraction n'ayant pas été réalisée avec le même solvant (acétate d'éthyle ou dichlorométhane), la quantité plus importante d'impuretés dans le deuxième essai ne peut pas être attribuée avec certitude à un effet de la température de réaction. En effet, le taux de formation d'impuretés est peut-être identique aux deux températures, mais l'extraction à l'acétate d'éthyle en éliminerait plus que celle au dichlorométhane.

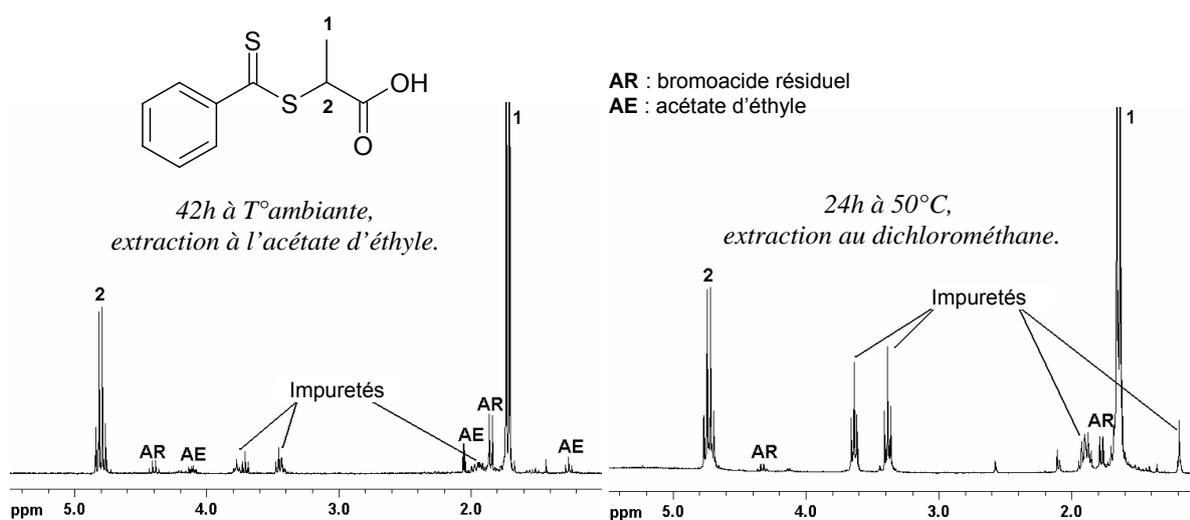


Figure 1 : Comparaison des spectres RMN ¹H (CDCl₃, zone 1 à 5,5 ppm) des produits obtenus après extraction lors de la synthèse du CAEDB.

Cependant, des analyses par RMN ^1H de prélèvements bruts de synthèse (sans extraction) ont indiqué que la réaction désirée est relativement rapide à température ambiante et semble avoir lieu avant la formation des impuretés : un prélèvement à 45 min (après le début de l'introduction du bromoacide) indique un taux d'avancement de 70% sans la formation apparente d'impuretés. En revanche, celles-ci semblent être majoritaires dans les prélèvements effectués après 18h ou 23h de chauffage à 50°C. Une telle proportion d'impuretés après la formation du produit souhaité, semble soutenir l'hypothèse de l'apparition d'une partie des impuretés par « dégradation » du CAEDB dans le cas de longues durées de réaction.

Ainsi, il semble possible d'éviter (ou du moins de limiter) la formation d'impuretés en travaillant à température ambiante et en réduisant la durée de réaction à environ une heure. Seuls les résidus de réactifs seraient alors à éliminer par une étape de chromatographie sur gel de silice. Malheureusement, l'occasion de tester ces nouvelles conditions expérimentales ne s'est pas présentée.

- *Etape 2* : Deux améliorations pratiques ont été effectuées durant la seconde synthèse. Ainsi, le remplacement du DMF par du chloroforme permet un séchage du produit plus aisé. De plus, la réaction est laissée à température ambiante (et non 0°C) durant une nuit. Ces deux modifications n'altèrent pas le rendement de cette étape.

c) Purification.

- *Purification du SEDB* : Il est possible d'activer le CAEDB sans purification préalable. Cependant, la purification ultérieure du SEDB par chromatographie sur gel de silice s'est avérée être impossible pour cause de dégradation du produit sur la silice. Cette dégradation est progressive et empêche ainsi la récupération d'une fraction de SEDB pur. Il a été vérifié que la nature de l'éluant n'était pas la cause de cette dégradation. Pour vérifier si l'acidité de la silice pouvait jouer un rôle, un test de purification sur gel de silice préalablement neutralisé par de la triéthylamine a été réalisé ; cela n'a pas évité la dégradation. La cause précise de cette dégradation du SEDB sur silice n'a pu être déterminée. Pour s'affranchir de cette étape, il est donc préférable de purifier au mieux le CAEDB.
- *Purification du CAEDB* : le CAEDB peut être purifié par chromatographie sur gel de silice de manière classique, avec comme éluant un mélange acétate d'éthyle/ éther de pétrole (60/40 v/v), ce qui permet de récupérer un produit très pur. Cependant, comme la plupart des produits acides, le CAEDB et l'acide bromopropanoïque ont une forte tendance à traîner dans les colonnes de silice. Ainsi, les résidus d'acide bromopropanoïque ne sont pas toujours correctement éliminés par cette méthode.⁹ Dans le cas de notre purification, de nombreuses fractions qui contenaient du CAEDB en mélange avec une ou plusieurs impuretés ont été systématiquement exclues. Ceci a bien-sûr eu un impact non négligeable sur le rendement final de synthèse.

Afin de concilier les exigences souvent contradictoires de pureté et de rendement de synthèse, nous avons cherché un système d'éluants qui assure une meilleure séparation des différents produits. D'après des tests préliminaires par chromatographie sur couche mince (CCM), le chloroforme pur semble être un bon candidat puisqu'il assure une migration très rapide de toutes les impuretés, y compris l'acide bromopropanoïque, alors que le CAEDB migre très peu. Ce dernier migre en revanche très bien avec un mélange acétone/chloroforme ou avec l'acétone pur. Malgré cela, la mise en œuvre d'une purification sur colonne, avec

changement d'éluant après la récupération de toutes les impuretés (l'acide bromopropanoïque se trouvant dans les fractions de tête de colonne), nous a réservé quelques surprises :

- Les premières fractions récupérées, qui représentent plus de la moitié en masse du produit déposé, contiennent du CAEDB en mélange avec des impuretés !
- Apparition d'un précipité rosé dans les fractions suivantes qui ne contiennent que du CAEDB pur. Cette formation de précipité est accentuée par conservation de ces fractions au congélateur pendant une nuit !
- Malgré l'utilisation d'acétone qui d'après les CCM fait très bien migrer le CAEDB, les dernières fractions récupérées sont quasiment incolores alors que la colonne reste relativement bien rosée.
- Une seconde purification (avec les mêmes éluants) de la fraction contenant le mélange (CAEDB+impuretés) a présenté exactement les mêmes surprises (c-a-d les trois points ci-dessus) !

Le précipité rosé n'est soluble dans aucun solvant usuel excepté dans le DMSO. La formation de ce précipité dans la colonne expliquerait l'inefficacité de l'acétone à le faire migrer. De manière très surprenante, une analyse par RMN dans du DMSO deutéré indique qu'il s'agit de CAEDB quasiment pur ! Enfin, un traitement à l'acide chlorhydrique permet de lui faire retrouver sa solubilité normale. Il semblerait donc que la silice ait la capacité, dans un solvant peu polaire (chloroforme), de créer une forme « insoluble » du CAEDB. Comme il est difficile d'imaginer quel pourrait être le contre-ion d'une éventuelle forme carboxylate COO^- dans ces conditions, la possibilité d'une forme « sel » a été exclue. Pour tenter d'expliquer cette insolubilité, la formation de liaisons hydrogène intra- ou inter-moléculaires a été envisagée (Schéma 9). Si l'établissement d'une liaison hydrogène entre l'oxygène du carbonyle et une molécule de solvant est nécessaire à la solubilisation du CAEDB dans les solvants usuels, la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire ou intermoléculaire engageant cet oxygène pourrait expliquer la perte de solubilité observée. Seuls les solvants capables de rompre les liaisons hydrogènes (eau acide, DMSO,...) pourraient alors solubiliser le CAEDB sous forme « insoluble ».

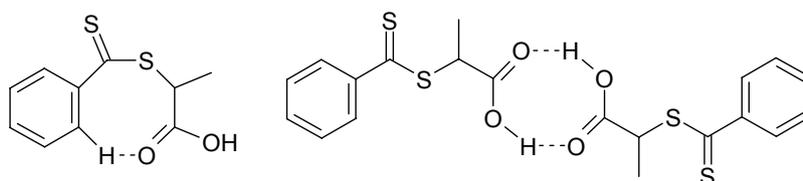


Schéma 9 : Liaison hydrogène intra- ou inter-moléculaire supposée du CAEDB sous la forme « insoluble ».

Une masse de CAEDB correspondant à près du quart de la masse de produit brut déposée a pu être récupérée *via* cette forme « insoluble ». L'astuce a consisté à traiter à l'acide la silice restée rosée : après un séchage complet (plusieurs jours), elle est introduite dans un mélange biphasique dichlorométhane/acide chlorhydrique concentré. Après agitation vigoureuse puis filtration, on récupère de la silice blanche et une phase organique contenant du CAEDB quasiment pur.

Par ailleurs, la récupération, même après la deuxième colonne, d'un mélange (CAEDB+impuretés) est très surprenante puisque les migrations sur CCM semblaient montrer une séparation optimale. Il est très probable que cela soit dû à un phénomène d'éluion différentielle. Ce phénomène a généralement lieu lorsque le produit déposé sur la silice contient une quantité non négligeable d'un solvant autre que le solvant d'éluion. Ce solvant peut entraîner avec lui une partie du produit à purifier ce qui rend son éluion non uniforme. Ici, de nombreux détails expérimentaux laissent penser que le rôle de ce solvant perturbateur

serait joué par une des impuretés dont les quantités sont loin d'être négligeables (cf. spectre RMN de droite de la Figure 1, p.72).

Ainsi, suite à ces quelques complications inattendues, l'objectif d'augmenter le rendement de synthèse par l'optimisation du rendement de purification n'a pas été atteint. Cependant, l'utilisation de chloroforme comme éluant de chromatographie sur gel de silice semble intéressante dans le cas où le produit brut ne contiendrait que très peu d'impuretés perturbatrices de l'éluion. Or, ceci semble possible conformément aux conditions précédemment envisagées (synthèse à température ambiante pendant seulement une heure, cf. p.73).

d) Limitation de la dégradation du SEDB au stockage

Un des intérêts du SEDB est qu'il s'agit d'un dithioester précurseur réactif mais stable* qui peut être gardé tel quel pendant une longue durée. Pour cela, il est tout de même conservé sous atmosphère inerte (argon ou azote) à -20°C . Cependant, une dégradation du SEDB au stockage a été observée dans certains cas :

- La présence d'impuretés de synthèse semble accélérer cette dégradation (action catalytique ?). En effet, une dégradation importante et rapide (~ 3 mois) a été observée pour du SEDB synthétisé par activation de CAEDB non préalablement purifié.
- La dégradation d'un premier lot de SEDB pur a été observée après 6 mois de conservation. Lors des fréquents prélèvements de produit, il est possible que la remise sous atmosphère inerte ait parfois été déficiente.

Bien qu'il soit difficile d'identifier par RMN ^1H l'ensemble des produits de dégradation, une libération importante de NHS est clairement visible. La fonction ester activé est donc détruite.

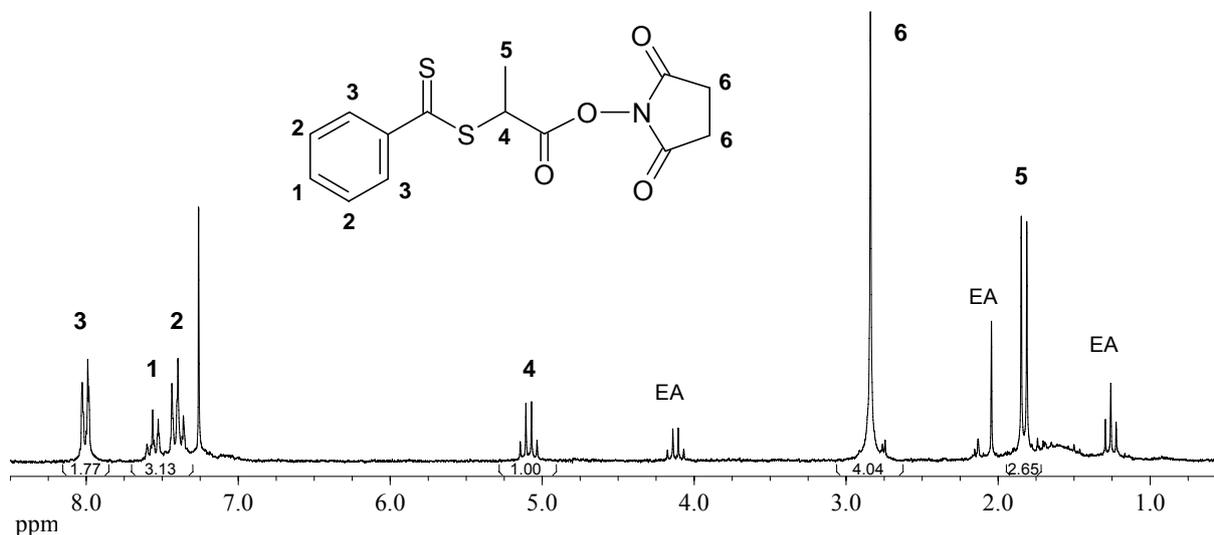
Par une attention plus rigoureuse et systématique concernant la remise sous azote, le deuxième lot de SEDB n'a pas montré de signe de dégradation après 5 mois d'utilisation. Or, celui-ci contenait des traces relativement importantes de DCU. Il semble donc que cette impureté soit inerte vis-à-vis du processus de dégradation du SEDB.

L'utilisation de CAEDB bien purifié et une remise systématique du SEDB sous atmosphère inerte, sont donc *a priori* deux éléments essentiels pour assurer une très bonne stabilité du SEDB au stockage (à -20°C).

* en comparaison avec un chlorure d'acyle par exemple.

I-2. Caractérisations du SEDB.

Le SEDB a été analysé par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN ^1H) dans du chloroforme deutéré (CDCl_3) (Figure 2).



δ (ppm, 300K, CDCl_3): 1,82 (d, H_5); 2,83 (s, H_6); 5,09 (q, H_4); 7,40 (dd, H_2); 7,56 (dd, H_1); 8,01 (d, H_3).

Figure 2 : Spectre RMN ^1H du premier lot SEDB [EA = acétate d'éthyle]

Ce spectre montre la présence d'impuretés en quantité négligeable et cela malgré l'impossibilité de purification par chromatographie sur gel de silice. Seul le solvant résiduel (acétate d'éthyle) est en quantité relativement importante. Le SEDB étant un produit très visqueux, il piège aisément des molécules de solvant malgré le séchage sous vide. En considérant que ce solvant constitue la seule « impureté », la pureté massique du produit peut être estimée à environ 93%.

Le spectre du second lot de SEDB est similaire, si ce n'est que les pics correspondant au solvant résiduel sont remplacés par un petit pic d'acétone et par des massifs correspondant à de la DCU. En effet, l'acétate d'éthyle n'a pas été utilisé durant la seconde étape, avec pour conséquence une élimination moins efficace de cette impureté. Les impuretés majoritaires étant identifiées, la pureté massique de ce lot a été estimée à 90%.

La pureté massique estimée par RMN est celle qui a été utilisée ultérieurement pour l'ajustement de la stœchiométrie au cours des synthèses de dithioesters-ligands (considérée comme une valeur de pureté massique minimale). De la sorte, le SEDB se trouvait en pratique en léger excès, ce qui est une condition nécessaire pour un rendement de réaction optimal (cf. § I-4, p. 80).

Ce n'est que plus tard que les résultats d'analyses élémentaires du deuxième lot de SEDB ont indiqué une pureté massique de 97% (cf. Tableau 1 et Annexe 1, p.225 pour la méthode de calcul).

Tableau 1 : Résultats de l'analyse élémentaire du SEDB

$C_{14}H_{13}N_1O_4S_2$	C	H	N	S
% théorique	52,00	4,05	4,33	19,83
% mesuré	50,25	4,15	4,07	18,58

De plus, une caractérisation par spectrométrie de masse a été tentée. Dès l'analyse basse résolution en ionisation de type Electrospray, la fragmentation totale du SEDB empêche la détermination de sa masse moléculaire. Seuls des fragments (de masse inférieure à celle du SEDB) ou, plus surprenant encore, des recombinaisons de fragments avec le SEDB (de masse supérieure) sont identifiables (cf. Annexe 2, p.228 pour plus de détails sur les structures visualisées).

Enfin, pour une caractérisation complète, le SEDB a également été analysé par RMN ^{13}C (Figure 3) :

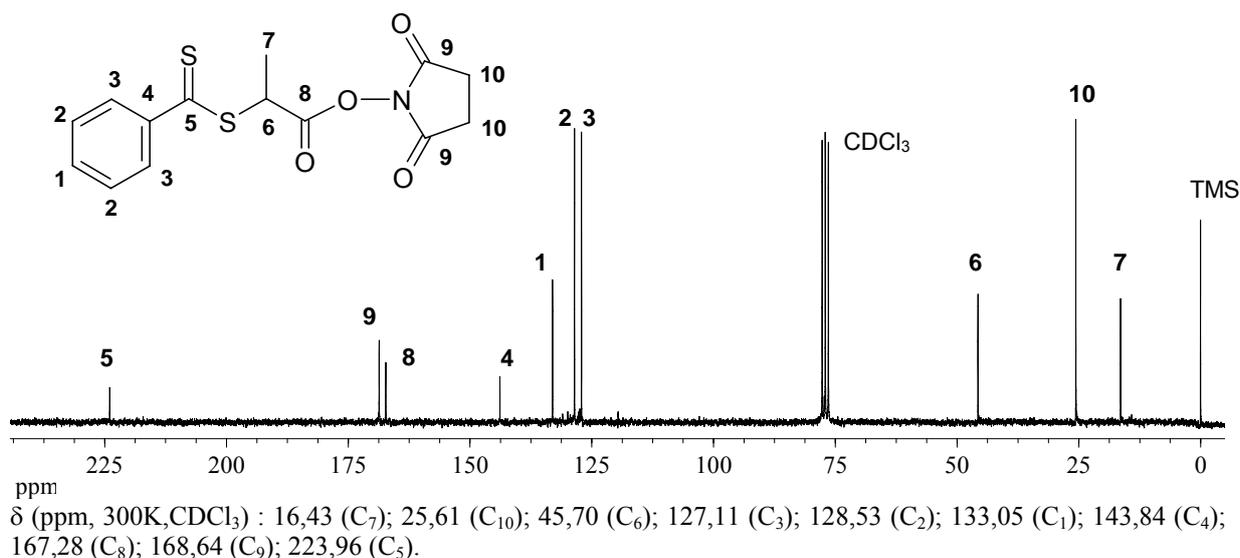


Figure 3 : Spectre RMN ^{13}C du SEDB

Les quelques impuretés visibles sur le spectre de RMN 1H ne le sont plus ici en raison d'une sensibilité plus faible de la résonance du carbone 13. On peut noter que le déplacement chimique du carbone du thiocarbonyle (carbone 5) est particulièrement élevé (223,96 ppm).

I-3. Synthèse du SCBDB.

Le groupe R du SEDB génère un fragment radical secondaire au cours du mécanisme de polymérisation RAFT. Ainsi, il s'agit d'un dithioester potentiellement efficace pour la polymérisation contrôlée des dérivés acrylate et acrylamide. En revanche, sa structure est moins adaptée pour la polymérisation de monomères plus substitués tels que les méthacrylates.³ Ainsi, la synthèse d'un analogue du SEDB générant un fragment radical tertiaire a été envisagée.

La voie de synthèse de type Grignard ne peut pas être transposée pour ce type d'agent RAFT : l'utilisation de l'acide 2-bromo-2-méthylpropanoïque ne conduit pas au composé visé*. La présence d'un groupement donneur (méthyle) réduit l'électrophilie du carbone en α du brome ce qui rend la réaction secondaire (réaction acide base) prépondérante¹² (Schéma 10).

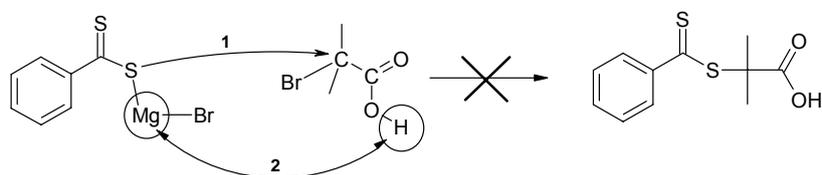


Schéma 10 : Réaction acide/base (2) prépondérante entre PhCS_2MgBr et l'acide 2-bromo-2-méthylpropanoïque.

La stratégie de synthèse des dithioesters « tertiaires » a été proposée par Thang *et al.*¹² : il s'agit d'une addition sur un disulfure de bis(thiocarbonyle) de radicaux issus de composés azo. Pour le type de structure visée, le composé azo commercial approprié est le 4,4'-azobis(acide 4-cyanopentanoïque) (ACPA, cf. Schéma 12-étape 2R). Le protocole décrit par Sprong *et al.*¹³ a été suivi pour la synthèse du disulfure de dithiobenzoyle.

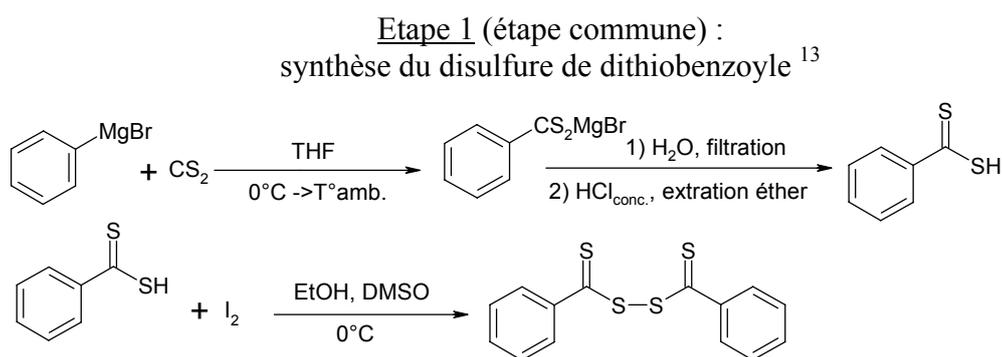
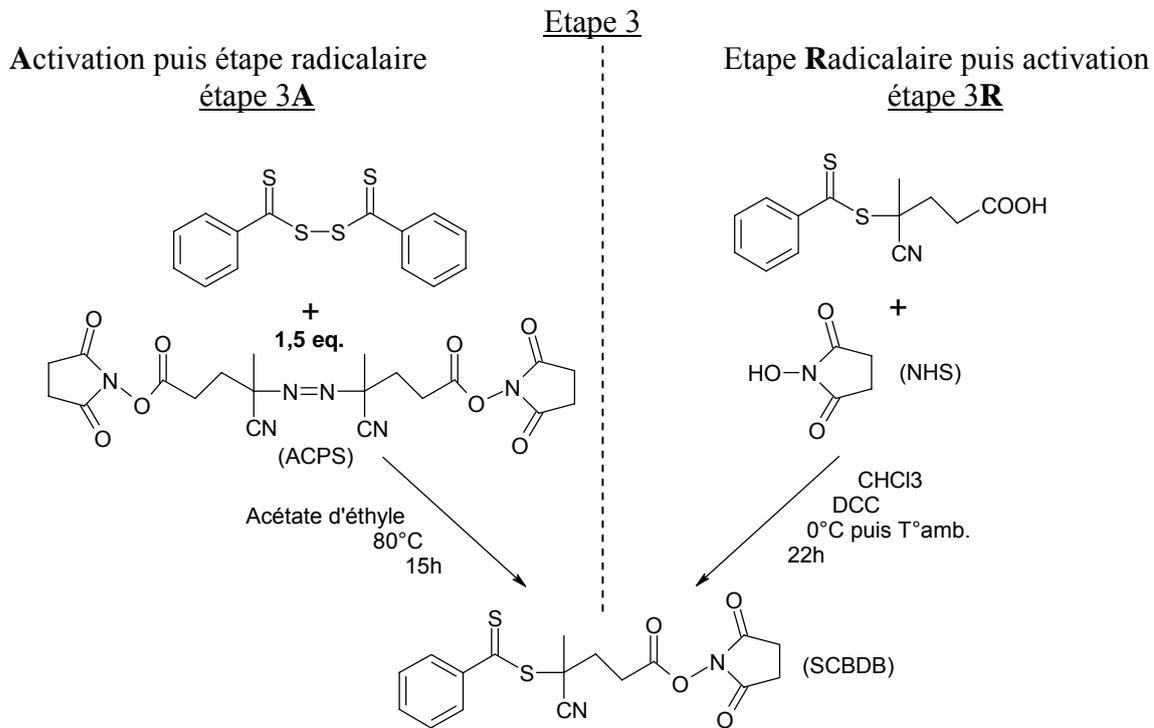
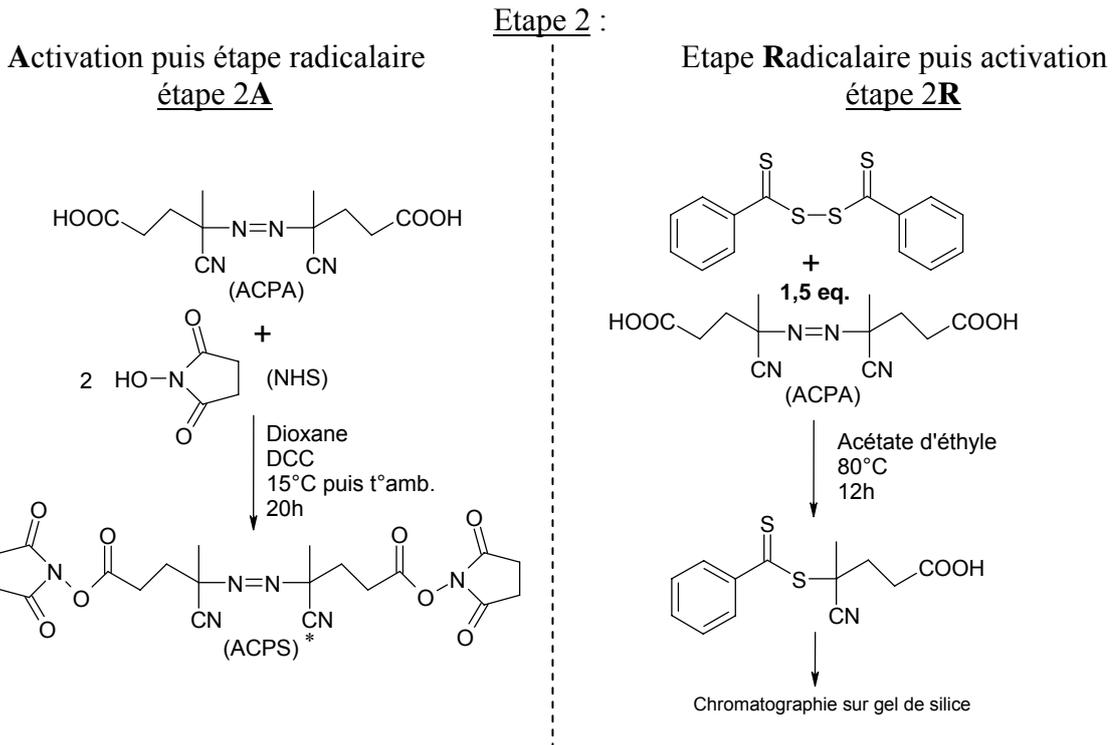


Schéma 11 : Schéma de synthèse du SCBDB (1^{ère} étape)

Ainsi, deux voies de synthèse, en trois étapes chacune, ont été testées pour la synthèse du SuccinimidoxycarbonylCyanoButylDithioBenzoate (SCBDB) (cf. Schéma 11 et Schéma 12) :

* F. D'Agosto, résultats internes

Schéma 12 : Schéma de synthèse du SCBDB (2^{ème} et 3^{ème} étape)

* ACPS synthétisé par A. Favier (A. Favier, M-T. Charreyre ; résultats internes)

Quelque soit l'ordre de synthèse, l'obtention du SCBDB a été vérifiée par RMN ^1H . Cependant, la voie « étape radicalaire puis activation » semble plus intéressante : comme l'étape de réaction radicalaire nécessite 1,5 équivalents de composé azo en raison des possibilités de recombinaison des fragments radicalaires entre eux, il est plus judicieux de perdre une partie d'ACPA commercial qu'une partie d'APCS préalablement synthétisé. De plus, la possibilité d'utiliser un dithioester portant une fonction acide carboxylique très pur (purifié par chromatographie sur gel de silice) permet d'obtenir, après l'étape d'activation, un SCBDB qui ne requiert pas d'autre purification sur gel de silice. Remarquons néanmoins que l'élimination de la DCU par des reprises à l'acétate d'éthyle est moins efficace que dans le cas du SEDB. En effet, le SCBDB semble moins soluble dans ce solvant que ne l'est le SEDB. [RMN ^1H du SCBDB : cf. p.107]

Une purification par chromatographie sur gel de silice du SCBDB n'avait pas été envisagée dans un premier temps par crainte d'une dégradation similaire à celle observée avec le SEDB (cf. p. 73). Cependant, il semble que cette crainte ne soit pas justifiée. En effet, Q. Zheng et C-Y. Pan, qui ont à la même période synthétisé du SCBDB par la voie « étape radicalaire puis activation », ont décrit sa purification sur gel de silice sans reporter de dégradation (éluant : acétate d'éthyle/hexane, 1:4, v:v, rendement de purification ~91%).¹⁴

Le SCBDB n'a pas été utilisé dans la suite de ce travail de thèse, mais il est inclus dans une demande de brevet protégeant les agents RAFT portant une fonction ester activé ainsi que leurs dérivés.¹⁵ De plus, au sein du laboratoire, d'autres utilisateurs ont permis de confirmer qu'il est un agent RAFT efficace.

I-4. Conclusion

La synthèse de dithioesters précurseurs portant une fonction ester activé est possible selon deux voies. L'une permet de synthétiser des dithioesters dits « tertiaires » (ex.: SCBDB) alors que l'autre est limitée aux dithioesters dits « secondaires » (ex.: SEDB). Cette deuxième voie, basée sur des réactions de type Grignard, a été la plus étudiée : le rendement final du SEDB est d'environ 45% (1^{ère} étape limitante) ; des pistes sérieuses d'optimisation ont été proposées.

Quelle que soit la voie de synthèse, le SEDB et le SCDDDB constituent des dithioesters précurseurs stables lorsqu'ils sont stockés sous atmosphère inerte à -20°C .

La fonction ester activé a été introduite dans la structure de ces agents RAFT dans l'espoir qu'elle soit plus réactive envers une amine primaire que ne l'est la fonction dithioester. Cela a été vérifié dans la suite de cette étude.

II. Validation de la stratégie de synthèse de dithioesters-ligands.

La stratégie de synthèse de dithioesters-ligands passe par la fonctionnalisation du dithioester précurseur SEDB. Comme le montrent les exemples de la littérature (cf. §III-3 du chapitre 1, p.48), l'utilisation d'un composé hydroxylé ne poserait aucun problème, mais la liaison formée serait de type ester, donc potentiellement hydrolysable. Ce risque d'hydrolyse peut cependant être réduit dans des conditions de pH appropriées.

Le but de ce travail de thèse est, entre autres, la mise au point d'une nouvelle stratégie de synthèse de polymères α -fonctionnels de masses molaires contrôlées. Mais au-delà de cet objectif, une application potentielle de ces polymères réside par exemple dans des dispositifs de diagnostic biologique. Or, dans de tels dispositifs, la capture et la détection des espèces recherchées ont généralement lieu en milieu aqueux dont le pH est choisi en fonction de contraintes biologiques (milieu physiologique pH~7,5). Il serait dommage qu'à ce pH les polymères α -fonctionnels synthétisés ne soient pas stables dans la durée. Ainsi, la présence d'une liaison stable de type amide entre le composé d'intérêt et la chaîne polymère est une condition nécessaire pour s'affranchir d'une incompatibilité potentielle du polymère avec l'application envisagée. Cela implique la modification du dithioester précurseur à l'aide d'un composé aminé.

II-1. Compétition amidation/thioamidation.

a) Cas des dithioesters-acides carboxyliques

Dans la littérature, l'utilisation de composés aminés pour le couplage avec des dithioesters précurseurs a été extrêmement freinée par la grande fragilité de ces derniers en présence d'amines primaires. Par exemple, conscients de la fragilité de la liaison ester dans des applications nécessitant l'utilisation d'une base ou d'un acide, Chen *et al.*¹⁶ ont envisagé la formation d'une liaison amide beaucoup plus stable. Cependant, ils soulignent la réaction d'aminolyse compétitive du dithioester par la fonction amine (Schéma 13), qui induit une forte diminution du rendement de couplage entre un agent RAFT portant une fonction acide carboxylique et un composé aminé.

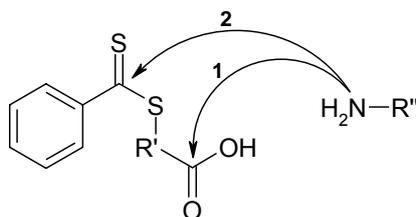


Schéma 13 : Compétition amidation (1) / thioamidation (2) dans le cas d'un dithioester porteur d'une fonction acide carboxylique.

Plus récemment, ten Cate *et al.*⁸ ont tenté de limiter la réaction secondaire en réalisant l'activation préliminaire *in situ* de l'acide carboxylique par la N,N' -dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Malgré l'optimisation des conditions de réaction, leur meilleur résultat est un mélange de 76% du composé souhaité avec 24% de produit issu de la réaction de thioamidation.

Ces deux exemples ne font que confirmer les conclusions de travaux relativement anciens de M. Delêtre et G. Levesque⁷ : « Les amines primaires aliphatiques réagissent plus vite sur les dithioesters que sur les esters ». Qu'en est-il avec un ester activé par le NHS ?

b) Cas du SEDB : synthèse de la MEDBA (dithioester-ligand modèle)

Afin de repérer aisément les conditions opératoires favorables à l'attaque préférentielle de l'amine sur l'ester activé, un composé modèle a été choisi. Pour simplifier le suivi de la réaction par RMN ^1H , celui-ci se devait d'être une molécule simple dont les signaux de RMN ne se superposent pas (ou peu) avec ceux du SEDB. La **4-(2-aminoéthyl)morpholine** (notée **AEM**, Schéma 14), produit disponible dans le stock du laboratoire, répondait à ces critères.

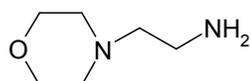


Schéma 14 : Structure du composé aminé modèle (AEM)

Le schéma ci-dessous présente les différentes structures susceptibles de se former en cas de compétition amidation/thioamidation lors de la réaction de l'AEM sur le SEDB. Le produit souhaité a été nommé MEDBA pour *N*-éthylMorpholine EthylDithioBenzoate Amide. Sa formation libère du N-hydroxysuccinimide (NHS). La réaction de thioamidation (2) conduirait aux sous-produits de type thiol (SP2) et thioamide (SP1). Ce dernier peut également se former par thioamidation à partir de la MEDBA en cas d'un excès d'amine, ce qui conduit également à la formation d'un autre thiol (SP3).

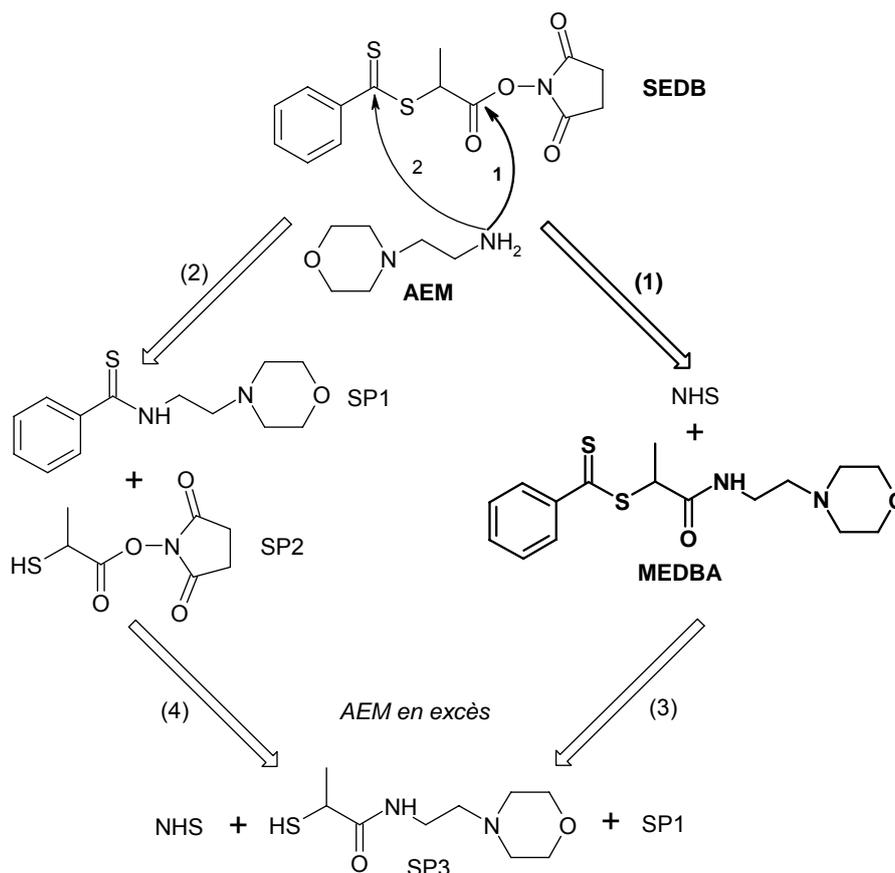


Schéma 15 : Compétition amidation (1) / thioamidation (2) sur le SEDB

Nous avons listé cinq paramètres qui peuvent *a priori* jouer un rôle dans la compétition amidation/thioamidation :

- **stoechiométrie SEDB/amine.**
- **mode d'introduction de l'amine** (coulée rapide ou goutte à goutte).
- température.
- présence de catalyseur (Amine tertiaire,...) ou non.
- solvant.

Le solvant est *a priori* le paramètre le moins important, mais son principal rôle est d'assurer une bonne solubilisation des réactifs. Or, dans l'optique d'utiliser un lipide aminé dans la suite de ce travail, le choix du solvant se restreint au meilleur solvant des phospholipides qu'est le *chloroforme*. Pour cette raison, il s'agit aussi du solvant choisi par l'équipe de H. Kitano pour coupler un lipide aminé sur un dithiocarbamate porteur d'une fonction ester activé par le NHS¹⁷ (cf. chapitre 1, p.52). Ils ont réalisé ce couplage en présence de triéthylamine pour favoriser la réaction (même s'il n'y a pas de risque de thioamidation compétitive avec un dithiocarbamate). En effet, d'après M. Delêtre et G. Levesque⁷, les amines tertiaires qui sont des catalyseurs efficaces des réactions d'amidation, n'ont aucun effet sur les réactions de thioamidation du fait d'un mécanisme réactionnel différent. Dans notre cas, l'AEM apporte également une *fonction amine tertiaire in situ*.

Les mêmes auteurs montrent que la deuxième étape du mécanisme de thioamidation met en jeu deux molécules d'amine primaire. Ainsi, l'*introduction d'AEM par petites fractions* dans une solution de SEDB devrait contribuer à limiter une possible réaction de thioamidation.

Enfin, la température de réaction a été fixée à 30°C.

Les résultats des premiers essais de réaction de l'AEM sur le SEDB sont compilés dans le Tableau 2 : les 5 ajouts de la solution diluée d'AEM sont espacés chacun de 30 min et un prélèvement (analysé par RMN ¹H et CCM) est effectué avant chaque nouvel ajout.

Tableau 2 : Produits de réaction de l'AEM avec le SEDB en fonction de la stœchiométrie AEM/SEDB.

	Equivalent d'AEM / SEDB	RMN ¹ H		Couleur du milieu réactionnel*	Réaction Taux d'avancement*
		Réactifs visibles*	Produits identifiés* (cf. Tableau 3)		
	0	SEDB	-	rouge	-
1	0,6	SEDB	MEDBA + NHS	rouge	<i>Amidation</i> 60%
2	1,2	n.a.	n.a.	rouge orangé	n.a.
3	1,8	AEM	MEDBA + NHS + SP1 + SP3	rouge orangé	<i>Thioamidation</i> 19%.
4	2,4	AEM	MEDBA + NHS + SP1 + SP3	orange	<i>Thioamidation</i> 47%
5	3	AEM	NHS + SP1 + SP3	jaune	<i>Thioamidation</i> 100%

* 30 min après l'ajout d'amine ; n.a. : non analysé.

L'ordre des produits identifiés par RMN ¹H indique clairement que la réaction de thioamidation peut être totalement écartée : le sous-produit SP1 n'apparaît, qu'après l'ajout

d'un excès d'amine. Bien que la présence d'une faible quantité d'un composé dans un mélange (<5% molaire) puisse passer inaperçue sur un spectre de RMN ^1H , l'absence du sous-produit SP1 avant le 2^{ème} ajout est confirmée par les analyses par CCM. Cet ordre de réactivité peut aussi être corrélé à l'évolution de la couleur du milieu réactionnel : le changement de teinte vers la couleur jaune est principalement dû à la présence de SP1 (thioamide aromatique jaune vif).

De plus, cet essai donne une idée de la différence d'ordre cinétique entre les deux réactions. L'amidation est très rapide puisque la totalité de l'AEM est consommée au bout de 30 min. En revanche, la thioamidation est bien plus lente : l'analyse des prélèvements 3 et 4 révèle la présence d'AEM résiduelle. Le taux d'avancement de la réaction de thioamidation de la MEDBA dans le prélèvement 4 est d'environ 47% ; il passe à 75% après 20 jours à température ambiante. L'ajout d'un excès supplémentaire d'amine permet de détruire totalement la MEDBA de manière bien plus rapide (prélèvement 5). Ces observations sont parfaitement en accord avec une cinétique d'ordre 2 par rapport à l'amine (ordre partiel déterminé par M. Delêtre et G. Levesque⁷).

Tableau 3 : Analyse par RMN ^1H des produits obtenus.

Produit	Structure	Résonance(s) caractéristique(s) suivie(s)*
SEDB		4 : 5,09 ppm (q) 5 : 1,82 ppm (d) 11 : 2,83 ppm (s)
AEM		7 : 2,78 ppm (t)
MEDBA		3 : 8,00 ppm (d) 4 : 4,72 ppm (q) 5 : 1,68 ppm (d) 7 : 3,33 ppm (dt)
NHS		NHS « cyclisé » (cf. annexe 3, p. 230) 11 : 2,65 ppm (s)
SP1 (thioamide)		3 : 7,76 ppm (d)
SP3 (thiol)		4 : 3,89 ppm (q) 5 : 1,56 ppm (d)

* Signaux non superposés à d'autres.

Cet essai réalisé avec un excès d'amine montre que la réaction d'amidation est largement prépondérante par rapport à la réaction de thioamidation. Cette dernière, qui ne s'effectue qu'après la consommation totale des fonctions ester activé, est bien plus lente que l'amidation. D'autre part, nous avons pu identifier avec certitude, par RMN ^1H et CCM (Tableau 4), les produits recherchés et ceux à éviter.

Tableau 4 : Analyse par chromatographie sur couche mince de silice (CCM) des produits obtenus.

<i>Produit</i>	<i>Couleur (œil nu)</i>	<i>Rapport frontal dans l'acétone</i>
SEDB	Rouge (puis jaune en séchant)	0,9
MEDBA	Rouge	0,6
MEDBA dégradé par thioamidation (SP1 et SP3)	Jaune	0,7
	Jaune	0,1
NHS	Non coloré	Traînée de 0 à 0,5

c) Cas du SCBDB

Bien que le SCBDB n'ait pas été testé avec l'AEM, il n'y a pas de raison apparente pour qu'il se comporte différemment du SEDB vis-à-vis des amines primaires. Ainsi, il a été utilisé pour plusieurs autres travaux de recherche réalisés au LCPP et à l'UMR CNRS/bioMérieux : sa modification par des composés aminés dans les mêmes conditions qu'avec le SEDB n'a pas posé de problèmes particuliers.

D'autre part, Q. Zheng et C-Y. Pan ont utilisé le SCBDB pour transformer des dendrimères multi-aminés en agents RAFT multi-fonctionnels (dendrimères multi-thiocarbonylés).¹⁴ Dans le but de convertir la totalité des fonctions amine, ils sont restés dans les conditions optimales d'amidation en utilisant un excès de SCBDB (~1,12 éq.). Dans cette étude, il est précisé que l'ester activé oxysuccinimide possède une grande réactivité vis-à-vis des groupes aminés, mais le fait qu'il permette également d'éviter la thioamidation compétitive n'est pas mentionné. Ainsi, il semble que les auteurs n'aient pas perçu tout l'intérêt des dithioesters portant une fonction ester activé pour la synthèse de dithioesters-ligands d'intérêt *via* la formation d'une liaison amide stable. La publication ultérieure (9 mois après), par un des même auteurs, de la synthèse d'un agent RAFT-biotine *via* le couplage d'une biotine hydroxylée sur un trithiocarbonate porteur d'une fonction acide carboxylique¹⁸ (cf. chapitre 1, p.50) semble confirmer ce manque d'intérêt (dont on ne se plaint évidemment pas !).

d) Conclusion sur la synthèse de dithioesters fonctionnels à partir de dithioesters précurseurs.

Pour éviter la formation de sous-produits, la modification du SEDB à l'aide d'un composé aminé n'est donc soumis qu'à une seule contrainte : respecter la stœchiométrie SEDB/amine primaire. Pour cela, un paramètre important à connaître est le degré de pureté du SEDB. Celui-ci peut être classiquement déterminé par des dosages d'analyse élémentaire (cf. p.10) ou plus simplement estimé par RMN ¹H (si les impuretés majoritaires sont connues, ex : solvant résiduel).

Remarque importante : Compte tenu de l'incertitude d'une telle estimation, il est conseillé de sous-estimer le degré de pureté massique du SEDB, quitte à se retrouver avec un léger excès de réactif ester activé. En effet, l'analyse des deux situations indique qu'il est préférable d'être dans ce cas :

- Cas d'un léger excès de SEDB : le composé d'intérêt aminé est totalement converti en composé souhaité, et le SEDB résiduel peut être assez facilement éliminé par chromatographie sur gel de silice.
- Cas d'un léger excès de composé d'intérêt aminé : une partie du composé d'intérêt est transformée en thiol (sous-produit SP3 du Schéma 15, p.82). Les thiols ayant des propriétés

transférantes connues, ils peuvent interférer avec le mécanisme de la polymérisation RAFT. Il faudrait alors éliminer ce sous-produit, mais la seule différence de structure entre ce dernier et le composé souhaité étant un groupement thiobenzyle, des purifications par chromatographie sur gel de silice peuvent s'avérer délicates.*

Un moyen simple pour s'assurer de ne jamais dépasser la stœchiométrie est l'ajout du composé aminé par petites fractions avec un suivi de l'avancement de la réaction par CCM : le risque de thioamidation est écarté tant que la tâche rouge correspondant au SEDB est visible. Cette tâche a la particularité de devenir jaune et de s'intensifier (contraste accru) après le séchage de la plaque. Une réaction du SEDB avec un composant de l'air (O_2 , oxydation ?) est suspectée. Ce phénomène a été exploité pour la détection de très faibles quantités de SEDB. Il est régulièrement arrivé de ne pas visualiser de tâche rouge pendant l'élution mais d'observer la tâche jaune après séchage : cela est un très bon indice expérimental qui indique que le rapport stœchiométrique SEDB/amine est proche de l'unité tout en restant inférieur. Cependant, pour utiliser cette méthode, il convient de vérifier que le dithioester fonctionnel n'a pas le même rapport frontal que le SEDB dans l'éluant choisi (cas par exemple du dithioester-sucre, cf. § III-2).

En connaissant parfaitement le degré de pureté du SEDB utilisé, un ajout en une seule fraction de la solution d'AEM (1 éq.) dans la solution de SEDB a été testé : aucune trace de réaction de thioamidation n'a pu être détectée sur plaque CCM ou sur le spectre de RMN 1H . Ceci confirme, une fois de plus, la très grande réactivité de l'ester activé oxysuccinimide vis-à-vis des amines primaires en comparaison à celle du dithioester. Cependant, l'AEM comporte une amine tertiaire qui peut éventuellement servir de catalyseur à la réaction d'amidation, ce qui n'est pas le cas général des composés aminés. Le protocole avec ajouts par petites fractions, qui permet aussi de vérifier la stœchiométrie par CCM, a donc été conservé pour la synthèse des dithioesters-ligands d'intérêt biologique.

II-2. Purification de la MEDBA

La MEDBA synthétisée peut être utilisée telle quelle en polymérisation RAFT, sans purification préalable sur colonne de silice**. Cependant, comme le NHS libéré est en quantité importante (1 équivalent molaire / MEDBA), son élimination a été envisagée : la solubilité du NHS dans l'eau a permis d'effectuer des extractions liquide/liquide. Le solvant de synthèse (chloroforme) étant non miscible à l'eau, le milieu réactionnel final peut directement être utilisé pour cette étape. Au moins 3 extractions successives sont réalisées afin d'assurer une élimination d'au moins 90% du NHS présent.

Accessoirement, ces lavages à l'eau de la MEDBA ont permis d'élucider la nature d'un pic large d'allure gaussienne, très mobile et visible selon les cas entre 3,5 et 7,5 ppm sur les spectres RMN 1H de la MEDBA non lavée (cf. annexe 3, p.230)

La 4-(2-aminoethyl)morpholine (AEM) a servi avant tout à valider la stratégie de synthèse de dithioester-ligand à partir du SEDB. Mais le dithioester résultant, la MEDBA, a aussi servi par la suite d'agent RAFT de référence (cf. chapitres 3 et 4). Pour cette raison, une

* Cas où la force motrice de l'élution réside principalement dans le composé d'intérêt et non dans la fonction dithioester, ex : lipide-dithioester et lipide-thiol = même rapport frontal en CCM.

** Les polymérisations réalisées sont contrôlées (croissance linéaire des M_n avec la conversion et I_p très faible). Il a été observé que la présence d'impureté(s) (de nature inconnue) dans les dithioesters a uniquement une influence sur les cinétiques de polymérisation (qui sont généralement plus lente) (cf. annexe 4, p.232).

purification minutieuse de la MEDBA a été effectuée par chromatographie sur gel de silice. Cependant, comme le NHS a tendance à traîner sur la silice (cf. Tableau 4, p.85), les lavages préliminaires à l'eau ont été conservés dans le protocole de purification. Le but des chromatographies sur gel de silice est donc d'éliminer les résidus de NHS et le léger excès de SEDB ainsi que les quelques impuretés présentes initialement dans ce dernier. Deux purifications successives ont conduit à un échantillon de MEDBA dont les analyses par CCM ou RMN ^1H ne révèlent plus aucune trace d'impureté (voir pureté massique : page suivante).

Le rendement final de synthèse de la MEDBA après ces purifications est de 68% (calculé par rapport à la quantité d'AEM initialement introduite). Ce rendement moyen alors que la réaction d'amidation du SEDB est quantitative, s'explique principalement par un rendement de purification également moyen dû à l'exclusion systématique de toutes les fractions contenant des traces d'impureté(s). De plus, une petite partie du produit est malheureusement perdue lors de sa manipulation au cours des différentes étapes (lavage, séchage sur MgSO_4^* , purification). Les synthèses ayant été effectuées sur des quantités de produits relativement réduites (max. 500mg de SEDB), cette petite perte de produit due aux manipulations peut avoir un impact non négligeable sur le rendement final.

II-3. Caractérisation de la MEDBA.

- Spectre RMN ^1H :

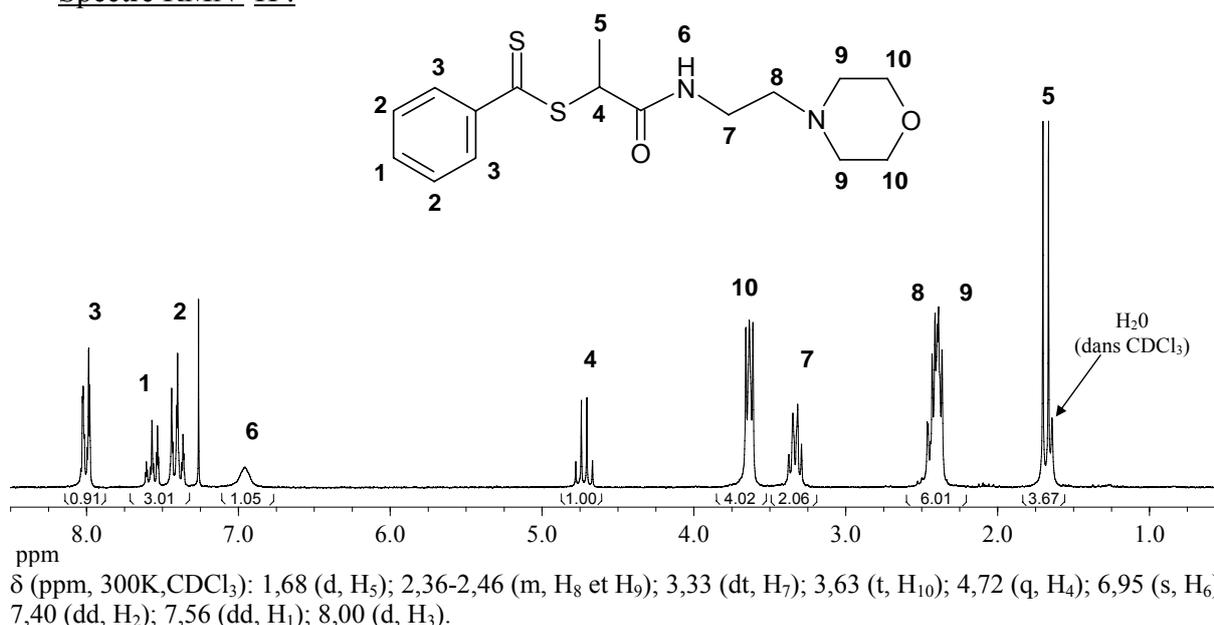


Figure 4 : Spectre RMN ^1H de la MEDBA purifiée.

Comparé au spectre RMN ^1H du SEDB (cf. p.76), les signaux caractéristiques de la formation de la MEDBA sont :

- Le déplacement du quadruplet **4** de 5,09 ppm (SEDB) à 4,72 ppm.
- Le déplacement du doublet **5** de 1,82 ppm (SEDB) à 1,68 ppm.
- Le déplacement du massif (doublet de triplet) **7** de $\sim 2,75$ ppm (AEM) à 3,33 ppm.
- L'apparition du pic du proton **6** de la fonction amide formée.

* la couleur légèrement rosée du MgSO_4 après séchage de la phase organique contenant le dithioester indique effectivement une perte de produit (par adsorption sur les grains de MgSO_4).

- Autres caractérisations :

La MEDBA purifiée a également été caractérisée par RMN ^{13}C (cf. partie exp., p.109), par spectrométrie de masse haute résolution en ionisation FAB (Fast Atom Bombardment) (cf. p.100), et par analyse élémentaire (Tableau 5). Toutes ces caractérisations confirment la structure attendue pour la MEDBA. L'exploitation des résultats de l'analyse élémentaire (cf. annexe 1, p.225) a permis de confirmer l'efficacité des purifications : une pureté massique de 98% est obtenue.

Tableau 5 : Résultats de l'analyse élémentaire de la MEDBA purifiée.

$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$	C	H	N	S
% théorique	56,77	6,55	8,28	18,95
% mesuré	56,86	6,57	8,15	19,02

II-4. Conclusion : récapitulatif des conditions optimales de synthèse.

La particularité de l'agent RAFT précurseur, SEDB, est la présence de la fonction ester activé N-oxysuccinimide qui permet sa fonctionnalisation par un ligand aminé *via* une réaction d'amidation (réaction totale) sans que l'amine primaire du ligand ne dégrade la fonction dithioester.

Pour cela, les conditions opératoires optimales sont :

- SEDB + **maximum 1 équivalent molaire** de ligand aminé.
- Solvant : chloroforme.
- Concentration initiale en SEDB ~ 10 g/L.
- Température : 30°C (\sim température ambiante).*
- Ajout de la solution du ligand aminé par petites fractions dans la solution de SEDB.
- Durée de la réaction \sim max. 2 heures.
- Suivi de la réaction par CCM dans l'acétone (ou autre) : technique simple et efficace qui permet de contrôler la condition essentielle qu'est le respect de la stœchiométrie.

Le milieu réactionnel est lavé au moins trois fois à l'eau permutée afin d'éliminer au moins 90% de la N-hydroxysuccinimide (NHS) libérée au cours de la réaction. Après séchage sur sulfate de magnésium, le nouvel agent RAFT fonctionnel peut ensuite être purifié par chromatographie sur gel de silice à l'aide de l'éluant adéquat.

* Température qui permet de réaliser la réaction en été... sans avoir à refroidir ! (quoique... ces derniers temps, les étés sont bien chauds !)

III. Synthèse et caractérisation de dithioesters-ligands d'intérêt biologique.

Après l'optimisation des conditions de synthèse d'un dithioester fonctionnel modèle précédemment décrite (§ II-4), la modification du SEDB par des ligands d'intérêt biologique a conduit sans difficulté majeure aux dithioesters-ligands correspondants. Cette partie présente donc principalement les quelques particularités de synthèse rencontrées selon la nature du ligand utilisé. Elle fournit également les caractérisations complètes des trois dithioesters-ligands synthétisés et des précisions sur l'utilisation de SEDB dégradé.

III-1. Synthèse d'un dithioester-biotine (BEDBA).

La biotine est un ligand extrêmement utilisé dans les applications bio-médicales. Sa très forte affinité spécifique avec les protéines avidine et streptavidine en fait un ligand de choix pour la capture d'entités biologiques. Ainsi, on la retrouve fréquemment dans les dispositifs de diagnostic biologique dont un exemple mettant en œuvre une détection par fluorescence est présenté au chapitre 4 (cf. § II-1, p.174).

La biotine utilisée dans cette étude est une biotine aminée pourvue d'un petit bras espaceur (oxyde d'éthylène) : elle est fournie par Pierce sous le nom commercial EZ-Link™ Biotin-PEO-Amine. La pureté minimale indiquée est de 98%.

La réaction avec le SEDB (Schéma 16) selon les conditions optimales (p.88) conduit au dithioester-biotine nommé BEDBA (*N*-PEO-**B**iotin **E**thyl**D**ithio**B**enzoate **A**mide).

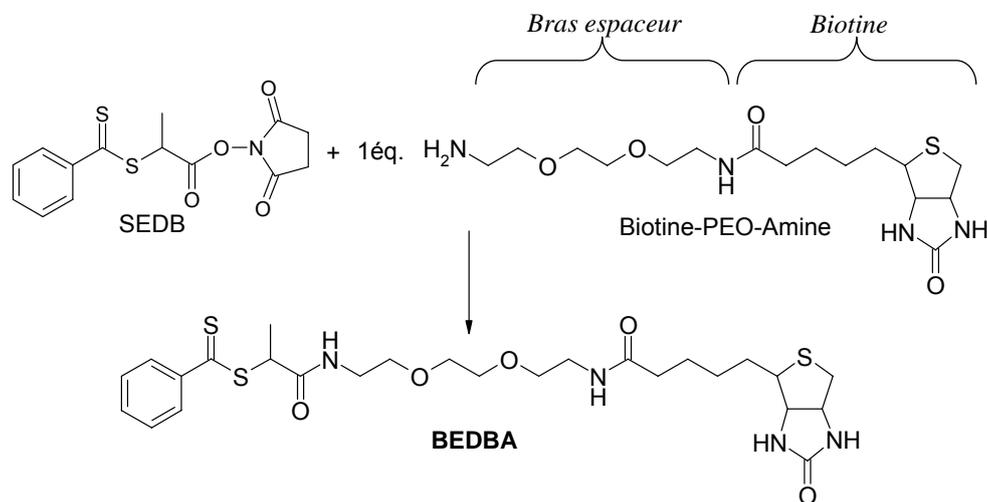


Schéma 16 : Synthèse du dithioester-biotine (BEDBA)

La BEDBA a été purifiée par chromatographie sur gel de silice suivant un protocole expérimental simplifié : comme elle ne migre que très lentement dans l'acétone, les quelques impuretés sont éliminées grâce à cet éluant, puis le produit pur est récupéré *en une seule fraction* à l'aide d'un mélange chloroforme/éthanol.

Des analyses par CCM et par RMN ¹H (Figure 5) confirment l'obtention d'un produit pur.

• BEDBA : spectre RMN ¹H.

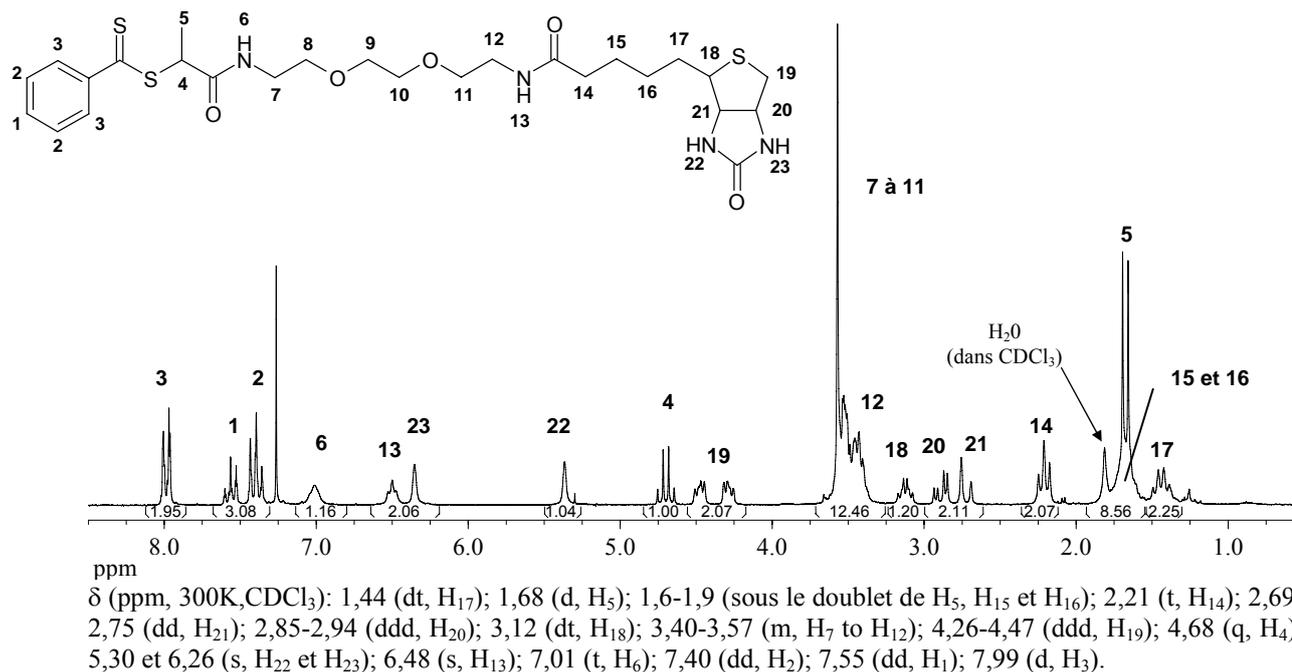


Figure 5 : Spectre RMN ¹H de la BEDBA purifiée

Les signaux caractéristiques de la formation de la BEDBA sont :

- Le déplacement du quadruplet **4** de 5,09 ppm (SEDB) à 4,68 ppm.
- Le déplacement du doublet **5** de 1,82 ppm (SEDB) à 1,68 ppm.
- Le déplacement du pic des deux protons **7** sous le massif à 3,40-3,57 ppm (initialement à ~2,8 ppm pour la biotine aminé).
- L'apparition du pic du proton **6** de la fonction amide.

Remarque : le pic de l'eau (à 1,56 ppm dans CDCl₃ pur) est visible entre 1,56 et ~2,1 ppm selon la nature du produit analysé.

Autres remarques concernant le spectre RMN ¹H :

- Les protons **6**, **13**, **22** et **23** sont des protons labiles : leurs déplacements chimiques correspondant dépendent fortement de la température d'analyse. Ainsi, à 320 K, ils sont respectivement 6,85 ; 6,23 ; 5,77 et 4,98.
- Les deux protons **19** ne sont *a priori* pas équivalents et ont une forte constante de couplage entre eux, d'où la visualisation de deux doublet de doublet (un doublet de doublet de doublet (ddd), assez mal résolu) dont chaque intégrale est égale à 1.
- La constante de couplage entre les protons **20** et **21** doit être très faible car ce couplage n'est pas visible sur le spectre : on observe respectivement un doublet de doublet (dd) et un doublet (d) alors qu'on attendrait un doublet de doublet de doublet (ddd) et un doublet de doublet (dd).

Le rendement de synthèse après purification est de 72%. Dans ce cas, la purification avec un protocole simplifié évite la récupération de fractions « mélange » et donc la perte de produit présent dans ces fractions. Cependant, cette synthèse ayant été réalisée avec une petite quantité de réactifs (180 mg de SEDB), la perte de produit due aux manipulations (notamment le séchage sur MgSO₄) ne doit pas être négligeable.

III-2. Synthèse d'un dithioester-sucre (SEDBA).

Les sucres, nom usuel pour désigner des dérivés carbohydate, présentent des propriétés de reconnaissance moléculaire. En effet, certaines lectines interagissent spécifiquement avec certains carbohydates sans en modifier la structure. Les lectines sont des récepteurs protéiques présents en surface de certaines cellules et en particulier en surface de certaines bactéries. Ainsi, dans le cadre du diagnostic biologique, les architectures polymères présentant des dérivés carbohydate peuvent être à la base de dispositifs de capture et de détection de bactéries pathogènes (cf. chapitre 4, § III-1, p.189).

Le sucre aminé utilisé pour la réaction avec le SEDB (Schéma 17) est un galactopyranose protégé aminé, le 6-amino-6-désoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropylidène- α -D-galactopyranose. Il a été synthétisé et purifié par Guillaume Gody¹⁹ à partir du 1,2:3,4-di-*O*-isopropylidène- α -D-galactopyranose, selon la procédure décrite par B. Badey *et al.*²⁰

Après réaction, on obtient le dithioester-sucre nommé SEDBA (*N*-Sucre EthylDithioBenzoate Amide).

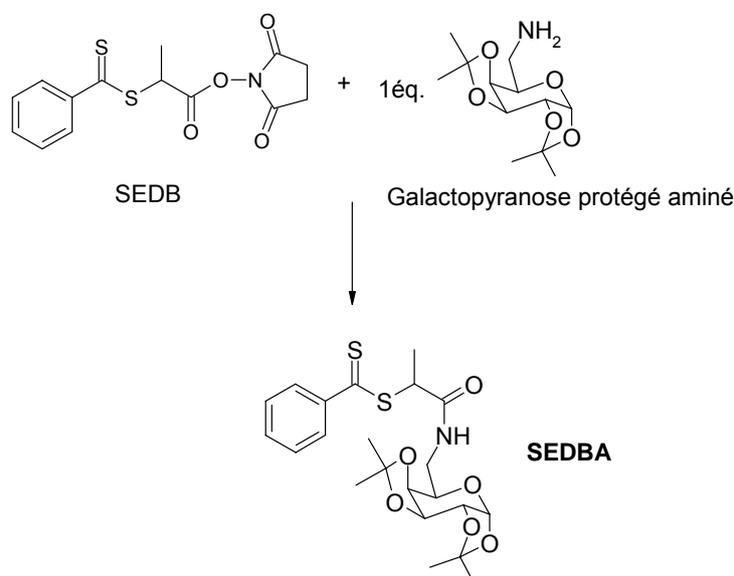


Schéma 17 : Synthèse du dithioester-sucre (SEDBA)

La seule particularité de cette synthèse réside dans le suivi de la réaction par CCM (acétone). Avec cet éluant, le SEDB et la SEDBA ont le même rapport frontal ($rf=0,9$) : la présence de la SEDBA sous la tâche du SEDB a été confirmée par une révélation à l'acide (H_2SO_4 à 10% dans l'éthanol, puis chauffage) qui permet de localiser le sucre. Cela a également permis de vérifier que la totalité du sucre aminé initial ($rf=0,55$) a bien été consommé en fin de réaction.

Cette migration identique du dithioester-sucre et du SEDB a nécessité de rechercher un éluant de purification adéquat (dichlorométhane/acétate d'éthyle/éthanol, 92:5:3, v:v:v). Après 2 purifications successives sur colonne de silice, une fraction de produit pur a pu être obtenue. De nombreuses fractions « mélanges » ont été écartées. Ainsi, bien que dans ce cas aucune perte de produit n'ait été constatée au niveau du séchage sur $MgSO_4$ (poudre blanche après séchage), le rendement de synthèse après purification est modéré, 66%.

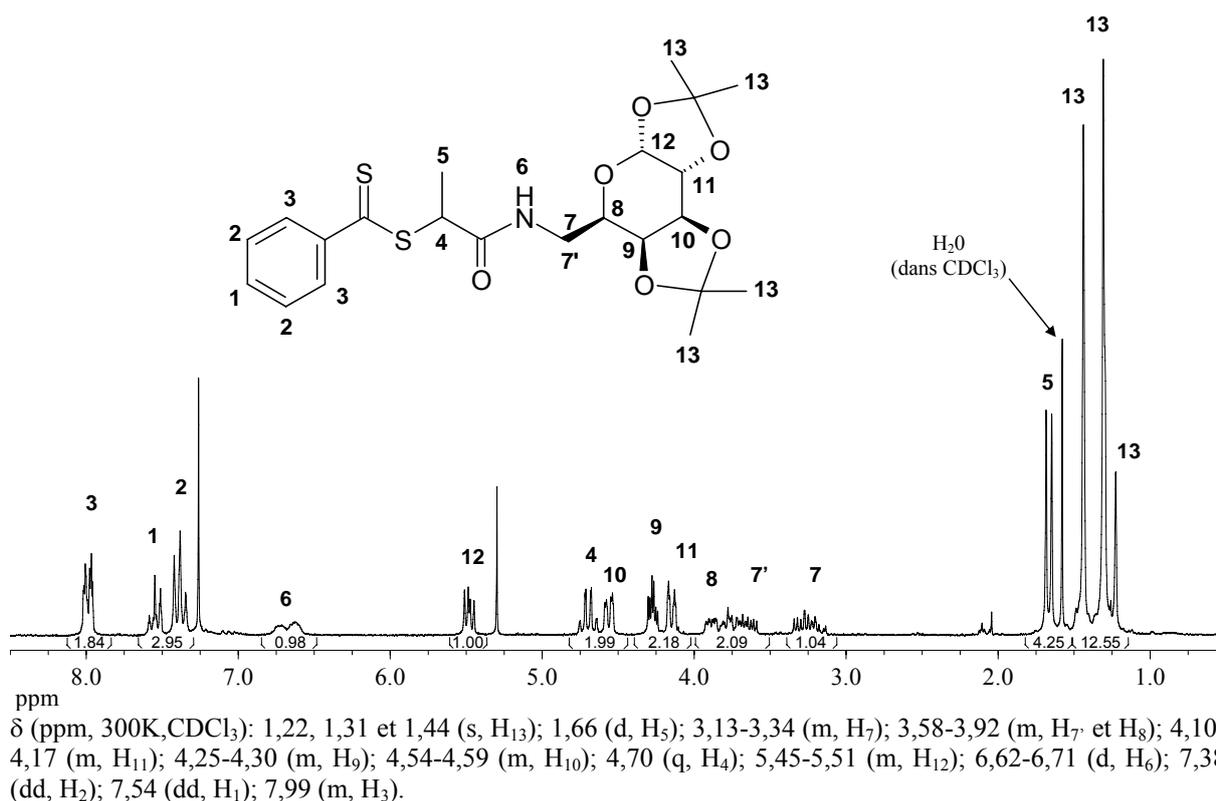


Figure 6 : Spectre RMN ^1H de la SEDBA purifiée

Les signaux caractéristiques de la formation de la SEDBA sont :

- Le déplacement du quadruplet **4** de 5,09 ppm (SEDB) à 4,70 ppm.
- Le déplacement du doublet **5** de 1,82 ppm (SEDB) à 1,66 ppm.
- Le dédoublement des protons **7** et **7'** en deux massifs à 3,13-3,34 ppm et 3,58-3,8 ppm (massif commun à 2,82-3,04 ppm pour le sucre aminé).
- Le déplacement du massif **8** de 3,69-3,76 ppm (sucre aminé) à 3,80-3,92 ppm.
- L'apparition du double pic du proton **6** de la fonction amide.

Remarque : la présence du sucre provoque un dédoublement de la plupart des signaux. Cela indique souvent la présence de deux conformations. Cependant, ce dédoublement n'a pas été constaté sur le spectre du sucre aminé initial. Il pourrait donc peut-être s'agir d'interactions intermoléculaires (entre des molécules de dithioester-sucre).

III-3. Synthèse d'un dithioester-lipide (LEDBA).

Tout comme les protéines et les carbohydrates, les phospholipides constituent un ensemble de molécules dont le rôle biologique est très important. Ils sont en particulier un des constituants essentiels des membranes cellulaires. Les phospholipides ont la particularité de s'organiser en vésicules bi-couches dans un milieu aqueux. Ces assemblages creux, nommés liposomes, sont des vecteurs parfaitement bio-compatibles utilisables pour la vectorisation de principes actifs. Leur principal inconvénient étant une stabilité médiocre, l'insertion de chaînes polymères adéquates en surface des liposomes permet d'améliorer cette stabilité (cf. chapitre 4, § I-1, p.169).

Le lipide aminé utilisé est le 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-(hexanoylamine) (DPPEHA ; pureté >99%) fourni par Avanti Polar Lipids, Inc. Le dithioester lipidique dérivé du SEDB est nommé LEDBA (*N*-Lipide EthylDithioBenzoate Amide) (Schéma 18).

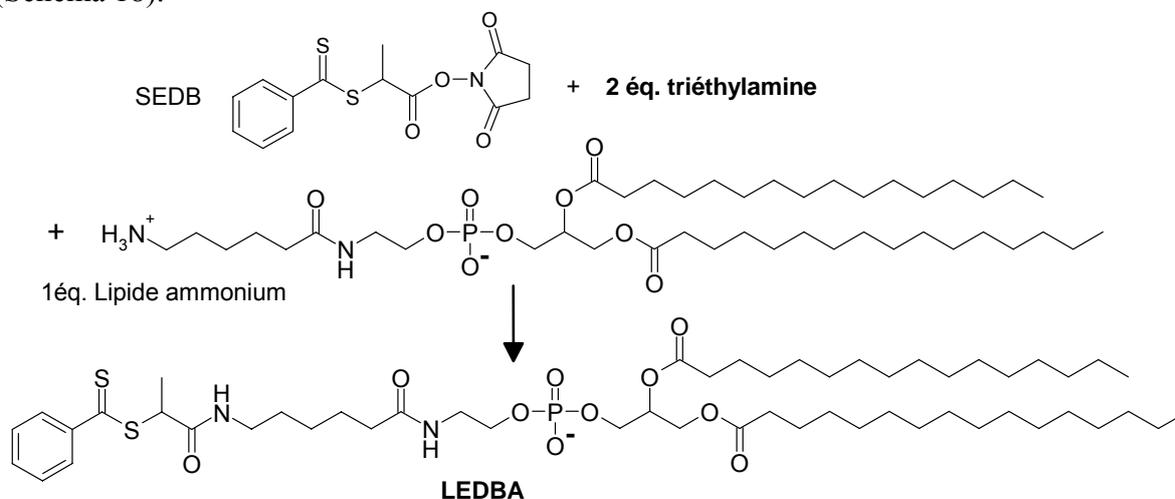


Schéma 18 : Synthèse du dithioester-lipide (LEDBA)

Contrairement aux ligands utilisés précédemment, la fonction amine est sous forme ammonium, NH_3^+ ; elle sert de contre-ion au phosphate (partie polaire). Sous cette forme, elle est totalement inactive vis-à-vis du SEDB. Ainsi, 2 équivalents de triéthylamine sont ajoutés dans la solution de lipide « aminé » pour convertir quantitativement *in situ* la fonction ammonium en amine primaire.

En utilisant du SEDB non dégradé (avec un degré de pureté connu), la synthèse de la LEDBA se passe sans problème particulier, comme lors des synthèses précédemment décrites. En revanche, l'utilisation de SEDB dégradé peut poser quelques problèmes (cf. § III-4, p.95 pour les soucis!).

Etant donné la capacité des phospholipides à s'organiser en vésicules dans l'eau, l'idée des lavages à l'eau de la LEDBA semblait compromise. Cependant, comme indiqué précédemment, l'élimination du NHS par chromatographie sur gel de silice n'est pas totalement efficace : du NHS résiduel se retrouve dans de la LEDBA purifiée sans avoir été préalablement « lavée ». Ainsi, l'extraction du NHS à l'eau a toutefois été testée (LEDBA en solution dans le chloroforme).

En fonction du rapport volumique eau/chloroforme et de la concentration en LEDBA dans le chloroforme, la séparation de phases (généralement assez lente), présente trois répartitions possibles : deux ou trois phases dont les couleurs (rose, rose orangé ou orange) dépendent de la concentration en dithioester (cf. Figure 7). La phase notée « émulsion » est une phase intermédiaire de gouttelettes d'eau dans le chloroforme.

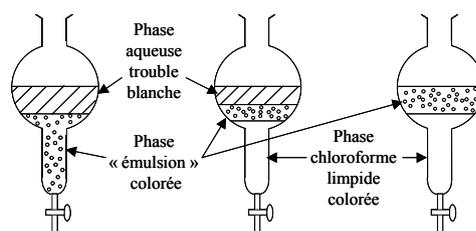


Figure 7 : Répartitions des phases observées lors des lavages à l'eau de la LEDBA.

La coloration des phases indiquant la présence de LEDBA, seules les phases incolores sont éliminées. Ainsi, après plusieurs extractions des phases « émulsions » par ajout de chloroforme, il est possible d'éliminer efficacement le NHS tout en récupérant un maximum de LEDBA. Cependant, cela complique beaucoup cette phase d'extraction et les risques de pertes de produit sont augmentés.

L'étape suivante, le séchage sur $MgSO_4$ anhydre, est à éviter car il a été remarqué une forte affinité de la LEDBA avec le sulfate de magnésium ; celui-ci reste rose malgré des lavages au chloroforme. Cela entraîne une perte très importante de produit. Cependant, sans cette étape de séchage, la phase organique de LEDBA lavée contient une quantité non négligeable d'eau. Une partie de cette eau est éliminée lors de la concentration, et l'eau restante est censée être éliminée lors de la purification sur colonne de silice (entraînée par l'acétone, voir ci-dessous).

La purification de la LEDBA sur gel de silice est, comme dans le cas de la BEDBA, une chromatographie à protocole simplifié : les impuretés sont éliminées par migration à l'acétone puis à l'acétate d'éthyle ; la LEDBA est ensuite récupérée *en une seule fraction* par un mélange dichlorométhane/éthanol.

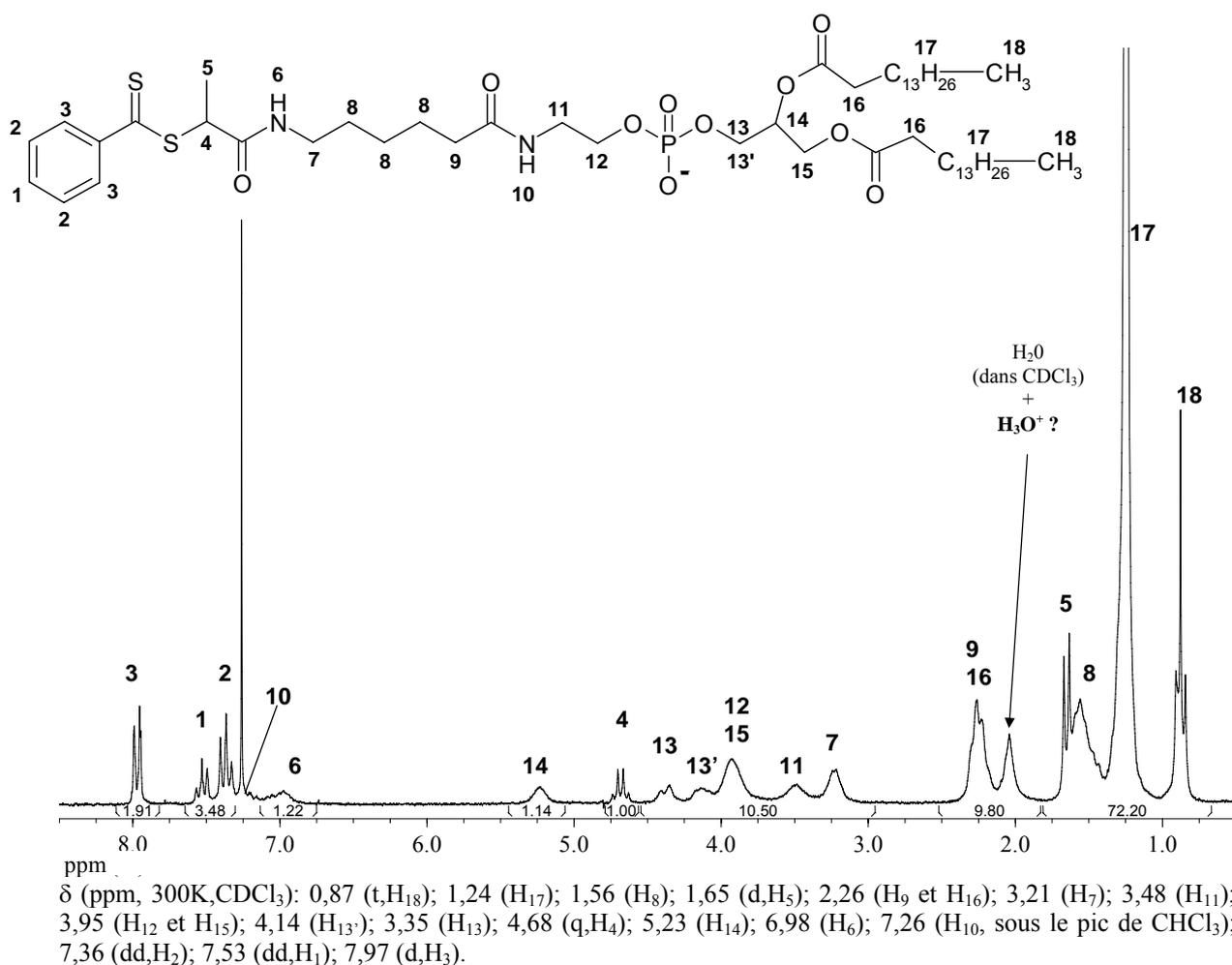


Figure 8 : Spectre RMN 1H de la LEDBA purifiée

Les signaux caractéristiques de la formation de la LEDBA sont :

- Le déplacement du quadruplet **4** de 5,09 ppm (SEDB) à 4,68 ppm.
- Le déplacement du doublet **5** de 1,82 ppm (SEDB) à 1,65 ppm.
- Le déplacement du pic des protons **7** à 3,21 ppm (initialement à 2,90 ppm pour le lipide aminé).
- L'apparition du pic du proton **6** de la fonction amide.

Une information surprenante donnée par le spectre de RMN ^1H de la LEDBA purifiée (Figure 8) est que la chromatographie sur gel de silice n'a pas éliminé toute l'eau ! En effet, l'importante valeur de l'intégrale du pic correspondant ne s'explique qu'en partie par la présence d'un peu d'eau dans le solvant deutéré (quantité connue). A l'aide de cette valeur, une estimation de la quantité d'eau donne environ 1,35 moles H_2O pour une mole de LEDBA soit 2,3% en masse. Est-il possible que le contre-ion du phosphate soit, à cette étape là, un ion H_3O^+ ? Dans ce cas, la même estimation donne 0,9 moles H_3O^+ pour une mole de LEDBA ; cela ne contredit pas l'hypothèse.

III-4. Effet de l'utilisation combinée de SEDB dégradé et de triéthylamine.

a) Identification du problème

Une première synthèse de LEDBA a donné un résultat surprenant : les quantités de lipide aminé et de triéthylamine utilisées avaient été calculées à partir de la pureté massique initiale du SEDB. Cependant, l'analyse RMN ^1H ultérieure de ce lot de SEDB indiquait clairement une dégradation importante (pureté RMN* de 21% contre 56%** pour le produit fraîchement synthétisé). De plus, la libération importante de NHS indiquait une destruction non négligeable des fonctions ester activé. Ainsi, cette synthèse ne respectait pas la stœchiométrie ester activé/amine de 1/1. Pourtant, ni le suivi CCM, ni la couleur du milieu réactionnel n'ont indiqué la présence de thioamide (absence de thioamide confirmée ultérieurement par RMN ^1H). En revanche, un autre produit lipidique est présent à hauteur de 50% molaire : le spectre de RMN ^1H correspondant est similaire au spectre du produit pur (Figure 8, page précédente) excepté que toutes les valeurs des intégrales des résonances des protons de la partie lipidique sont doublées et que le massif de l'eau à 2 ppm est remplacé par un quadruplé!*** L'identification précise de ce produit indésirable a été réalisée à l'aide de la spectrométrie de masse MALDI-ToF.

b) Analyse par spectrométrie de masse MALDI-ToF

La technique de spectrométrie de masse de type MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight) permet d'accéder à la distribution isotopique d'une espèce chimique tout en restant dans des conditions d'ionisation relativement douces (comparée à la FAB par exemple). Ce n'est pas une technique quantitative mais elle permet de détecter la présence d'un composé en très faible quantité dans un mélange.

Dans nos conditions d'analyse, les espèces chimiques sont généralement cationisées par un cation, H^+ , Na^+ ou K^+ . Une particularité de l'analyse des phospholipides réside dans le

* Pureté RMN = (nombre de protons du produit) / (nombre de protons donné par l'intégration totale du spectre). Il s'agit d'une exploitation directe du spectre qui n'est ni une pureté molaire ni une pureté massique.

** Valeur relativement faible due à la présence assez importante de solvant dans le produit.

*** Quadruplé un peu déformé par la présence d'un peu d'eau (provenant du solvant d'analyse). Cependant, ce produit ayant été séché sur MgSO_4 , le spectre de RMN ^1H ne montre que des traces d'eau.

fait que le contre-ion du phosphate peut également être un des ces trois cations. Ainsi, après une attribution minutieuse de l'ensemble des pics détectés (Figure 9), le spectre révèle la présence de 4 structures : la LEDBA, un sous-produit nommé LTPA et deux autres structures (LPA et LEDBA oxydée, cf. Schéma 19) correspondant à des artéfacts d'analyse. En effet, la fragmentation des dithioesters au niveau de la liaisons C-S (conduisant ici à la LPA) ainsi que leur oxydation au sein du spectromètre sont des phénomènes connus²¹.

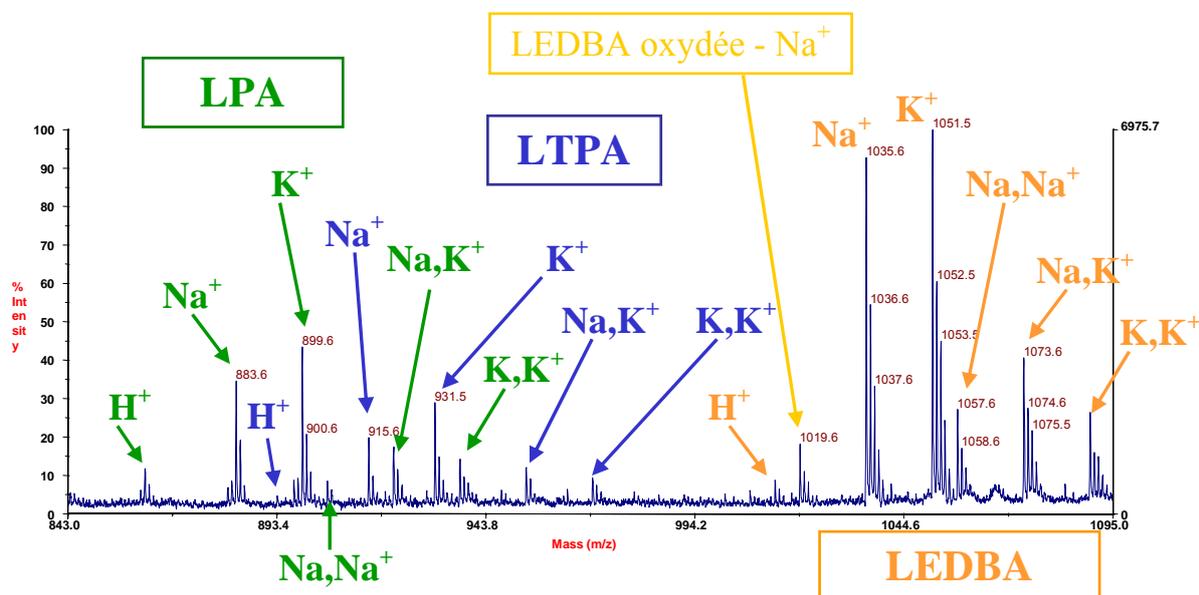


Figure 9 : Spectre de masse MALDI-ToF de la LEDBA synthétisé avec du *SEDB dégradé*. (mode réflectron, agrandissement de la zone 843-1095 m/z)

Remarque : la « double » cationisation, par exemple Na,Na⁺, correspond à une espèce cationisée sodium pour laquelle le contre-ion du phosphate est aussi un sodium. Dans le cas de la cationisation « simple », le contre-ion du phosphate est un proton. Ainsi, la différence de masse entre l'espèce Na⁺ et l'espèce Na,Na⁺ n'est pas 23 mais 22. Le contre-ion H₃O⁺ suspecté n'est pas visible sur le spectre ; cela ne permet pas de conclure à son inexistence car il pourrait être totalement échangé par Na⁺ ou H⁺.

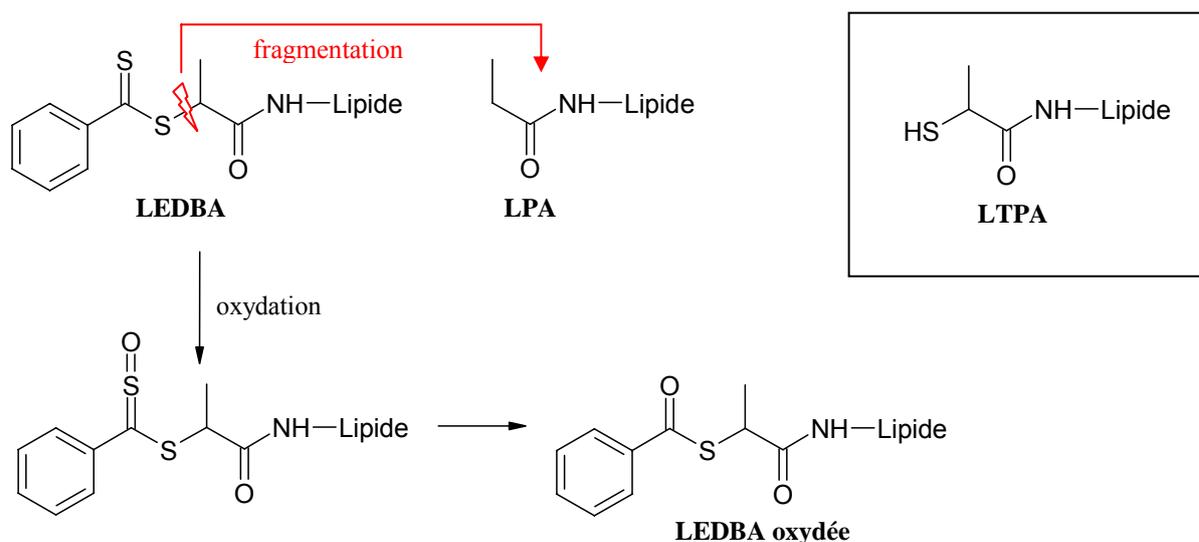


Schéma 19 : Structure de la LEDBA, de la LEDBA oxydée, de la LPA (*N*-Lipide PropanAmide) et de la LTPA (*N*-Lipide ThiolPropanAmide)

Comme la LPA, la LTPA pourrait provenir d'une autre fragmentation de la LEDBA au niveau de la liaison C-S du thiocarbonyle. Cependant, ce type de fragmentation est moins connu. D'autre part, le quadruplé à 2 ppm identifié sur le spectre de RMN ^1H du mélange des deux produits pourrait peut-être être la résonance du proton porté par le carbone en α de la fonction thiol (l'équivalent du proton numéroté 4 sur la LEDBA). Ainsi, le produit lipidique préalablement détecté par RMN ^1H en proportion molaire 50/50 avec la LEDBA est vraisemblablement le produit nommé LTPA pour *N*-Lipide ThiolPropanAmide.

c) Origine de la LTPA

La présence de LTPA en quantité importante mais en l'absence du produit de thioamidation, SP1, est incompatible avec le schéma réactionnel précédemment proposé et confirmé avec la MEDBA (cf. § II-1.b) (Schéma 20).

Ainsi, la présence d'un produit de dégradation du SEDB réactif vis-à-vis des amines primaires et qui conduirait directement à la LTPA a été suspectée.

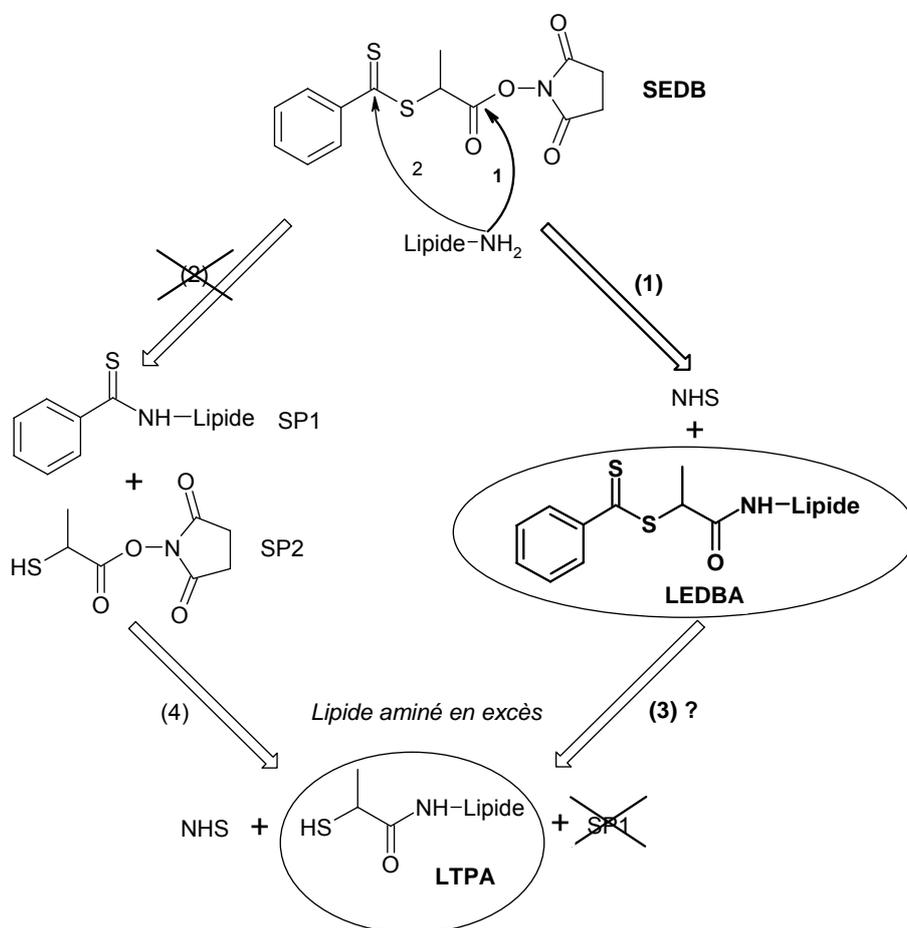


Schéma 20 : Nature des produits formés lors d'une synthèse de la LEDBA avec du SEDB dégradé : incohérence avec le schéma réactionnel classique (déterminé lors de la synthèse de la MEDBA).

Pour tenter de confirmer cette hypothèse, plusieurs essais ont été réalisés dans diverses conditions (cf. Tableau 6) : les essais n°1 et 2 indiquent clairement un effet de dégradation du SEDB, puisque en utilisant un lot fraîchement synthétisé, aucune trace de LTPA n'est observée.

L'essai n°5 est l'essai dans lequel a été identifié le sous-produit LTPA. L'essai n°6 a permis de déterminer la pureté massique du lot de SEDB dégradé par l'intermédiaire d'un dosage des fonctions ester activé par la 4-(2-aminoéthyl)morpholine (AEM). Elle est d'environ 46% ce qui est en accord avec la possibilité d'obtention d'un mélange équimolaire LEDBA/LTPA. En revanche, avec l'AEM, le schéma réactionnel classique est respecté : la réaction de thioamidation est détectée lors de l'utilisation d'un excès d'amine et cela en présence ou non de triéthylamine (essais n°7 et 8). Cette dernière n'a donc *a priori* pas d'effet direct sur l'ordre de réactivité des espèces présentes.

Tableau 6 : Récapitulatif des essais réalisés pour comprendre l'origine de la LTPA.

n°	SEDB utilisé	Composé aminé	Quantité TEA	Produit(s) visible(s) par RMN ¹ H	Observation ⇒ Conclusion
1	SEDB pur non dégradé	~ 1éq. Lipide-NH ₃ ⁺	~ 1éq.	100% LEDBA	Réaction plus rapide en excès de TEA (car équilibre L-NH ₃ ⁺ + TEA ⇌ L-NH ₂ + TEAH ⁺)
2			~ 4,5éq.		
3	SEDB dégradé	~ 1éq. Lipide-NH ₃ ^{±**}	Pas de TEA	Pas de Réaction	SEDB (et impureté) non réactifs sur Lipide-NH ₃ ⁺
4					
5	Pureté RMN~21%	<u>~ 2éq. Lipide-NH₃^{±**}</u>	<u>~2éq.</u>	50% LEDBA + 50% <u>LTPA</u>	Pas de réaction de thioamidation ⇒ <i>impureté + réactive que dithioester</i>
6	Pureté massique* ~ 46%	1éq. AEM**	Pas de TEA	100% MEDBA	⇒ Ester activé + réactif qu'impureté
7		2éq. AEM**		MEDBA + thioamidation (SPI+SP3)	⇒ Dithioester + réactif qu'impureté
8		2éq. AEM**	~1éq.		

* d'après la quantité d'AEM utilisée dans l'essai n°6 ; ** équivalent par rapport à la quantité de SEDB pur.

Etant moins réactive que l'ester activé et que le dithioester, l'impureté pourrait porter une fonction acide carboxylique. De plus, pour conduire à la LTPA, celle-ci pourrait être l'acide 2-mercaptopropanoïque (Schéma 21 ; il pourrait éventuellement se former par double hydrolyse du SEDB avec des traces d'eau (humidité de l'air))

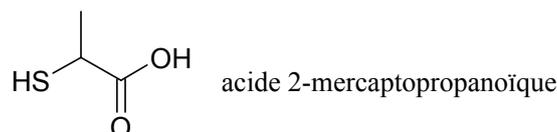


Schéma 21 : Produit de dégradation du SEDB supposé (conduisant à la formation de LTPA).

Cependant, il reste à comprendre pourquoi cet acide carboxylique devient plus réactif que le dithioester dans l'essai n°5. Une différence qui le distingue de l'essai n°8 est la présence d'ions triéthylammonium TEAH⁺ formés *in situ*. Se pourrait-il que ces derniers soient un catalyseur très efficace des réactions d'amidation de telle sorte que l'ordre de réactivité des composés présents dans le SEDB dégradé (vis-à-vis d'une amine primaire) soit modifié ? (cf. Tableau 7).

Tableau 7 : Hypothèse de modification de l'ordre de réactivité vis-à-vis d'une amine primaire des composés présents dans le SEDB dégradé.

En absence d'ions TEAH ⁺	En présence d'ions TEAH ⁺
Ester activé>>Dithioester>Acide carboxylique	Ester activé>>Acide carboxylique>>Dithioester

Les résultats expérimentaux du Tableau 6 laisseraient donc supposer que l'ion triéthylammonium formé *in situ* pourrait modifier l'ordre de réactivité usuel entre la fonction dithioester et la fonction acide carboxylique présente dans un des produits issus de la dégradation du SEDB. Cependant, cette hypothèse n'a pas été approfondie.

La présence de LTPA dans le SEDB dégradé ne semble problématique que lors de l'utilisation combinée d'un ligand sous forme ammonium et de triéthylamine. Dans les autres cas (ligands aminés), l'utilisation de SEDB dégradé est encore possible à partir du moment où son degré de pureté a été déterminé.

III-5. Caractérisation des dithioesters-ligands.

En plus de la caractérisation par RMN ^1H (cf. p.90, 92 et 94), les dithioesters-ligands purifiés ont été analysés par RMN ^{13}C , par spectrométrie de masse haute résolution en ionisation FAB (Fast Atom Bombardment) (cf. Tableau 8), et par analyse élémentaire (cf. Tableau 9).

✓ *RMN ^{13}C :*

Les spectres de RMN ^{13}C (cf. partie exp., p.109) confirment les structures attendues mais n'apportent pas d'informations supplémentaires.

✓ *Spectrométrie de masse FAB :*

Tableau 8 : Résultats des analyses par spectrométrie de masse FAB des dithioesters-ligands.

Dithioester	Ion caractéristique $[\text{M}+\text{H}^+]$	Masse exacte calculée	Masse expérimentale	Ecart relatif (ppm)
MEDBA	$\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$	339,1201	339,1205	+1,1
BEDBA	$\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_3$	583,2083	583,2050	-5,6
SEDBA	$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{NO}_6\text{S}_2$	468,1515	468,1532	+3,7
LEDBA	$\text{C}_{53}\text{H}_{94}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{PS}_2$	1013,6088	1013,6077	-1,0

Pour chacun des quatre dithioesters, l'écart relatif entre la masse expérimentale et la masse exacte calculée est inférieur à la limite des 10 ppm généralement acceptée pour ce type d'analyse. Notons que la masse expérimentale de la LEDBA indiquerait la présence d'un contre-ion H^+ , mais celui-ci peut avoir remplacé le contre-ion initial (qui pourrait être H_3O^+) au cours de l'analyse (tout comme en spectrométrie de masse MALDI-ToF). D'autre part, un pic à 1031,9 m/z est observé sur le spectre général basse résolution. Celui-ci pourrait correspondre à de la LEDBA possédant un contre-ion H_3O^+ (masse exacte calculée = 1031,6193). Cependant, la masse exacte expérimentale de cette espèce n'a pas été déterminée.

✓ Analyse élémentaire :

A partir des résultats bruts des analyses élémentaires (cf. partie exp., p.114), les formules brutes des échantillons analysés ont été déterminées. Celles-ci permettent de calculer la pureté massique de nos produits (Tableau 9). La méthode d'exploitation des données brutes est précisée en annexe (annexe 1, p.225).

Tableau 9 : Exploitation des résultats des analyses élémentaires

Dithioester	Formule brute du dithioester pur	Pureté massique (%)	Pureté massique du produit totalement sec (%)*
	Formule brute de l'échantillon (déduite des dosages)		
MEDBA	$C_{16}H_{22}N_2O_2S_2$	98,4	98,4
	$C_{16,29}H_{22,43}N_2O_2S_{2,04} + Si_{0,01}$		
BEDBA	$C_{26}H_{38}N_4O_5S_3$	96,6	97,9
	$C_{26,53}H_{39,79}N_4O_{5,09}S_{3,09} + Si_{0,01} + 0,09 CH_2Cl_2$		
SEDBA	$C_{22}H_{29}N_1O_6S_2$	92,1	97,0
	$C_{22,63}H_{29,64}N_1O_{6,18}S_{2,07} + Si_{0,03} + 0,30 CH_2Cl_2$		
LEDBA (+H ₃ O ⁺)	$C_{53}H_{96}N_2O_{11}S_2P_1$	94,2	95,7
	$C_{55,44}H_{96,66}N_{2,11}O_{11,16}S_{2,35}P_1 + Si_{0,02} + 0,19 CH_2Cl_2$		

* totalement sec = sans aucune trace de dichlorométhane.

La présence de traces de silice colloïdale est révélée par le dosage du silicium. Celui-ci a été effectué par crainte d'une dissolution importante de silice lors de certaines purifications sur gel de silice. Ce n'est finalement pas le cas.

Les dithioesters synthétisés étant des produits très visqueux, ils ont tendance à « piéger » des molécules de solvant. Logiquement, on retrouve davantage de dichlorométhane résiduel dans le dithioester-ligand le plus visqueux (SEDBA) ou le moins séché sous vide (LEDBA). En négligeant ces traces de solvant, la pureté massique calculée est supérieure à 95%.

III-6. Conclusion

La synthèse des dithioesters-ligands biologiques à partir du dithioester précurseur, SEDB, ne présente que peu de différences avec la synthèse du dithioester-ligand modèle (MEDBA). Les conditions de synthèse optimisées pour les ligands aminés ont été étendues à l'utilisation de ligand sous forme ammonium. Considérant le degré élevé de pureté souhaité, le rendement de synthèse après purification de ces dithioesters-ligands d'intérêt biologique est satisfaisant.

Conclusion du chapitre 2

La fonctionnalisation des agents RAFT est une stratégie déjà largement développée (cf. chapitre 1 § III-3). Cependant, le faible rendement de synthèse de ces agents constitue souvent le point faible en vue de leur utilisation dans le procédé RAFT. Ainsi, les stratégies de synthèse simples et efficaces d'agents fonctionnels basées sur un agent RAFT précurseur sont généralement valorisées.

Par ailleurs, la liaison résultant du couplage entre un composé d'intérêt et l'agent RAFT précurseur étant conservée après polymérisation, sa nature est primordiale pour la stabilité du conjugué. Ainsi, une liaison amide est, par exemple, privilégiée en comparaison à une liaison ester (potentiellement hydrolysable). Un tel choix implique l'utilisation de composés d'intérêt aminés et d'un agent RAFT précurseur portant une fonction acide carboxylique. Malheureusement, les dithioesters étant très sensibles à l'aminolyse, le rendement de couplage est très faible. Ce rendement de couplage peut être amélioré par l'activation *in situ* de la fonction acide sans pour autant éliminer entièrement la réaction compétitive de thioamidation. Selon la nature du composé d'intérêt, la purification du mélange de produits obtenus peut s'avérer très problématique.

Ce chapitre a démontré que l'introduction préalable d'une fonction ester activé de type oxysuccinimide au sein d'un dithioester permet de contourner efficacement le problème de réactivité des dithioesters précurseurs vis-à-vis des amines primaires.

La synthèse de deux dithiobenzoates précurseurs, nommés SEDB et SCBDB, portant une fonction ester activé de type oxysuccinimide a été présentée.

Le rendement final de la synthèse du SEDB est d'environ 45%. Il est certes modeste mais reste dans l'ordre de grandeur habituel de la synthèse d'agents RAFT. De plus, des pistes sérieuses d'optimisation de cette synthèse ont été exposées.

L'atout majeur du SEDB réside dans la présence d'une fonction ester activé relativement stable ce qui rend le produit isolable et stockable. Cependant, il reste relativement fragile et il convient de le conserver sous atmosphère inerte (azote) à basse température (-20°C).

La réactivité très supérieure des fonctions ester activé de type oxysuccinimide vis-à-vis des amines primaires, en comparaison à celle des fonctions dithioesters, a clairement été démontrée par l'utilisation d'un composé aminé modèle (l'aminoéthylmorpholine) : la réaction compétitive et indésirable de thioamidation est évitée tant que la stœchiométrie 1/1 ester activé/amine primaire est respectée.

Ainsi, il est conseillé d'avoir une idée précise du degré de pureté du SEDB utilisé. Si cela n'est pas le cas, un suivi très simple de la réaction d'amidation par CCM peut être envisagé pour vérifier l'absence de formation de sous-produits. Cette technique permet entre autres d'utiliser du SEDB partiellement dégradé. Une limitation à l'utilisation de SEDB dégradé consiste à ne pas utiliser un composé aminé sous forme ammonium ($-\text{NH}_3^+$). En revanche, l'utilisation d'un composé- NH_3^+ et de triéthylamine avec du SEDB pur ne pose pas de problème.

Les conditions de synthèse de dithioesters fonctionnels à partir du SEDB, préalablement optimisées avec le composé aminé modèle, ont été étendues à la synthèse de plusieurs dithioesters-ligands d'intérêt biologique. Ainsi, un dithioester-biotine, un dithioester-sucre et un dithioester-lipide ont été facilement obtenus. Après des purifications minutieuses, les rendements de synthèse sont d'environ 70%. Les caractérisations complètes

de ces dithioesters (RMN ^1H , RMN ^{13}C , analyses élémentaires, spectrométrie de masse) ont fourni la signature de produits purs (>95%).

Cette pureté optimale des dithioesters-ligands les rend aptes à être utilisés dans le procédé RAFT. La nature du SEDB et de ses dérivés a été choisie pour assurer un contrôle efficace de la polymérisation de monomères variés, en particulier ceux de la famille des acrylamides (ou des acrylates). Il convient maintenant de s'en assurer... cela constitue le corps du chapitre 3.

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des synthèses de dithioesters-ligands.

Dithioester (DT)	M (g/mol)	Synthèse et purification						Caractérisations			
		Réactifs	Lavages à l'eau	Séchage MgSO ₄ *	Purification sur silice	Perte de produit	Rendement final	Pureté massique (µanalyse)	MS FAB	RMN ¹ H / ¹³ C	
DT-précurseur SEDB	323,4	Synthèse organique en 2 étapes (PhMgBr + CS ₂ + « bromoacide »** puis NHS)		-	-	<i>Impossible</i> (dégradation)	-	~ 45%	97%	<i>Frag.</i> ***	OK OK
DT-morpholine MEDBA	338,5	SEDB + 1 éq.	Aminoéthyl Morpholine	Rapide	légèrement rosé	2 purifications	Purification + MgSO ₄ (+ work up)	68%	98%	OK (+1,1 ppm)	OK OK
DT-biotine BEDBA	582,8		Biotine aminée	Moyennement long	légèrement rosé	1 purification « simplifiée »	work up + MgSO ₄	72%	98%	OK (-5,6 ppm)	OK OK
DT-sucre SEDBA	467,6		Sucre aminé	Très rapide	Blanc	2 purifications	Purification (+ work up)	66%	97%	OK (+3,7 ppm)	OK OK
DT-lipide LEDDBA	1012,4		Lipide aminé + Triéthylamine	Assez long et « fastidieux »	<i>A éviter</i> (<i>adsorption</i>)	1 purification « simplifiée »	Lavages (+ work up)	69%	96%	OK (-1,0 ppm)	OK <i>Spectre incomplet</i>

* Séchage MgSO₄ : couleur du sulfate de magnésium après séchage de la phase organique contenant le dithioester ;

** « bromoacide » = acide 2-bromopropanoïque ;

*** *Frag.* : fragmentation totale du SEDB.

IV. Partie expérimentale

IV-1. Synthèse des agents RAFT

a) Synthèse du SEDB

SEDB = SuccinimidoxycarbonylEthylDithioBenzoate
ou **succinimido-2-[[2-phenyl-1-thio]thio]-propanoate**

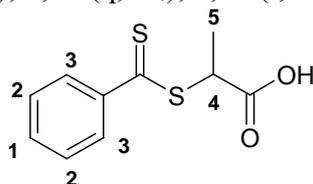
Cette synthèse présente deux étapes :

1) synthèse du CAEDB (Carboxylic Acid EthylDithioBenzoate) :

Dans un réacteur de type Schlenk conditionné sous argon, 10,3 mL d'une solution de bromure de phenylmagnésium (PhMgBr, 1 mol.L⁻¹ dans THF ; Aldrich, réf.33,137-6) est ajoutée goutte à goutte à 0°C sous agitation modérée à un mélange de 0,93 mL de disulfure de carbone (CS₂, 1,5 éq. ; Aldrich, réf.33,526-6) et d'environ 12 mL de THF. Après 1h de réaction et retour à température ambiante, 0,92 mL d'acide 2-bromopropanoïque (1éq. ; Aldrich, réf.24,119-9) est ajouté goutte à goutte. Après 42h de réaction à température ambiante, le milieu est acidifié avec 20 mL d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 2 mol.L⁻¹. La phase organique est alors lavée 2 fois à l'aide de 50 mL d'acétate d'éthyle, puis séchée par du sulfate de magnésium MgSO₄ anhydre. Après filtration puis évaporation des solvants, le produit obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Merck, Silica gel 60 ; éluant = mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole 40-65°C, 60/40, v/v). Eluant alternatif = chloroforme puis mélange chloroforme/acétone 80/20 v/v ou acétone pure (cf. § I-1.c) pour les conditions d'application) . Le produit purifié est obtenu avec un rendement d'environ 46%.

RMN ¹H :

δ (ppm, 300K, CDCl₃): 1,72 (d, H₅); 4,80 (q, H₄); 7,41 (t, H₂); 7,58 (t, H₁); 8,00 (d, H₃).



2) synthèse du SEDB :

Dans un réacteur de type Schlenk conditionné sous argon, 1,24 g du produit purifié obtenu à l'étape 1) précédente est dissous dans 80 mL de chloroforme. Après refroidissement à 5°C, 0,62 g de N-hydroxysuccinimide (NHS, 1 éq. ; Aldrich, réf.13,067-2) sont ajoutés. Après la dissolution complète du NHS, le milieu est encore refroidi à 0°C puis 1,1 g de N-N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 1 éq. ; Aldrich, réf.D8,000-2) sont ajoutés. Après 1h de réaction à 0°C puis 15h à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré puis évaporé. Après reprise à l'acétate d'éthyle et une autre filtration suivie d'une évaporation du solvant, un produit rouge orangé est obtenu. Le rendement de cette étape est d'environ 96%.

La synthèse du SEDB offre un rendement global d'environ 45%.

Caractérisation du SEDB : cf. § I-2, p.76

b) Synthèse du SCBDB

SCBDB = SuccinimidoxycarbonylCyanoButylDithioBenzoate
ou **succinimido-4-[[2-phenyl-1-thio]thio]-4-cyanopentanoate**

- Voie de synthèse = étape radicalaire puis activation :

Cette synthèse présente trois étapes :

1) synthèse du disulfure de dithiobenzoyle (d'après la procédure décrite par Sprong *et al.*¹³): Cette synthèse a lieu en deux étapes. Du bromure de phénylmagnésium (PhMgBr, 0,03 mol) réagit avec du disulfure de carbone (CS₂, 0,03 mol) dans le THF. De l'eau (30 mL) est ensuite ajoutée pour hydrolyser le magnésien obtenu. Les sels de magnésium sont filtrés et le filtrat est ensuite acidifié par l'acide chlorhydrique fumant (environ 5g). La solution se colore et démixe en deux phases à pH = 1. La phase organique est alors extraite avec de l'éther en trois fois (3*40mL). Les phases éther sont rassemblées et séchées sur sulfate de magnésium MgSO₄ anhydre, puis le solvant est évaporé. L'huile obtenue (acide dithiobenzoïque) est reprise dans 50 mL d'éthanol et quelques grains de diode I₂ sont ajoutés. On ajoute également 4,7 g de DMSO (0,06 mol) goutte à goutte. Au bout de quelques minutes des cristaux roses de disulfure de dithiobenzoyle se forment et la cristallisation est alors poursuivie à 0°C pendant une nuit. Les cristaux sont récupérés par filtration et séchés.

2) synthèse de l'acide 4-[[2-phenyl-1-thio]thio]-4-cyanopentanoïque :

Le disulfure de dithiobenzoyle (1 équivalent) obtenu à l'étape 1) précédente, et du 4,4'-Azobis(4-cyanopentanoïque) (ACPA, 1,5 équivalent) sont dissous dans de l'acétate d'éthyle. Le mélange est chauffé à reflux pendant 12 heures. Le produit formé est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice.

3) synthèse du SCBDB :

Le produit purifié obtenu à l'étape 2) précédente est dissous dans du chloroforme. Après refroidissement à 0°C, 1 équivalent de N-hydroxysuccinimide sont ajoutés. Après la dissolution du NHS, 1 équivalent de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide sont ajoutés. Après 1h de réaction à 0°C puis 22h à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré puis évaporé. Après deux reprises à l'acétate d'éthyle suivies de l'évaporation du solvant, un produit cristallisé rose est obtenu. Le rendement de cette étape est d'environ 80%.

Spectre RMN ¹H : Figure 10, page suivante.

- Voie de synthèse = activation puis étape radicalaire:

Cette synthèse présente trois étapes :

1) synthèse du disulfure de dithiobenzoyle : idem voie « étape radicalaire puis activation »

2) synthèse de l'ACPS :

Une solution d'acide 4,4'-azobis-[4-cyanopentanoïque] (ACPA, 2.42 g, 8.6 mmol) et de N-Hydroxysuccinimide(NHS, 2.98 g, 25.9 mmol) dans le dioxane est dégazée par un flux d'azote pendant une heure. De la N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 7.14g, 34.6 mmol) est ensuite lentement ajoutée à 15°C sous agitation vigoureuse. Après 15 heures de réaction à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré. Le composé azo obtenu (ACPS) est purifié par deux précipitations dans le cyclohexane et l'éther diéthylique à 4°C.

3) synthèse du SCBDB :

Dans un ballon conditionné sous argon, une solution dégazée d'ACPS (945 mg, 1.99 mmol) et de disulfure de dithiobenzoyle (407 mg, 1.33 mmol) dans l'acétate d'éthyle est chauffée à reflux à 80°C pendant 16 heures. Après filtration et séchage sous vide, un produit cristallisé orange est obtenu.

L'analyse par RMN ^1H révèle la présence d'une quantité importante d'impuretés.

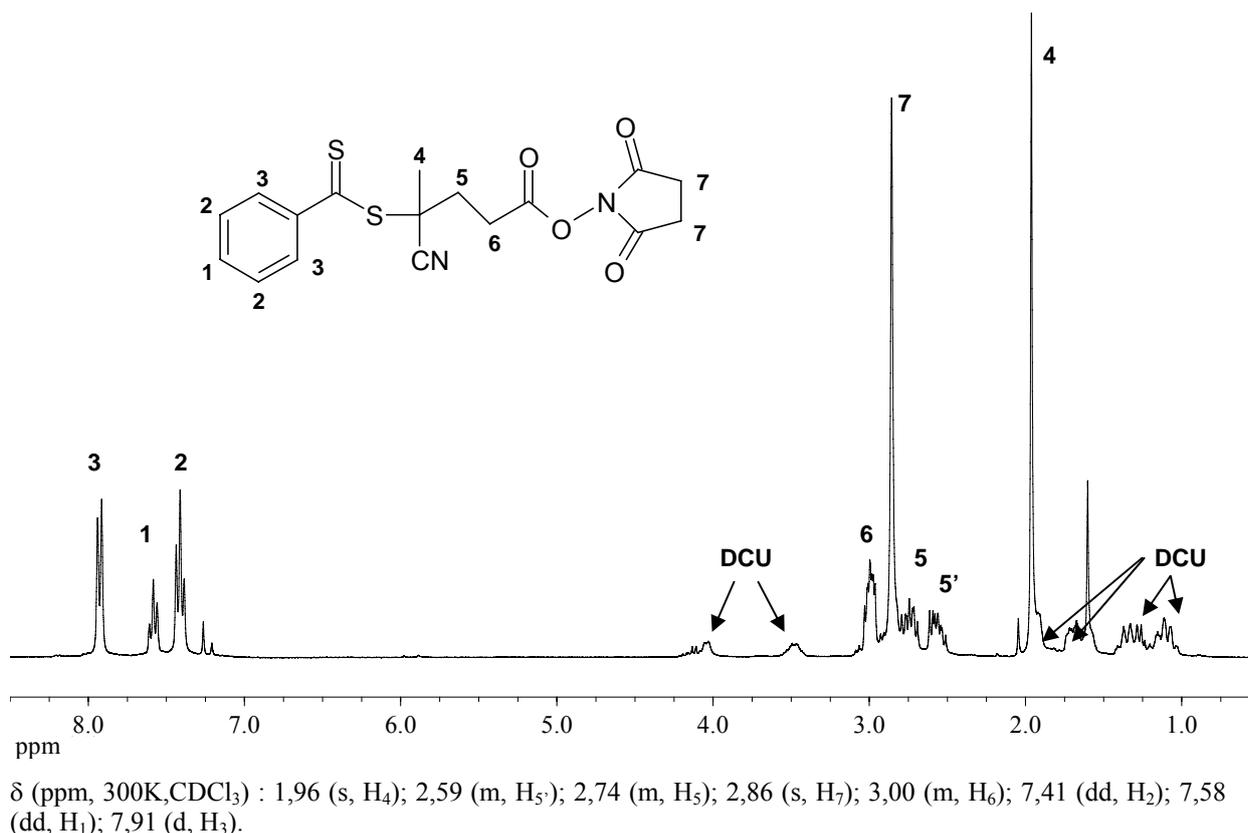


Figure 10 : Spectre RMN ^1H du SCBDB synthétisé par la voie « étape radicalaire puis activation »

c) Synthèse des dithioesters-ligands

- Synthèse à partir de ligands aminés R-NH_2 :

Typiquement, dans un ballon de 50mL plongé dans un bain thermostaté à 30°C et muni d'un agitateur magnétique, 100 mg de SEDB sont dissous dans 10 mL de chloroforme CHCl_3 . 1 équivalent molaire du composé aminé R-NH_2 est dissout séparément dans 5 à 10 mL de chloroforme. Cette solution de composé aminé est alors versée dans la solution de SEDB en 4 ou 5 fractions avec un temps d'attente de 15 à 20 min entre les ajouts. Le milieu réactionnel est typiquement sorti du bain thermostaté après 1h30 à 2h de réaction. 3 à 5 lavages à l'eau permutée (50 mL) sont alors réalisés. Après séchage de la phase chloroforme au sulfate de magnésium MgSO_4 anhydre, filtration et évaporation du solvant, un produit rouge orangé ou orange est obtenu. Une purification par chromatographie sur gel de silice (Silica gel 60, fourni par Merck) peut éventuellement être réalisée.

Amélioration : Dans certains cas (ex. MEDBA), la solution de composé aminé (1 équivalent) peut être ajoutée en une seule fraction à la solution de SEDB.

Ce protocole a été appliqué à un composé aminé modèle, puis à deux ligands aminés d'intérêt biologique :

- **MEDBA** = *N*-éthylMorpholine EthylDithioBenzoate Amide
ou *N*-**(2-morpholinoethyl)-2-[[2-phenyl-1-thioxo]thio]-propanamide**

Composé aminé = 4-(2-aminoéthyl)morpholine (AEM ; Aldrich, réf.A5,500-4).

Deux purifications par chromatographie sur gel de silice ont été réalisées : éluants de la 1^{ère} purification = mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle 50/50 v/v puis acétone ; éluant de la 2^{ème} purification = mélange dichlorométhane/éthanol 95/5 v/v.

- **BEDBA** = *N*-Biotine EthylDithioBenzoate Amide
ou *N*-**[8-(+)-biotinamido)-3,6-dioxaocetyl]-2-[[2-phenyl-1-thioxoethyl]thio]-propanamide**

Composé aminé = EZ-LinkTM Biotin-PEO-Amine (Pierce, réf.21346).

Deux purifications identiques par chromatographie sur gel de silice à « protocole simplifié » ont été réalisées : éluants = acétone puis mélange dichlorométhane/éthanol 70/30 v/v.

- **SEDBA** = *N*-Sucre EthylDithioBenzoate Amide
ou *N*-**[6-desoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropylidene-6- α -D-galactopyranosyl]-2-[[2-phenyl-1-thioxoethyl]thio]-propanamide**

Composé aminé = 6-amino-6-désoxy-1,2 :3,4-di-*O*-isopropylidène- α -D-galactopyranose (synthétisé à partir du 1,2:3,4-di-*O*-isopropylidène- α -D-galactopyranose selon la procédure décrite par B. Badey *et al.*²⁰).

Deux purifications par chromatographie sur gel de silice ont été réalisées : éluant de la 1^{ère} purification = mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle/éthanol 92/5/3 v/v/v ; éluant de la 2^{ème} purification = mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle/éthanol 79/20/1 v/v/v.

- Synthèse à partir de ligands aminés R-NH₃⁺ :

Dans le cas des composés aminés du type R-NH₃⁺, en plus de la procédure décrite ci-dessus, un minimum de 1 équivalent d'amine tertiaire (triéthylamine, TEA ou 4-diméthylaminopyridine, DMAP ; Aldrich, réf. respective 47,128-3 et 10,770-0) est ajouté dans la solution du composé aminé. Ceci a été appliqué dans le cas d'un lipide aminé.

- **LEDBA** = *N*-Lipide EthylDithioBenzoate Amide
ou *N*-**[1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(hexanoyl)]-2-[[2-phenyl-1-thioxoethyl]thio]-propanamide.**

Composé aminé = 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(hexanoylamine) (Avanti Polar Lipids, Inc ; réf.870125P) :

Deux purifications par chromatographie sur gel de silice à « protocole simplifié » ont été réalisées : éluants de la 1^{ère} purification = acétone puis mélange dichlorométhane/éthanol 70/30 v/v ; éluants de la 2^{ème} purification = acétate d'éthyle puis mélange dichlorométhane/éthanol 70/30 v/v. Ces deux purifications successives pourraient être remplacées par une seule purification à l'aide des éluants suivants : acétone puis acétate d'éthyle puis mélange dichlorométhane/éthanol 70/30 v/v.

IV-2. Caractérisation

a) Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les analyses par (200 MHz) et RMN ^{13}C (50 MHz) ont été effectuées à 27°C dans le chloroforme deutéré (CDCl_3) à l'aide d'un spectromètre Bruker AC 200. Certains spectres de RMN ^1H ont été enregistrés à 47°C afin d'identifier les protons labiles (en particulier ceux des traces d'eau).

- SEDB : spectre ^1H cf. p.76 ; spectre ^{13}C (nombre de scan = 1900) cf. p.77
- MEDBA : spectre ^1H cf. p.87
- MEDBA : spectre ^{13}C

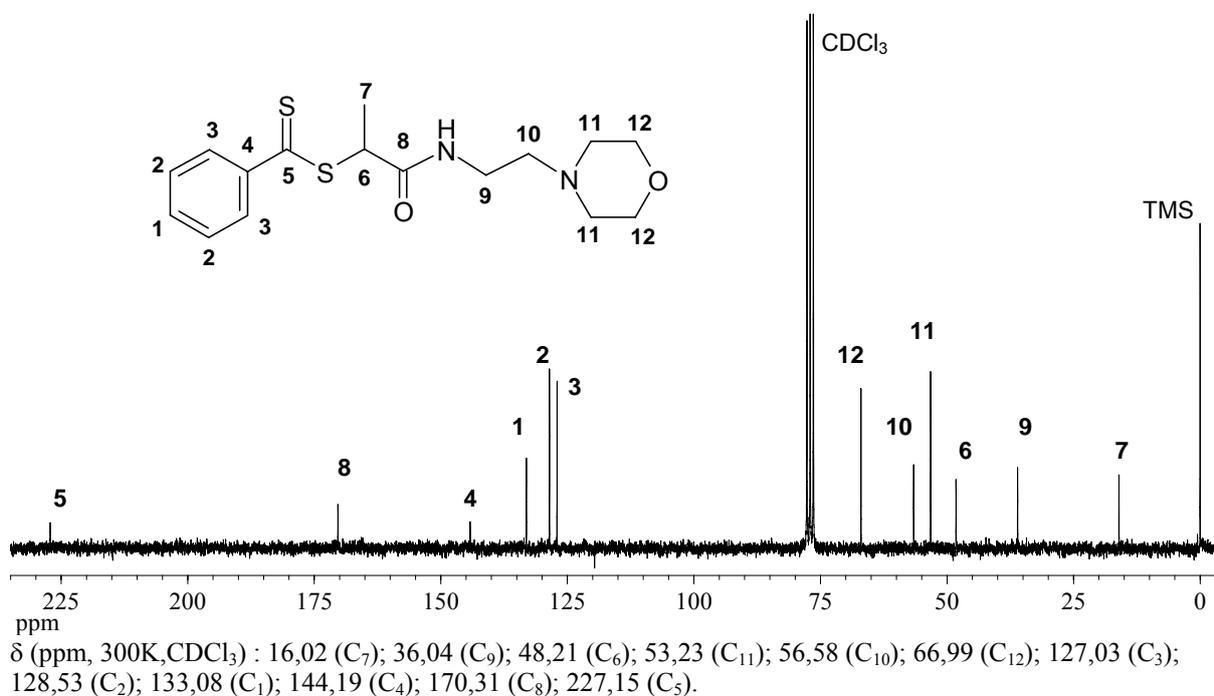
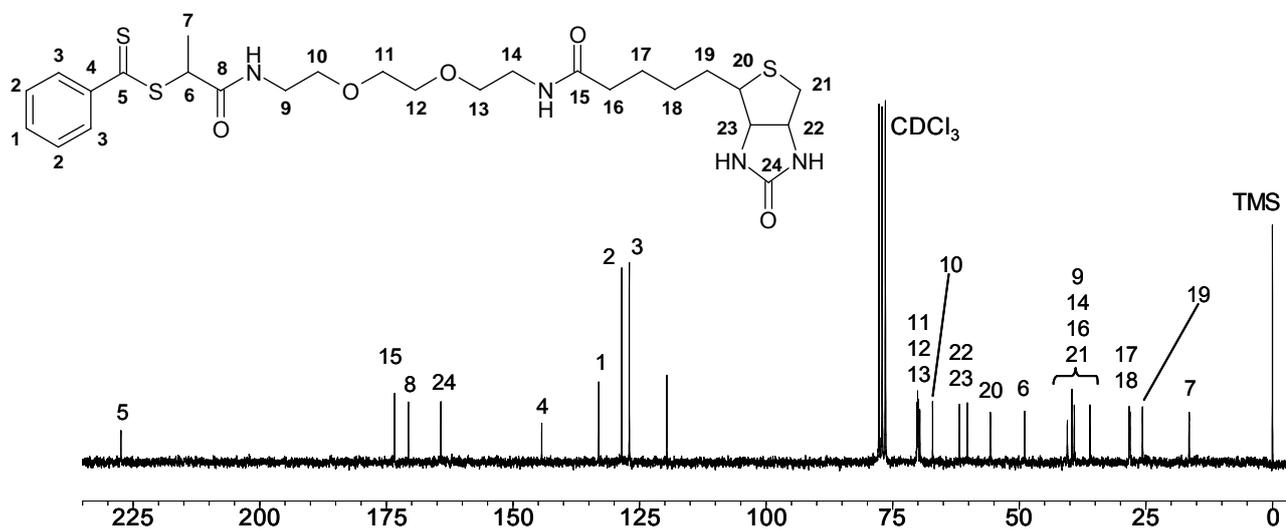


Figure 11 : Spectre RMN ^{13}C de la MEDBA purifiée (nombre de scans = 2048)

Remarque : déplacements chimiques de l'AEM : $\sim 38,5$ (C_9) ; $\sim 61,5$ (C_{10})

- BEDBA : spectre ^1H cf. p.90

- BEDBA : spectre ^{13}C



δ (ppm, 300K, CDCl_3) : 16,43 (C_7); 25,65 (C_{19}); 28,13 et 28,29 (C_{17} et C_{18}); 36,04 ; 39,12 ; 39,59 et 40,50 (C_9 , C_{14} , C_{16} et C_{21}); 48,94 (C_6); 55,69 (C_{20}); 60,26 et 61,81 (C_{22} et C_{23}); 67,09 (C_{10}); 69,65 ; 69,97 et 70,22 (C_{11} , C_{12} et C_{13}); 127,01 (C_3); 128,51 (C_2); 133,03 (C_1); 144,29 (C_4); 162,03 (C_{24}); 170,64 (C_8); 173,38 (C_{15}); 227,41 (C_5).

Figure 12 : Spectre RMN ^{13}C de la BEDBA purifiée (nombre de scans = 1450)

Remarque : Attribution des résonances de la biotine d'après le spectre RMN ^{13}C dans le $\text{DMSO}-d_6$ d'un produit biotinylé²².

- SEDBA : spectre ^1H cf. p.92
- SEDBA : spectre ^{13}C

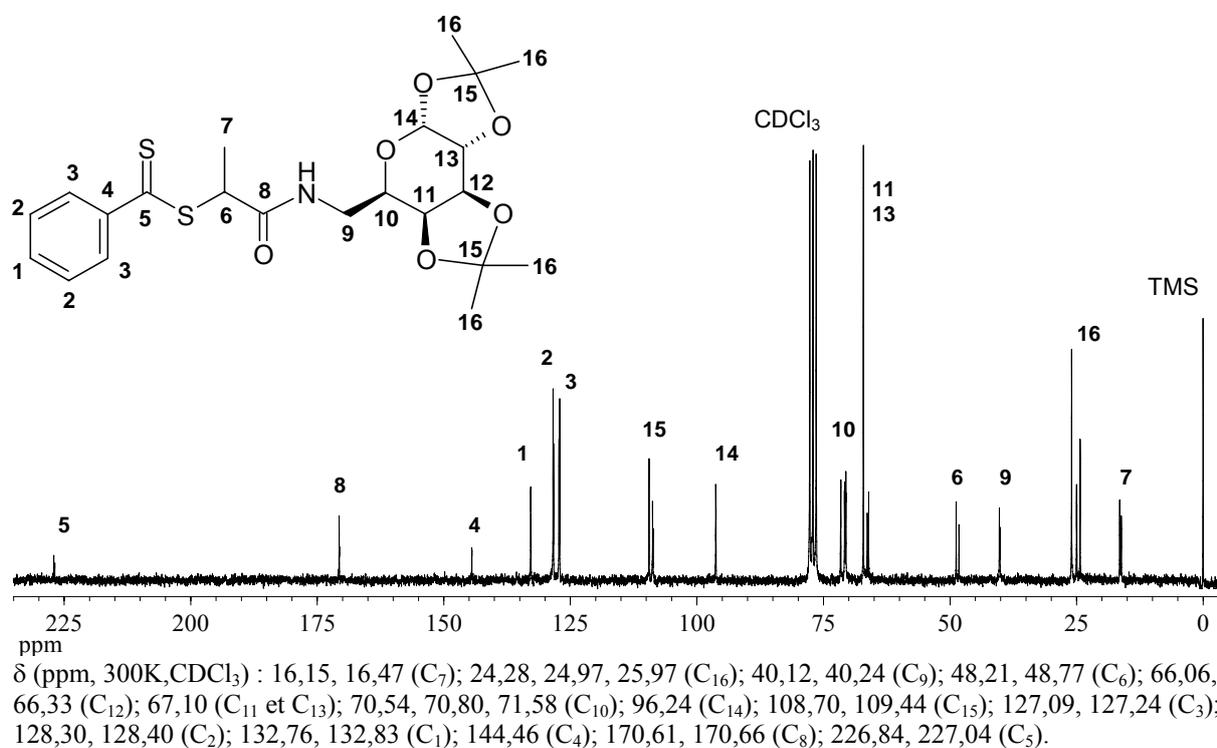
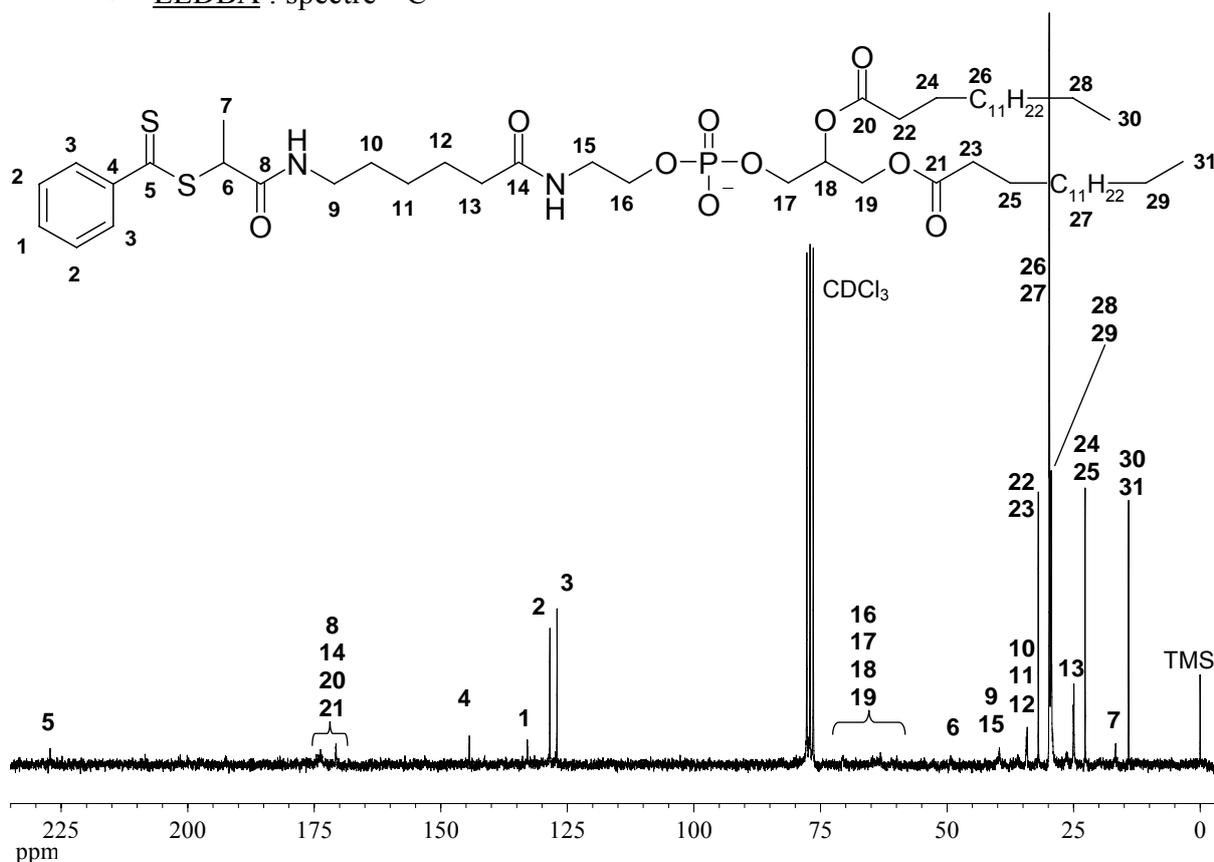


Figure 13 : Spectre RMN ^{13}C de la SEDBA purifiée (nombre de scans = 4000)

Remarques : Attribution des pics de sucre d'après le spectre RMN ^{13}C du sucre aminé initial. Tout comme le spectre ^1H , les pics sont dédoublés par la présence du sucre (cf. p.92).

- LEDBA : spectre ^1H cf. p.94
- LEDBA : spectre ^{13}C



δ (ppm, 300K, CDCl_3) : 14,11 (C_{30} et C_{31}); 16,66 (C_7); 22,70 (C_{24} et C_{25}); 24,91 (C_{13}); 29,40 (C_{28} et C_{29}); 29,74 (C_{26} et C_{27}); 31,94 (C_{22} et C_{23}); 34,11; 34,30 et 35,55 (C_{10} , C_{11} et C_{12}); 39,66 et 40,54 (C_9 et C_{15}); ~48,5 (C_6); 62,66; 63,67; 64,48 et 70,35 (C_{16} , C_{17} , C_{18} et C_{19}); 127,19 (C_3); 128,43 (C_2); 132,87 (C_1); 144,34 (C_4); 170,68 (C_8); 173,25; 173,59 et 174,94 (C_{14} , C_{20} et C_{21}); 227,14 (C_5).

Figure 14 : Spectre RMN ^{13}C de la LEDBA purifiée (nombre de scans = 2000)

Remarques : Sur le spectre ci-dessus, les signaux des carbones C_6 , C_{14} et C_{15} à C_{21} ne sont pas ou peu visibles. Cependant le carbone C_6 est attendu au même déplacement chimique que celui des autres dithioesters-ligands. Les déplacements chimiques des carbones de la partie lipidique ont été déterminés à partir du spectre du lipide aminé initial (nombre de scans = 7000).

b) Spectrométrie de masse MALDI-ToF

Les spectres de masse – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight (MALDI-ToF) ont été obtenus avec un appareil Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilisant un laser à azote (337 nm) et un potentiel d'accélération de 20kV. 200 acquisitions en mode positif (détection des cations) sont réalisées pour chaque spectre. Les masses mono-isotopiques des espèces sont mesurées en mode réflectron à l'aide d'une calibration externe (mélange de peptides de masse connue, kit Sequazyme). Les échantillons sont déposés sur la plaque d'analyse puis séchés.

Préparation des dépôts :

- Solution de dithioester-lipide à 10g/L dans le méthanol
- Solution de matrice DHB (acide 2,5-dihydroxybenzoïque) à 10g/L dans le méthanol,



acide 2,5-dihydroxybenzoïque (154,03g/mol)

- Mélange de 45 μ L de la solution de matrice + 5 μ L de solution de dithioester-lipide.
- Ajout de résine échangeuse de cation (DOWEX 50W-X8, Bio-Rad Laboratories)
(+ Ajout de 5 μ L de NaI à 10g/L dans acétone pour les cas échéants)
- Dépôt de 1 μ L de mélange, séchage.

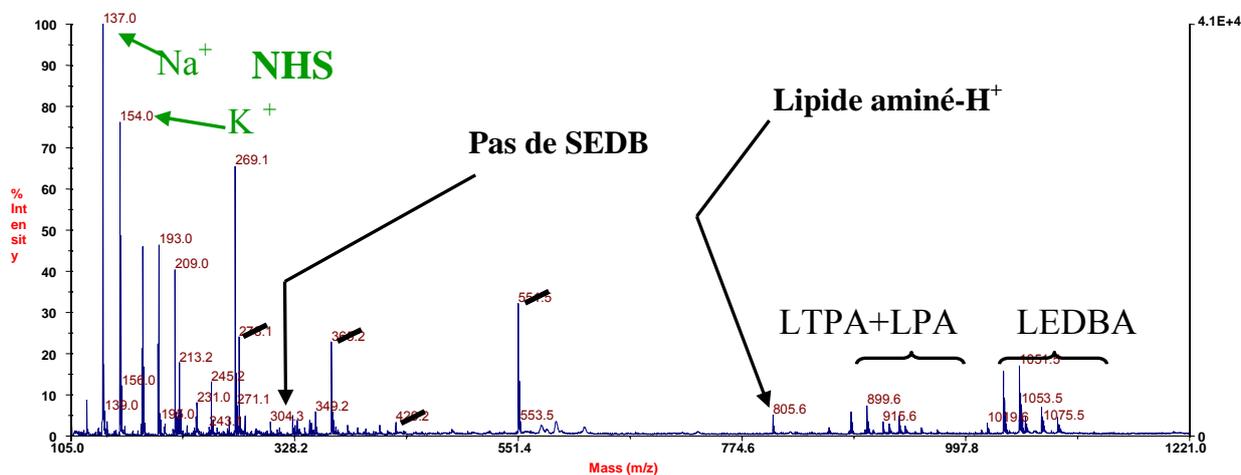


Figure 15 : Spectre de masse MALDI-ToF (mode réflectron) de la LEDBA [pics barrés = pics de la matrice]

Agrandissement de la zone 843-1095 m/z) : cf. Figure 9, p.96.

c) Analyse élémentaire et spectrométrie de masse FAB

Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées par le Service Central d'Analyse du CNRS (Solaize). Les spectres de masse ont été obtenus avec un spectromètre ZAB2-SEQ (VG, Manchester, UK) en utilisant une ionisation FAB (Fast Atom Bombardement).

Les analyses élémentaires ont également été réalisées par le Service Central d'Analyse du CNRS (Solaize). Dans certains cas, le dosage du silicium (Si) a été demandé par suite d'une suspicion de présence résiduelle de silice colloïdale. Dans un cas, le dosage du chlore a été demandé pour estimer la quantité de solvant résiduel (CH_2Cl_2) dans les échantillons.

Tableau 11 : Résultats bruts des analyses élémentaires des dithioesters synthétisés.

		C	H	N	O	S	P	Cl	Si
SEDB	% théorique	52,00	4,05	4,33	19,79	19,83	-	-	-
	% exp.	50,25	4,15	4,07	-	18,58	-	2,99	-
MEDBA	% théorique	56,77	6,55	8,28	9,45	18,95	-	-	-
	% exp.	56,86	6,57	8,15	-	19,02	-	-	0,10
BEDBA	% théorique	53,58	6,57	9,61	13,73	16,50	-	-	-
	% exp.	53,01	6,68	9,29	-	16,405	-	-	0,03
SEDBA	% théorique	56,51	6,25	3,00	20,53	13,71	-	-	-
	% exp.	54,27	6,005	2,76	-	13,105	-	-	0,16
LEDDBA	% théorique	62,88	9,16	2,77	15,80	6,33	3,06	-	-
	% exp.	61,05	8,94	2,70	-	6,89	2,83	-	0,04

Références du chapitre 2

- (1) Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Aust. J. Chem.* **2005**, *58*, 349-410.
- (2) Perrier, S.; Takolpuckdee, P. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* **2005**, *43*, 5347–5393.
- (3) Favier, A.; Charreyre, M.-T. *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 653–692.
- (4) Chen, M.; Ghiggino, K. P.; Mau, A. W. H.; Sasse, W. H. F.; Thang, S. H.; Wilson, G. J. *Macromolecules* **2005**, *38*, 3475-3481.
- (5) Lebreton, P.; Ameduri, B.; Boutevin, B.; Corpart, J.-M. *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, *203*, 522-537.
- (6) Li, C.; Benicewicz, B. C. *Macromolecules* **2005**, *38*, 5929-5936.
- (7) Delêtre, M.; Levesque, G. *Macromolecules* **1990**, *23*, 4733-4741.
- (8) ten Cate, M. G. J.; Rettig, H.; Bernhardt, K.; Börner, H. G. *Macromolecules* **2005**, *38*, 10643-10649.
- (9) D'Agosto, F.; Hughes, R.; Charreyre, M.-T.; Pichot, C.; Gilbert, R. G. *Macromolecules* **2003**, *36*, 621-629.
- (10) Thomas, D. B.; Convertine, A. J.; Myrick, L. J.; Scales, C. W.; Smith, A. E.; Lowe, A. B.; Vasilieva, Y. A.; Ayres, N.; McCormick, C. L. *Macromolecules* **2004**, *37*, 8941-8950.
- (11) McCormick, C. L.; Donovan, M. S.; Lowe, A. B.; Sumerlin, B. S.; Thomas, D. B.; WO 03/066685 A2, **2003**.
- (12) Thang, S. H.; Chong, B. Y. K.; Mayadunne, R. T. A.; Moad, G.; Rizzardo, E. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 2435-2438.
- (13) Sprong, E.; Wet-Roos, D. D.; Tonge, M. P.; Sanderson, R. D. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* **2003**, *41*, 223–235.
- (14) Zheng, Q.; Pan, C.-Y. *Macromolecules* **2005**, *38*, 6841-6848.
- (15) D'Agosto, F.; Bathfield, M.; Charreyre, M.-T.: France Patent Application Filing, July 4, 2005.
- (16) Chen, M.; Ghiggino, K. P.; Mau, A. W. H.; Rizzardo, E.; Sasse, W. H. F.; Thang, S. H.; Wilson, G. J. *Macromolecules* **2004**, *37*, 5479-5481.
- (17) Kitano, H.; Chibashi, M.; Nakamata, S.; Ide, M. *Langmuir* **1999**, *15*, 2709-2713.
- (18) Hong, C.-Y.; Pan, C.-Y. *Macromolecules* **2006**, *39*, 3517-3524.
- (19) Gody, G. **thèse en cours** réalisée au Laboratoire de Chimie Organique II (CPE-Lyon) et à l'unité mixte CNRS-bioMérieux (ENS-Lyon)
- (20) Badey, B.; Boullanger, P.; Domard, A.; Cros, P.; Delair, T.; Pichot, C. *Macromol. Chem. Phys.* **1996**, *197*, 3711-3728.
- (21) Favier, A.; Ladavière, C.; Charreyre, M.-T.; Pichot, C. *Macromolecules* **2004**, *37*, 2026-2034.
- (22) Dwight, S. J.; Gaylord, B. S.; Hong, J. W.; Bazan, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16850-16859.

Chapitre 3

Synthèse de polymères α -fonctionnels
par le procédé RAFT.

Sommaire du chapitre 3

Introduction :	116
Préliminaire : Conditions de polymérisation.	117
I. Homopolymérisation RAFT de la NAM en présence de dithioesters fonctionnels variés. ..	119
I-1. Polymérisation en présence de SEDB.....	119
I-2. Comparaison entre les différents dithioesters-ligands.	122
a) <i>Aspects cinétiques</i>	122
b) <i>Distribution des masses molaires</i>	123
I-3. Origine des chaînes de faibles masses molaires présentes en fin de polymérisation.....	125
a) <i>Raison pour laquelle il ne peut s'agir de la croissance de nouvelles chaînes</i>	126
b) <i>Fragmentation des chaînes en polymérisation conventionnelle</i>	127
c) <i>Visualisation du phénomène de fragmentation des chaînes par retraitement des données de CES/DDL</i>	128
I-4. Caractère vivant des chaînes synthétisées / Essai d'extension de chaînes.....	129
I-5. Conclusion	130
II. Analyse des extrémités de chaînes	131
II-1. RMN ¹ H.....	131
II-2. Spectrométrie de masse MALDI-ToF	134
a) <i>Détermination des M_n et I_p</i>	134
b) <i>Analyse des extrémités de chaîne</i>	135
II-3. Conclusion	141
III. Influence des extrémités de chaînes sur les analyses par chromatographie d'exclusion stérique.	142
III-1. Cas des polymères fonctionnalisés par un lipide.....	142
III-2. Influence de l'extrémité α	146
III-3. Influence de l'extrémité ω / Hydrolyse des chaînes dormantes	147
III-4. Conclusion.....	149
IV. Phénomène de « sur-retard » / Terminaison sur les radicaux intermédiaires	150
IV-1. Mise au jour du phénomène de « sur-retard ».....	150
IV-2. Hypothèses	151
a) <i>Hypothèses de la littérature expliquant le phénomène de « retard »</i>	151
b) <i>Hypothèse concernant le « sur-retard »</i>	152
IV-3. Confirmation cinétique.....	155
IV-4. Confirmation par spectrométrie de masse MALDI-ToF.....	155
IV-5. Conclusion.....	158
V. Conclusion du chapitre 3	159
VI. Partie expérimentale	161
VI-1. Réactifs.....	161
VI-2. Mode opératoire général des polymérisations RAFT	161
VI-3. Techniques de caractérisation des échantillons polymère	162
a) <i>CES/DDL en phase aqueuse</i>	162
b) <i>CES en phase solvant (THF)</i>	163
c) <i>Spectrométrie de masse MALDI-ToF</i>	163
d) <i>Diffusion quasi-élastique de la lumière</i>	164
Références du chapitre 3	166

Introduction :

Selon la stratégie choisie, si la polymérisation de type RAFT à l'aide des dithioesters-ligands biologiques préalablement synthétisés est contrôlée, elle conduira directement à des bio-conjugués (de type polymères α -fonctionnels) parfaitement définis.

La N-acryloylmorpholine (NAM) est le monomère choisi pour vérifier l'efficacité de nos agents de transfert de chaîne (ATC) bio-fonctionnalisés. Il s'agit d'un dérivé bi-substitué de l'acrylamide (Schéma 1) dont le polymère correspondant (polyNAM) possède les caractéristiques requises pour les applications envisagées (cf. chapitre 4) (hydrosoluble, biocompatible*,...).

Ce chapitre décrit ainsi les polymérisations RAFT de la NAM en présence de chacun des dithioesters qui ont été synthétisés et présentés dans le chapitre 2 (Schéma 2). Une attention particulière a été portée sur l'évolution de la distribution des masses molaires en fonction de la conversion et sur la conservation du ligand biologique après polymérisation. Pour cela, de nombreuses caractérisations ont été effectuées par différentes techniques d'analyse indépendantes telles que la chromatographie d'exclusion stérique (CES), la RMN ^1H , ou encore la spectrométrie de masse MALDI-ToF. Des aspects cinétiques sont également discutés dans ce chapitre, particulièrement dans le cas de l'utilisation du dithioester-morpholine.

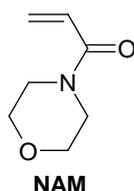


Schéma 1 : Structure de la N-acryloylmorpholine (NAM)

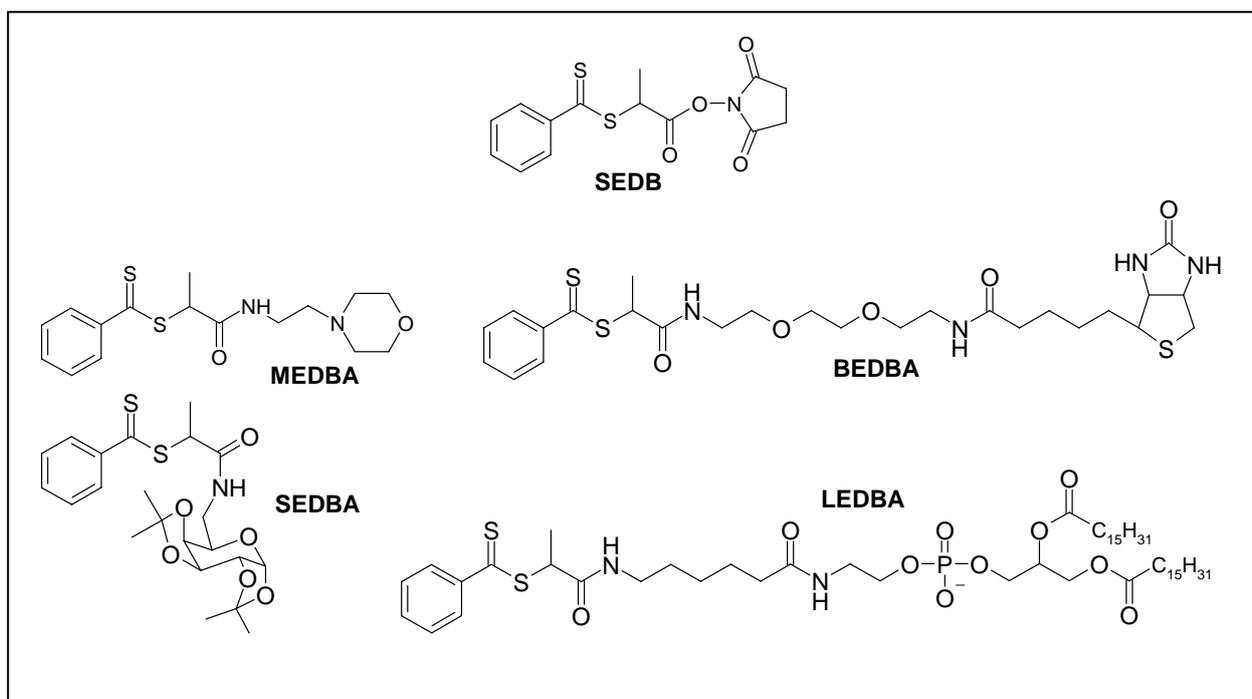
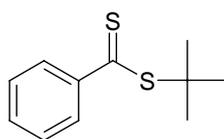


Schéma 2 : Rappel de la structure des dithioesters synthétisés au chapitre 2.

* biocompatible au moins pour les applications *in vitro*.

Préliminaire : Conditions de polymérisation.

La polymérisation radicalaire de la NAM a été très largement étudiée au laboratoire : en particulier, un travail fondamental sur les paramètres influençant le contrôle de son homopolymérisation par le procédé RAFT a été réalisé lors d'une thèse précédente^{1,2}. Ce travail a mis en évidence l'excellent contrôle de la polymérisation de la NAM par le dithiobenzoate de *tert*-butyle (DBtB, Schéma 3). De plus, il est ressorti de cette étude que le rapport molaire $[ATC]_0/[Amorceur]_0$ est un paramètre primordial pour assurer un bon contrôle de la polymérisation. Avec un **rapport $[ATC]_0/[AIBN]_0$ égal à 10**, la polymérisation de la NAM à 90°C est relativement rapide (plateau de conversion d'environ 80% atteint en moins de deux heures) et conduit à des chaînes parfaitement contrôlées (M_n très proches des valeurs théoriques et $I_p < 1,1$). Un rapport $[ATC]_0/[AIBN]_0$ égal à 3,3 permet également d'obtenir des chaînes bien contrôlées tout en augmentant le plateau de conversion à 90%.



DBtB

Schéma 3 : Structure du dithiobenzoate de *tert*-butyle (DBtB)

Cependant, dans le cadre de la synthèse de bio-conjugués par le procédé RAFT, il est judicieux de maximiser la proportion de chaînes α -fonctionnalisées. Ainsi, comme cela a déjà été mentionné dans la partie « RAFT » du chapitre 1 (§ III-3, p.48), l'utilisation d'un rapport molaire $[ATC]_0/[Amorceur]_0$ le plus élevé possible est souhaitable. En effet, d'après le mécanisme de la polymérisation RAFT et en supposant une décomposition totale de l'amorceur (AIBN)^{**}, l'utilisation d'un rapport égal à 3,3 conduit à 23% de chaînes amorcées par l'AIBN, alors qu'en utilisant un rapport égal à 10 la proportion de cette population (chaînes non fonctionnalisées) est limitée à 9%^{***}. En l'absence d'une formation inattendue d'autres types de chaînes, **on peut donc s'attendre à un taux de fonctionnalisation d'au moins 91%**.

Conditions de polymérisation communes à tous les essais de ce chapitre 3 :

- $[NAM]_0 = 1,6 \text{ mol/L}$.
- $[ATC]_0/[AIBN]_0 = 10$.
- **température de polymérisation = 90°C.**
- **polymérisation sous azote dans du dioxane distillé.**
- $[NAM]_0/[ATC]_0 = 355 \text{ ou } 28$

Le rapport initial $[NAM]_0/[ATC]_0$ est fixé par la masse molaire moyenne visée à 100% de conversion. Dans nos essais, celle-ci se réfère à la masse d'un « bloc » polyNAM indépendamment de la masse de l'agent RAFT initial. Ce rapport est déterminé d'après l'équation simplifiée du degré de polymérisation moyen théorique DP_n :

^{**} 99% de l'AIBN est décomposé après 100 min à 90°C. Valeur calculée à partir de $k_d = 2,53 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ à 65,3 °C dans un mélange dioxane/eau 80/20, $E_A = 141 \text{ kJ/mol}$ (Masson, J. C. In *Polymer Handbook 3ème ed.*; 3rd éd.; Wiley, Ed.; Brandrup, J. Immergut, E.H., 1989, pp II-1.) et $k_d = A \cdot \exp(-E_A/RT)$.

^{***} en supposant une valeur du facteur d'efficacité de l'amorceur de 0,5.

$$DP_n \approx \frac{[NAM]_0}{[ATC]_0} \times \text{Conversion} \quad (1)$$

$$[\text{et } M_n \text{ visée} = DP_n \times M_{NAM}]$$

Cette équation simplifiée découle de l'équation plus complète suivante³ qui prend en compte la proportion de chaînes amorcées par l'amorceur et la proportion de chaînes terminées par couplage :

$$DP_n = \frac{[NAM]_0 \times \text{Conversion}}{f'[ATC]_0 + 2f[AIBN]_0(1 - e^{-k_d t})(1 - f_c/2)} \quad (2)$$

$$[\text{et } M_n = DP_n \times M_{NAM} + M_{EC}] \quad (3)$$

où $[NAM]_0$, $[ATC]_0$ et $[AIBN]_0$ sont les concentrations initiales respectives en monomère, en agent de transfert de chaîne et en amorceur ;

f et k_d sont respectivement le facteur d'efficacité et la constante de vitesse de décomposition de l'amorceur ;

M_{NAM} et M_{EC} sont respectivement les masses molaires du monomère et des extrémités de chaîne.

f_c est la proportion de terminaison par couplage par rapport à l'ensemble des événements de terminaison.

f' est le facteur d'efficacité d'amorçage de l'agent de transfert de chaîne, c'est-à-dire la proportion de l'ATC qui conduit effectivement à des chaînes polymères (amorcées par le fragment amorceur de l'ATC).

t est la durée de polymérisation.

Ainsi, en utilisant un rapport $[ATC]_0/[AIBN]_0$ élevé (égal à 10), le second terme du dénominateur de l'équation 2 devient négligeable et l'approximation du degré moyen de polymérisation selon l'équation simplifiée 1 est justifiée. De plus, dans l'équation 3 le terme M_{EC} dépend en toute rigueur de la nature exacte des extrémités de chaque chaîne³, mais en négligeant la proportion de chaînes amorcées par l'AIBN et celle des chaînes mortes (formées par terminaison ou transfert irréversible), ce terme peut être assimilé à la masse de l'agent RAFT initial (M_{ATC}). Dans notre cas, cette masse est relativement négligeable en comparaison des masses molaires des polymères synthétisés (en général 50000 g/mol). Ainsi, la droite théorique (M_n théo.) présentée dans les figures de ce chapitre ne tient pas compte de la masse de l'agent RAFT utilisé :

$$M_n \text{ théo.} = \frac{[NAM]_0}{[ATC]_0} \times \text{Conversion} \times M_{NAM}$$

L'utilisation de dithioesters parfaitement caractérisés et de degré de pureté connu permet d'ajuster avec précision la quantité d'agent de contrôle introduit dans le milieu de polymérisation. Par ailleurs, la technique de mesure des masses molaires utilisée (chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur de diffusion de la lumière, CES/DDL) permet d'accéder à des valeurs absolues. La position relative des points expérimentaux par rapport à la droite théorique peut donc être exploitée pour juger l'efficacité des dithioesters testés.

De plus, l'allure de la distribution des masses molaires *via*, entre autres, la valeur de l'indice de polymolécularité (I_p) ainsi que les caractéristiques cinétiques propres à la technique RAFT (période d'induction, retard) sont discutées dans ce chapitre.

I. Homopolymérisation RAFT de la NAM en présence de dithioesters fonctionnels variés.

L'étude sur une éventuelle influence des ligands biologiques (biotine, lipide ou sucre) présents dans l'agent de contrôle, sur la polymérisation RAFT, a été réalisée par une série de polymérisations de la NAM où la masse molaire visée à 100% de conversion est de 50000 g/mol ($[NAM]_0/[ATC]_0 = 355$).

Auparavant, le comportement du SEDB a été étudié dans les conditions de polymérisation RAFT de la NAM optimisées précédemment dans le cas du DBtB².

I-1. Polymérisation en présence de SEDB.

La principale différence en terme de polymérisation RAFT entre le SEDB et le DBtB concerne le fragment radical libéré : le DBtB génère un fragment radical tertiaire (le radical *tert*-butyl) alors que le SEDB (et ses dérivés) génèrent un fragment radical secondaire.

D'une manière générale, l'efficacité d'un dithioester est garantie lorsque le fragment ré-amorceur, R° , est « un peu plus stabilisé »* que le radical propageant Pn° . Ainsi, dans l'étape de pré-équilibre (cf. mécanisme général p.67), cela favorise la fragmentation du radical intermédiaire de telle sorte que R° soit libéré, accélérant ainsi la vitesse de consommation de l'agent RAFT initial (si l'étape de ré-amorçage n'est pas une étape limitante). Selon cette règle, un fragment R° tertiaire est adéquat pour la polymérisation des monomères présentant un radical propageant secondaire : c'est le cas du couple DBtB/NAM. L'efficacité d'un dithioester correspondant à un radical R° secondaire vis-à-vis du même type de monomères dépend alors de la stabilité relative entre les deux radicaux secondaires (substituants, effets électroniques et/ou stériques).

La Figure 1 présente les cinétiques de polymérisation ainsi que l'évolution des masses molaires moyennes en nombre et des indices de polymolécularité avec la conversion en présence de DBtB ou de SEDB : cette comparaison n'indique aucune différence significative entre les deux dithiobenzoates.

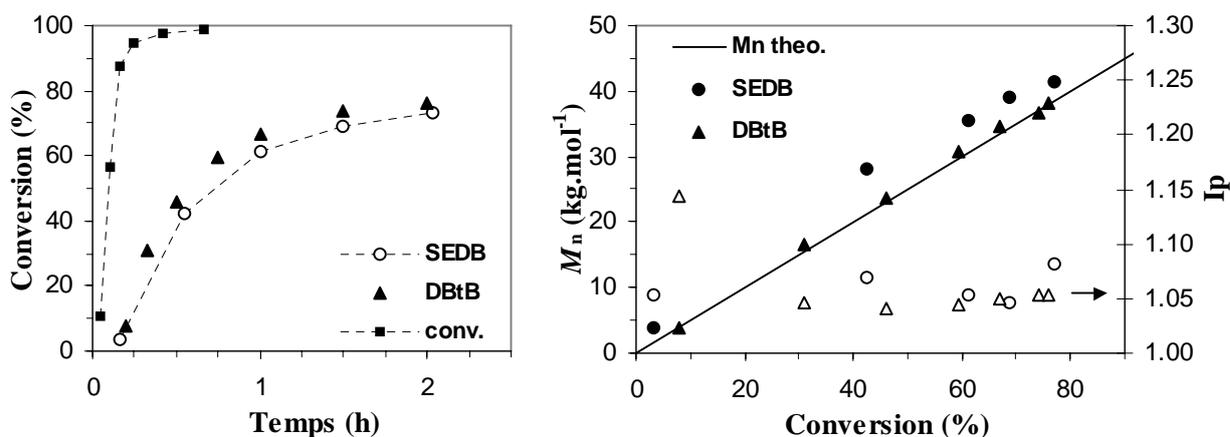


Figure 1 : Comparaison SEDB/DBtB vis-à-vis de la polymérisation RAFT de la NAM (conv. = polymérisation conventionnelle sans agent RAFT dans les mêmes conditions). [cond. exp. : cf. p.117 ; $[NAM]_0/[ATC]_0 = 355$]

* Il ne faut pas que ce radical soit trop stabilisé : il n'assurerait pas correctement l'étape de réamorçage.

En comparaison avec la cinétique de polymérisation radicalaire conventionnelle (notée **conv.** dans la Figure 1), les polymérisations RAFT de la NAM sont significativement plus lentes : on dit qu'elles sont retardées. L'origine possible de ce **phénomène de retard**, qui n'est pas prévu par les équations cinétiques correspondant au mécanisme RAFT habituel (cf. mécanisme général p.67), est le sujet de nombreuses publications : les deux principales hypothèses exposées dans la littérature sont discutées à la fin de ce chapitre (§ IV, p.150). Le cœur du problème se situe au niveau de l'équilibre principal de la polymérisation RAFT : celui-ci ne devrait théoriquement pas modifier la concentration en radicaux propageant par rapport à une polymérisation conventionnelle. Or, une cinétique plus lente semble indiquer une concentration en radicaux propageant plus faible.

Les deux cinétiques de polymérisation RAFT de la Figure 1 sont identiques et présentent une courte **période d'induction** d'environ 5-10 min. Cette période d'induction, au cours de laquelle la conversion n'est pas nulle mais stagne à quelques pourcents, est caractéristique des polymérisations de type RAFT. Elle est corrélée à l'existence du pré-équilibre ; comme récemment confirmé par l'équipe de P. Vana⁴, la constante de vitesse d'addition k_{add} sur l'agent RAFT initial serait plus grande de deux ordres de grandeur par rapport à la constante de vitesse d'addition k'_{add} sur une chaîne dormante. Les valeurs des constantes de vitesse ont été déterminées à l'aide de simulations de type Monte Carlo qui s'ajustent particulièrement bien avec les points expérimentaux de la polymérisation de l'acrylate de méthyle en présence du dithiobenzoate de cumyle. Ainsi, pendant le pré-équilibre, la valeur de k_{add} serait supérieure à k_p et k'_a de 7 ordres de grandeur^{4, **}. Les radicaux seraient préférentiellement « occupés » par l'étape de pré-équilibre plutôt qu'« occupés » à additionner du monomère. Les événements de propagation étant de ce fait très peu fréquents, la vitesse de polymérisation serait extrêmement ralentie à tel point que les mesures de conversion semblent indiquer une stagnation. Cette pseudo-stagnation pourrait alors être vue comme une période de très fort retard². Il faut alors attendre un taux de consommation significatif de l'agent RAFT pour sortir de la période d'induction : les chaînes dormantes, possédant une valeur de k'_{add} plus modérée, « laissent » la possibilité aux radicaux de propager.

Les radicaux R° impliqués dans le pré-équilibre peuvent « régénérer » l'agent RAFT initial. La probabilité de cette réaction est réduite par la présence de l'étape de ré-amorçage. Une valeur de la constante de vitesse de ré-armorçage k'_a relativement élevée est donc essentielle pour consommer rapidement l'agent RAFT initial. Une valeur relativement faible pourrait ainsi participer à allonger la période d'induction^{***}. Dans le cas d'une longue période d'induction, l'utilisation d'un agent RAFT possédant un groupe R° qui mime la nature du radical propageant peut être une méthode de réduction de la durée de la période d'induction⁵. Dans la même logique, les essais d'extension de chaîne, c'est-à-dire l'utilisation de chaînes dormantes comme macro-agent RAFT pour contrôler la polymérisation du même monomère, présentent également une période d'induction, mais elle est bien plus courte (voire nulle)^{2,5}.

Dans le cas du SEDB ou du DBtB, la période d'induction est courte (5-10min) : une stratégie de réduction de cette période n'a donc pas été envisagée.

** k_p : constante de vitesse de propagation ; k'_a : constante de vitesse de ré-amorçage. Dans les simulations mentionnées, les auteurs ont considéré ces deux valeurs comme étant égales.

*** Même si cela n'est pas la seule cause de la présence d'une période d'induction en polymérisation RAFT.

L'évolution des masses molaires moyennes en nombre avec la conversion ainsi que celle des indices de polymolécularité, sont identiques avec le SEDB et le DBtB : les valeurs de M_n croissent linéairement avec la conversion et sont très proches des valeurs théoriques ; les valeurs de I_p sont très faibles, aux alentours de 1,05. On peut cependant noter que les M_n correspondant à l'essai avec le SEDB sont légèrement supérieurs aux valeurs théoriques. Cela a été attribué à une concentration initiale en fonction dithioester un peu plus faible que prévue suite à l'utilisation de SEDB partiellement dégradé (cf. chapitre 2, § I-1.d, p.75). Un tel écart entre les masses expérimentales et théoriques correspondrait à une dégradation du SEDB de 12%.

Cette comparaison entre le SEDB et le DBtB indique qu'il n'y a **pas d'effet de la nature du fragment radical R° (respectivement secondaire ou tertiaire) vis-à-vis de la polymérisation RAFT de la NAM**. Ce monomère ayant une constante de vitesse de propagation, k_p , élevée, les radicaux propageant sont peu stabilisés. Ainsi, un radical R° secondaire semble suffisamment stabilisé pour induire la fragmentation du radical intermédiaire (du pré-équilibre) de telle sorte que R° soit libéré (fragmentation préférentielle du côté du radical le plus stabilisé).

D'autre part, même si ce n'est pas la voie de synthèse de bio-conjugués choisie dans cette étude, la polymérisation RAFT en présence de SEDB permet d'obtenir des chaînes polymère dont l'extrémité α porte une fonction ester activé. A notre connaissance, de tels polymères n'étaient jusqu'à présent accessibles que par la technique ATRP^{6,7} (cf. chapitre 1, p.16) à l'aide d'un amorceur portant la même fonction ester activé.

I-2. Comparaison entre les différents dithioesters-ligands.

L'efficacité des quatre dithioesters-ligands synthétisés au chapitre 2 (Schéma 4) a été comparée lors d'une série de polymérisation RAFT de la NAM (cond. exp. : cf. p.117).

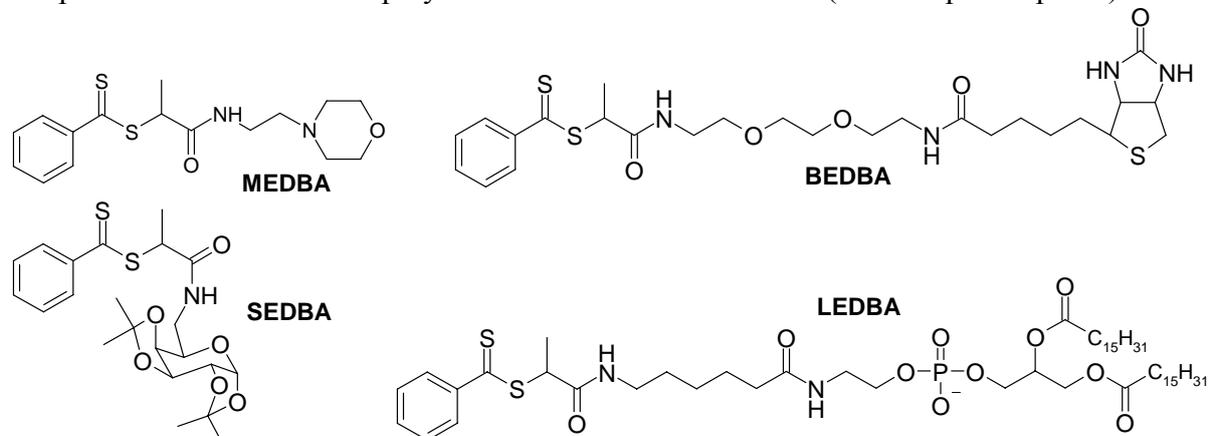


Schéma 4 : Rappel de la structure des dithioesters-ligands synthétisés au chapitre 2.

a) Aspects cinétiques

Les cinétiques de polymérisation RAFT de la NAM en présence des quatre dithioesters-ligands sont compilées dans la Figure 2 : elles sont identiques et se superposent à celle du SEDB.

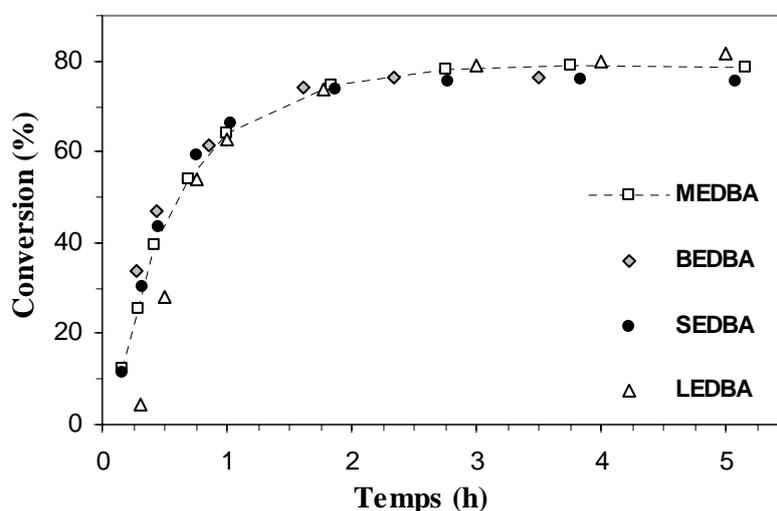


Figure 2 : Cinétiques de polymérisation RAFT de la NAM en présence de dithioester-ligand [cond. exp. : cf. p.117 ; $[NAM]_0/[ATC]_0 = 355$].

La Figure 2 met en évidence **l'absence d'influence significative de la nature du ligand vis-à-vis de la cinétique de polymérisation RAFT de la NAM.**

L'environnement électronique de la liaison C-S de l'agent RAFT et des radicaux ré-amorceurs R° est similaire quel que soit le dithioester-ligand considéré. L'absence d'effet due à la nature du ligand était donc prévisible d'un point de vue des effets électroniques.

En revanche, le groupe R présente un encombrement stérique assez différent selon le ligand considéré : les masses molaires des fragments radicaux R° sont respectivement de 185, 314, 429 et 859 g/mol pour les fragments « morpholine », « sucre », « biotine » et « lipide ». D'après les résultats cinétiques, l'effet de cette différence d'encombrement stérique est nul en ce qui concerne les trois premiers. Cependant, dans le cas de la LEDBA, une période d'induction un peu plus longue est observée, et cela de manière reproductible : ~10-15 min. (~5-10 min. pour les autres cas). **Une vitesse de fragmentation du radical intermédiaire correspondant à la LEDBA, un peu plus faible que celle des autres dithioesters-ligands et/ou une vitesse de ré-amorçage plus lente** (due à un fragment radical plus volumineux ?) pourrait peut-être expliquer cette légère différence.

Remarque importante : seule l'utilisation de dithioesters-ligands minutieusement purifiés et présentant des degrés de pureté similaires (>95%) permet une comparaison fiable des quatre dithioesters-ligands synthétisés. En effet, dans le cas de l'utilisation de dithioesters non purifiés, les cinétiques de polymérisation de la NAM se révèlent non reproductibles et présentent généralement une valeur du plateau de conversion plus faible (cf. annexe 4, p.232).

b) Distribution des masses molaires

L'évolution de l'allure des chromatogrammes d'exclusion stérique en fonction de la conversion est illustrée par la Figure 3 (exemple de la polymérisation en présence de MEDBA) : comme attendu, les pics se décalent vers des volumes d'éluion plus faibles. Les essais avec la BEDBA et la SEDBA fournissent également le même type de chromatogrammes. Le cas de la polymérisation en présence de LEDBA, qui conduit à des polymères fonctionnalisés par un lipide donc amphiphiles, est détaillé dans le paragraphe III-1 (p.142).

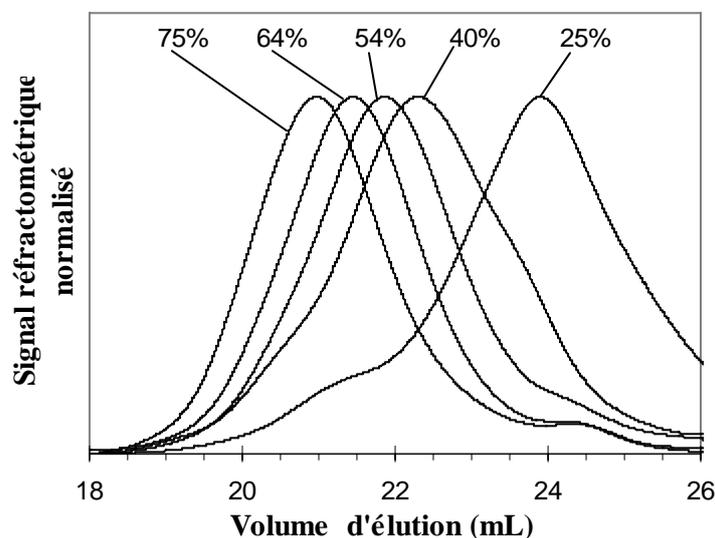


Figure 3 : Evolution des chromatogrammes d'exclusion stérique avec la conversion pour la polymérisation de la NAM en présence de MEDBA [cond. exp. : cf. p.117 ; $[NAM]_0/[ATC]_0 = 355$].

Remarque : la nature de l'épaule visible du côté des faibles volumes d'éluion est explicitée dans le paragraphe III-3 (p.147). [L'épaule présente aux alentours des 24 mL correspond à un artefact d'injection uniquement visible sur le signal réfractométrique]

L'exploitation combinée du signal réfractométrique et du signal issu de la détection par diffusion de lumière, permet de déterminer les valeurs absolues des M_n ainsi que des I_p (Figure 4).

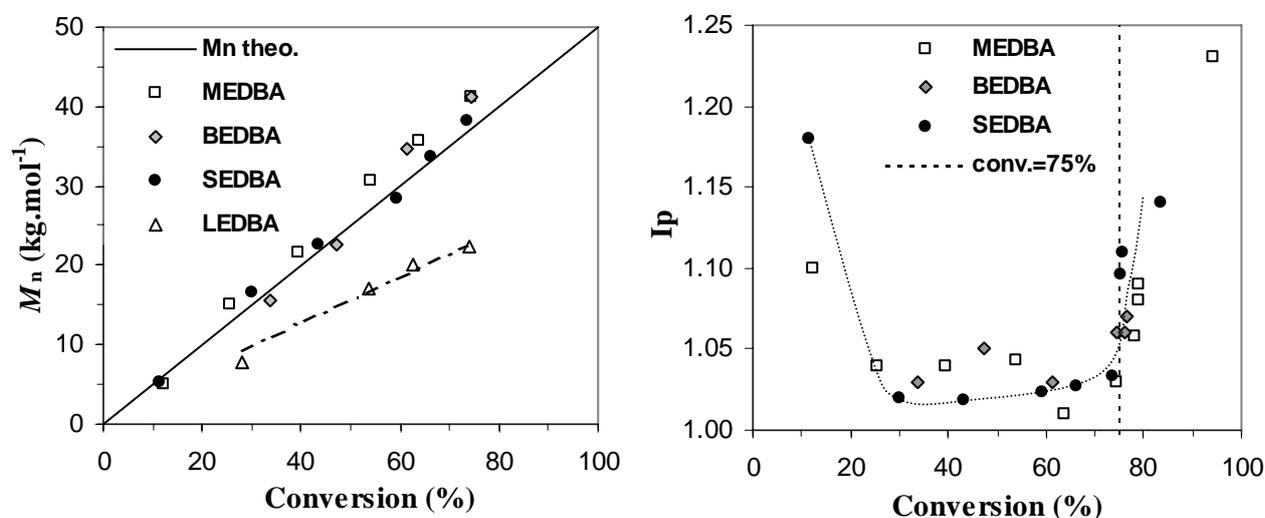


Figure 4 : Evolution des masses molaires moyennes en nombre et des indices de polymolécularité avec la conversion pour les polymérisations RAFT de la NAM en présence de divers dithioesters-ligands [cond. exp. : cf. p.117 ; $[\text{NAM}]_0/[\text{ATC}]_0 = 355$].

Remarque : Pour les polymères fonctionnalisés par un lipide, suite à une correction arbitraire mais systématique de la ligne de base des chromatogrammes correspondants, les valeurs des M_n ne sont pas absolues mais relatives à cette correction (cf. §III-1, p.142).

Le contrôle de la distribution des masses molaires est parfait jusqu'au plateau de conversion (~75%) pour chacun des quatre dithioesters-ligands : progression linéaire des masses molaires moyennes en nombre avec la conversion et valeurs proches des masses théoriques ; indices de polymolécularité faibles ($<1,1$).

En revanche, au-delà du début du plateau de conversion (durée de polymérisation supérieure à 2 heures), les indices de polymolécularité augmentent relativement vite (Figure 4). Cette augmentation est la conséquence d'une diminution des valeurs de M_n alors que les masses au pic M_{pic} (masse molaire de la population majoritaire en masse) continuent leur progression linéaire (Figure 5). Ceci dénote la **présence de nouvelles chaînes polymère de faibles masses molaires** (masse molaire inférieure à M_{pic}).

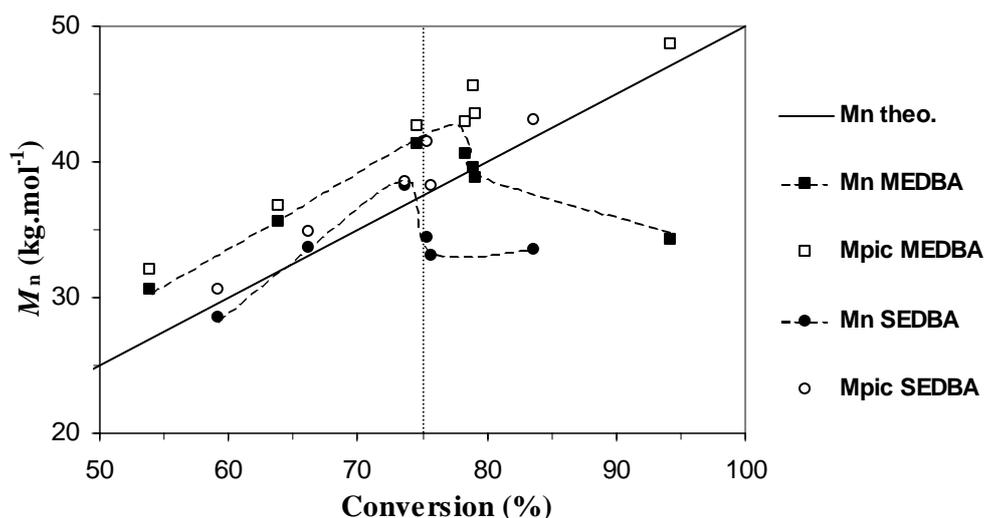


Figure 5 : Evolution caractéristique des M_n et M_{pic} après 75% de conversion ; exemple de la polymérisation de la NAM en présence de MEDBA ou de SEDBA [cond. exp. : cf. p.117 ; $[NAM]_0/[ATC]_0 = 355$].

Remarque : Les valeurs de conversion des derniers points de la Figure 5 (84% et 94%) ne correspondent pas à la valeur du plateau de conversion. Ces points correspondent à des temps de polymérisation long (>20h) pour lesquels un gain de conversion - d'amplitude aléatoire - est fréquemment observé. Cela est attribué à de l'amorçage thermique (qui participe à la formation de nouvelles chaînes uniquement pour les longues durées de polymérisation³). Ces points expérimentaux confirment la baisse des valeurs de M_n tout en conservant une croissance linéaire de M_{pic} .

I-3. Origine des chaînes de faibles masses molaires présentes en fin de polymérisation.

Ce phénomène de la présence de nouvelles chaînes en fin de polymérisation (>2h) est d'autant plus surprenant que l'amorceur (AIBN) est totalement décomposé après 2 heures de polymérisation à 90°C (moins de 0,4% restant).

Les phénomènes classiques qui conduisent à la formation de nouvelles chaînes en cours de polymérisation sont de deux types : transfert au solvant ou au monomère (ou à un autre composé moléculaire) ou bien, phénomène d'amorçage alternatif (amorçage thermique ou par une autre source de radicaux). Dans tous ces cas-là, il s'agit de nouvelles chaînes dont la croissance s'effectue à partir d'une espèce radicalaire moléculaire (en opposition à macromoléculaire).

Une autre hypothèse proposée par Arnaud Favier au cours de sa thèse¹ suggère la formation de nouvelles chaînes à partir de celles déjà existantes : il s'agit du phénomène de transfert au polymère suivi d'une réaction de β -scission. Cette dernière étape induit une fragmentation de la chaîne en deux autres chaînes, dont l'une est active et l'autre porte une insaturation. Ce phénomène est bien connu dans le cas des acrylates^{8,9} et il est particulièrement flagrant dans le cas des polymérisations de l'acrylate de butyle à des températures supérieures à 80°C⁸. A notre connaissance, il n'a encore jamais été décrit dans le cas de dérivés de l'acrylamide. Cependant, de nombreux éléments semblent indiquer son existence lors de la polymérisation de la NAM.

a) Raison pour laquelle il ne peut s'agir de la croissance de nouvelles chaînes.

Un raisonnement par l'absurde permet d'écartier les hypothèses de transfert à une espèce moléculaire quelconque ou bien d'amorçage de nature quelconque.

Hypothèse : les nouvelles chaînes ne sont créées que par un phénomène de transfert à une espèce moléculaire (ou par un amorçage de nature quelconque).

Supposons que l'hypothèse soit vraie, et prenons deux points expérimentaux pour illustrer le raisonnement : 3^{ème} et 5^{ème} points de la courbe **M_n SEDBA** de la Figure 5. Ces points sont respectivement à C = 74% et C' = 76% de conversion et correspondent respectivement à des M_n de 38200 g/mol (M) et 34400 g/mol (M'). Notons N et N' la concentration totale en chaînes de ces deux points.

L'équation qui définit la masse molaire moyenne en nombre (en négligeant la masse des extrémités de chaîne) est la suivante :

$$M_n = \frac{\text{nombre d'unités monomère polymérisées} \times M_{\text{NAM}}}{\text{nombre total de chaînes}} = \frac{[\text{NAM}]_0 \cdot M_{\text{NAM}} \cdot \text{Conversion}}{[\text{chaînes}]}$$

Cette équation permet d'établir la relation suivante entre les nombres de chaînes (N et N') :

$$N' = \frac{C' \times M}{C \times M'} \cdot N \text{ soit après calcul : } N' = 1,14 \cdot N \text{ soit } 14\% \text{ de nouvelles chaînes (nc).}$$

Supposons pour simplifier que la différence de conversion de 2% entre les deux points choisis soit uniquement due à la croissance de ces nouvelles chaînes. La masse molaire de ces chaînes serait : $M_{n,nc} = [\text{NAM}]_0 \cdot M_{\text{NAM}} \cdot (C' - C) / (N' - N)$.

$$\text{Après remplacement des termes N et N' on obtient : } M_{n,nc} = \frac{M \cdot (C' - C)}{\left(\frac{C' \cdot M}{C \cdot M} - 1\right) \cdot C}$$

soit après calcul $M_{n,nc} = 7400 \text{ g/mol}$.

Or, la masse au pic M_{pic} a continué à augmenter entre les deux points (passant de 38600 à 41400 g/mol). Cela reflète donc une croissance des chaînes pré-existantes, ce qui a consommé une partie du monomère. Donc, « en réalité » $M_{n,nc} < 7400 \text{ g/mol}$.

Cependant, l'analyse des limites du pic sélectionné lors de l'exploitation du chromatogramme du 5^{ème} point indique que la distribution des masses molaires s'étend de 56.000 g/mol à 8600 g/mol ! Même si la sélection néglige une partie du pic*, c'est cette sélection qui fournit la valeur de masse M'=34400 g/mol qui, à son tour, permet de calculer la masse de 7400 g/mol ! Ainsi, même si cette masse n'est qu'une valeur moyenne et qu'il existerait une distribution des nouvelles chaînes formées, au moins une partie d'entre elles seraient en dehors de la distribution des masses molaires analysée ! Cela est absurde, donc l'hypothèse n'est pas valide.

La diminution du M_n de 38200 g/mol à 34400 g/mol ne peut donc pas s'expliquer uniquement par la croissance de nouvelles chaînes à partir de radicaux moléculaires. **Le phénomène de fragmentation des chaînes est donc nécessaire.**

* Par la technique CES/DDDL, le signal de diffusion de la lumière est inexploitable aux extrémités des pics. Les pics sélectionnés sont donc légèrement « coupés ».

b) Fragmentation des chaînes en polymérisation conventionnelle.

Après analyse par SEC/DDL des échantillons issus de la polymérisation radicalaire conventionnelle sans agent de transfert (allure cinétique cf. Figure 1, p.119) la même équation que précédemment a été utilisée pour estimer le nombre total de chaînes formées à une conversion donnée :

$$M_n = \frac{\text{nombre d'unités monomère polymérisées} \times M_{\text{NAM}}}{\text{nombre total de chaînes}} = \frac{[\text{NAM}]_0 \cdot M_{\text{NAM}} \cdot \text{Conversion}}{[\text{chaînes}]}$$

$$\text{D'où } [\text{chaînes}] = [\text{NAM}]_0 \cdot M_{\text{NAM}} \cdot \text{Conversion} / M_n$$

De plus, la concentration en chaînes amorcées par l'AIBN est définie par :

$$\begin{aligned} [\text{chaînes amorcées par l'AIBN}] &= [\text{chaînes}_{\text{AIBN}}] = 2 \cdot (1-f_c/2) \cdot f \cdot [\text{AIBN}]_0 \cdot (\% \text{AIBN décomposé}) \\ &= 2 \cdot (1-f_c/2) \cdot f \cdot [\text{AIBN}]_0 \cdot (1-e^{-k_d \cdot t}) \end{aligned}$$

Tableau 1 : Estimation du nombre total de chaînes formées en fonction de la conversion pour la polymérisation radicalaire conventionnelle de la NAM ($[\text{NAM}]_0 = 1,6 \text{ mol/L}$, $[\text{AIBN}]_0 = 4,51 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$, $T = 90^\circ\text{C}$).

Temps (min)	Conv. (%)	M_n (kg/mol)	I_p	[chaînes] $\times 10^4$ (mol/L)	%AIBN décomposé*	[chaînes _{AIBN}] $\times 10^4$ (mol/L) [#]	[chaînes]/[chaînes _{AIBN}]
1	3	719	1,64	0,08	2	0,08	1
3	11	270	1,88	1,15	10	0,47	2,4
6	56	112	1,95	11,4	24	1,09	10,4
10	88	86	1,84	23,0	35	1,58	14,5
15	95	60	2,7	35,5	48	2,19	10,3
25	98	60	2,7	36,7	67	3,04	12,1
40	99	58	2,9	38,5	84	3,78	10,2

* : k_d calculé à partir de $k_d = 2,53 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ à $65,3^\circ\text{C}$ et $E_A = 141 \text{ kJ/mol}$ dans un mélange dioxane/eau 80/20 (Masson, J. C. In *Polymer Handbook 3ème ed.*; 3rd ed.; Wiley, Ed.; Brandrup, J. Immergut, E.H., 1989, pp II-1.) et en supposant une période « d'induction » de 40sec (temps nécessaire pour que le milieu de polymérisation soit effectivement à 90°C).

[#] : Concentration en chaînes amorcées par l'AIBN en supposant $f = 0,5$ et $f_c = 0$ (cf. p.118 pour leur définition).

Le Tableau 1 indique que, dès 56% de conversion, le nombre de chaînes formées pendant la polymérisation conventionnelle de la NAM est au moins 10 fois supérieur au nombre de chaînes potentiellement amorcées par l'AIBN ! **C'est-à-dire que plus de 90% des chaînes présentes ne sont pas amorcées par l'AIBN !** Comme le facteur d'efficacité de l'AIBN ne peut pas dépasser l'unité, cela semble indiquer une forte activité de transfert de radicaux permettant de former de nouvelles chaînes. Cette activité de transfert est insignifiante à faible conversion étant donné que le nombre des premières chaînes formées correspond bien au nombre de chaînes amorcées par l'AIBN (1^{ère} ligne du Tableau 1). Cela n'est pas en faveur des hypothèses d'un fort transfert au solvant ou au monomère, mais est en revanche cohérent avec le phénomène de transfert au polymère suivi d'une β -scission. Il est en effet logique de devoir attendre une certaine conversion (c'est-à-dire une certaine concentration en polymère) pour que ce phénomène soit significatif. Cependant, il est probable que les deux phénomènes de transfert (transfert au solvant et transfert au polymère + β -scission) soient présents simultanément. Les mesures de M_n disponibles ne permettent pas, à elles seules, d'estimer l'importance relative des deux phénomènes ; cela exclu

malheureusement toute tentative de détermination *fiable* d'une valeur de constante de transfert au solvant (ou de constante de transfert au polymère).

En polymérisation conventionnelle, les phénomènes de transfert semblent significatifs dès une conversion relativement basse : dès 11% de conversion plus de la moitié des chaînes serait issues d'un événement de transfert.

En polymérisation de type RAFT, la probabilité des réactions secondaires (impliquant les radicaux propageants) étant limitée, ce phénomène de fragmentation des chaînes n'est significatif (c-a-d déviation du M_n par rapport à la droite théorique) qu'à plus forte conversion. Il est directement visualisable par un nouveau type de présentation de la distribution des masses molaires.

c) Visualisation du phénomène de fragmentation des chaînes par retraitement des données de CES/DDL.

Un traitement des données brutes issues des analyses de CES/DDL* permet, entre autres, de tracer la fraction molaire cumulée en fonction de la masse molaire individuelle des chaînes (M_i). Ce traitement a été appliqué aux données de l'essai de polymérisation RAFT en présence de MEDBA (Figure 6). Une telle présentation indique par exemple que l'échantillon à 54% de conversion (courbe violette) contient 40% (en nombre) de chaînes dont la masse est inférieure à 30000 g/mol, ou qu'environ 95% de chaînes ont une masse molaire inférieure à 40000 g/mol ; par différence, 55% des chaînes de cet échantillon ont une masse molaire comprise entre 30000 et 40000 g/mol ($M_n = 30600$ g/mol).

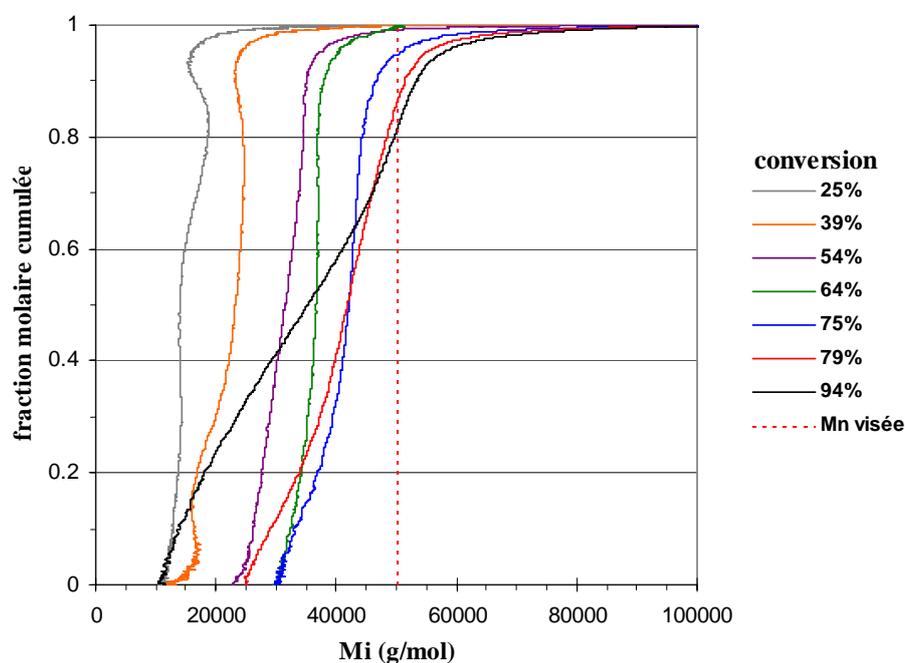


Figure 6 : Fraction molaire cumulée en fonction de la masse molaire des chaînes (M_i) pour des échantillons issus de prélèvements à différentes conversions lors de la polymérisation de la NAM en présence de MEDBA [cond. exp. : cf. p.117 ; $[NAM]_0/[ATC]_0 = 355$].

* Les détails concernant ce traitement des données sont exposés dans la partie expérimentale (p.162).

Remarque : l'aspect « ondulé » des courbes à 25% et 39% de conversion est dû à un défaut de sensibilité de la détection par diffusion de la lumière aux extrémités du pic (concentration faible en polymère). Cela est d'autant plus vrai lorsque l'échantillon a une masse molaire relativement faible. Seule l'allure générale de ces deux courbes est donc à considérer.

Les quatre premières courbes de la Figure 6 se décalent comme attendu vers de plus grandes masses molaires et présentent une pente très abrupte, signe d'une distribution très étroite. En revanche, l'échantillon à 75% de conversion présente un début de distribution des masses molaires identique à l'échantillon précédent, avec une pente moins raide. Cette tendance se confirme avec l'échantillon suivant (79%) pour lequel un « recul » du début de la distribution est observé. Les plus courtes chaînes de cette distribution correspondent cependant à des masses molaires de 25000 g/mol, ce qui exclut la croissance de nouvelles chaînes. Ce recul est flagrant avec l'échantillon à 94% en raison de l'amorçage thermique qui intervient après une longue durée de polymérisation (au moins supérieur à 5h à 90°C¹) (un calcul similaire à celui présenté au paragraphe I-3.a) montre que dans ce cas, les nouvelles chaînes formées font parties de la distribution des masses molaires analysée).

D'après ces observations, il semble que **le phénomène de fragmentation des chaînes (consécutif à du transfert au polymère) commence à modifier la distribution des masses molaires à partir de 65% de conversion pour la polymérisation RAFT de la NAM**. Il devient très significatif au-delà de 75% de conversion (début du plateau).

En conséquence, dans la stratégie de synthèse de bio-conjugués à partir d'agents RAFT fonctionnels, ce phénomène est à éviter, car il conduit à la présence de chaînes non fonctionnalisées. L'arrêt de la polymérisation au tout début du plateau de conversion (~1h30 de polymérisation dans les conditions expérimentales optimisées) est donc conseillé.

I-4. Caractère vivant des chaînes synthétisées / Essai d'extension de chaînes.

Le caractère vivant des chaînes synthétisées par le procédé RAFT a été exploité pour convertir des chaînes dormantes de faible masse molaire en chaînes de masse molaire plus élevée : cette extension de chaînes a été réalisée à partir d'un macro-agent RAFT obtenu lors d'un essai utilisant la SEDBA comme agent de contrôle (masse molaire visée à 100% de conversion égale à 2000 g/mol). Ces macro-agents RAFT (M_n théorique = 1900 g/mol) n'ont été ni isolés ni purifiés : le milieu de polymérisation final a été utilisé tel quel pour la formulation de l'essai d'extension de chaînes.

Lors de la thèse de A. Favier, il a été observé qu'en gardant constant le rapport $[ATC]/[AIBN]$, la polymérisation RAFT de la NAM présente toujours la même cinétique quelle que soit la masse visée² (c-a-d quel que soit le rapport $[NAM]/[ATC]$) : lorsque la masse visée est faible, l'augmentation de l'effet de « retard » due à l'augmentation de la concentration en agent RAFT est compensée par l'augmentation simultanée de la quantité d'amorceur. Ainsi, la cinétique de la polymérisation initiale est très proche de la cinétique de référence (masse visée = 50000g/mol) (Figure 7). En revanche, et de manière attendue, l'essai d'extension de chaînes présente une cinétique plus rapide. En effet, dans un tel essai, l'étape de pré-équilibre est inexistante, ce qui permet de réduire considérablement (voire de supprimer) la période d'induction.

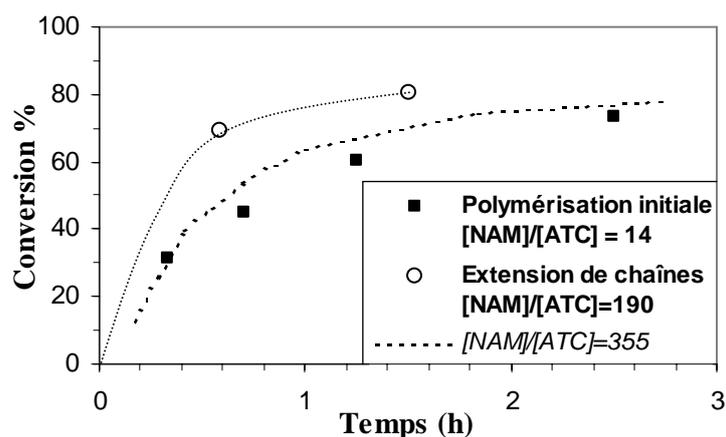


Figure 7 : Cinétiques de polymérisation RAFT de la NAM en présence de SEDBA (■) ou en présence de macro-agent RAFT (M_n théorique = 1900 g/mol, ○) [cond. exp. : cf. p.117]

L'échantillon final obtenu (polyNAM-sucres, $M_n = 29600$ g/mol) présente une distribution des masses molaires très étroite ($I_p = 1,02$) ce qui confirme le bon contrôle de la polymérisation à partir des macro-agents RAFT de type polyNAM.

Ce polymère α -fonctionnel parfaitement défini a été utilisé pour la synthèse de particules à chevelure contrôlée présentant des sucres à leur périphérie (cf. chapitre 4, § III-3-f, p.205)

I-5. Conclusion

A partir de conditions expérimentales préalablement optimisées, la polymérisation RAFT de la NAM en présence du dithioester précurseur SEDB ou de ses dérivés (dithioesters-ligands) est relativement rapide (75% de conversion en 2h), bien que toujours classiquement « retardée ».

La nature du ligand d'intérêt biologique n'a aucune influence sur l'allure cinétique ni sur le contrôle de la polymérisation. En effet, dans tous les cas, une croissance linéaire des M_n , proche de la droite théorique est observée, accompagnée d'indices de polymolécularité très faibles ($<1,1$).

Cependant, au-delà de 75% de conversion, une perte significative du contrôle de la polymérisation est systématiquement observée. Cela a été attribué à un phénomène de fragmentation des chaînes probablement selon un mécanisme de transfert au polymère suivi d'une réaction de β -scission. Ce phénomène est à éviter car il a un impact direct sur la proportion finale de chaînes α -fonctionnelles.

Enfin, l'unique essai d'extension de chaînes réalisé laisse préjuger de la présence des fonctions dithioesters en extrémité ω de la majorité des chaînes. Ces essais d'extension de chaînes n'ont pas été généralisés à l'ensemble des dithioesters-ligands, en revanche une étude systématique concernant la nature des extrémités de chaînes a été entreprise et est présentée dans la partie suivante (§ II).

II. Analyse des extrémités de chaînes.

L'essai d'extension de chaînes semble indiquer que la majorité des chaînes sont des chaînes dormantes (fonction dithioester en extrémité ω), mais il ne donne aucune information sur l'extrémité α .

Avec le rapport initial $[CTA]_0/[AIBN]_0$ utilisé (égal à 10) pour toutes nos polymérisations, la proportion de chaînes amorcées par l'AIBN est théoriquement limitée à 9%. Ainsi, le taux de fonctionnalisation (c-a-d le pourcentage de chaînes portant un ligand biologique en extrémité α) est d'au moins 91%.

Cependant, pour confirmer ce calcul théorique, et ainsi valider la voie de synthèse de polymères α -bio-fonctionnels *via* l'utilisation d'agents RAFT fonctionnels, l'intégrité des ligands biologiques après la polymérisation est un élément essentiel à vérifier. Cela a été réalisé grâce à des analyses par RMN ^1H et par spectrométrie de masse MALDI-ToF. Cette dernière technique permet également de déterminer avec précision les grandeurs M_n et I_p des échantillons si ceux-ci présentent de faibles masses molaires (<5000 g/mol) avec une distribution de masses relativement étroite. Par ailleurs, en ce qui concerne la RMN ^1H , pour obtenir une sensibilité suffisante sur les extrémités de chaînes, la masse molaire des échantillons analysés doit également être faible (<20000 g/mol). Certains échantillons prélevés à faible conversion répondent à ce critère. Cependant, ils ne seraient pas forcément représentatifs des échantillons obtenus en fin de polymérisation. Par conséquent, une nouvelle série de polymérisations a été effectuée spécifiquement pour ces analyses, en visant une masse molaire à 100% de conversion de 4000 g/mol. Les échantillons analysés correspondent ainsi à des conversions comprises entre 56 et 70%.*

II-1. RMN ^1H

Après purification des échantillons de polyNAM par précipitation dans l'éther**, les analyses par RMN ^1H permettent de confirmer la nature des extrémités de chaîne. L'exemple de la Figure 8 (polyNAM-Sucre) montre bien la présence de l'extrémité dithiobenzoate (protons **1**, **2** et **3**) ainsi que celle de l'extrémité dérivée du sucre (protons **4** à **13**) dont de nombreux signaux sont superposés à ceux de la chaîne polyNAM (protons **a**, **b** et **c**). Aucune résonance correspondant à un autre type d'extrémité n'est visible sur ce spectre. Cela pourrait indiquer une quantité très réduite de chaînes mortes et des chaînes amorcées par l'AIBN. Cependant, les résonances de telles extrémités de chaîne ne sont peut-être pas absentes mais leur superposition avec les massifs des protons **b** peut rendre difficile leur visualisation ; seule une quantité relativement importante (>15-20%) pourrait peut-être les rendre identifiables. Ainsi, l'évaluation précise d'un taux de fonctionnalisation à partir du spectre RMN ^1H n'est pas réalisable dans notre cas.

Cependant, le rapport entre la valeur d'intégrale d'un proton d'une extrémité et la valeur d'intégrale d'un proton de l'autre extrémité (ex. : (intégrale proton **3** / 2) / intégrale proton **12**) renseigne sur le pourcentage éventuel de chaînes dormantes α -fonctionnelles dégradées pendant ou après (stockage) la polymérisation. Dans notre cas, ce rapport égal à

* Sauf pour le polyNAM-lipide (conversion ~ 20% ; la masse visée étant de 8500 g/mol dans ce cas là). Les courbes cinétiques correspondantes sont présentées dans la partie IV, p.150.

** Élimination du solvant et du monomère résiduel. A conversion modérée (>30%), il n'y a plus d'agent RAFT initial dans le milieu de polymérisation.

l'unité semble indiquer l'absence de dégradation des fonctions dithiobenzoate et de l'extrémité sucre. Cette observation s'est vérifiée pour chacun des ligands biologiques.

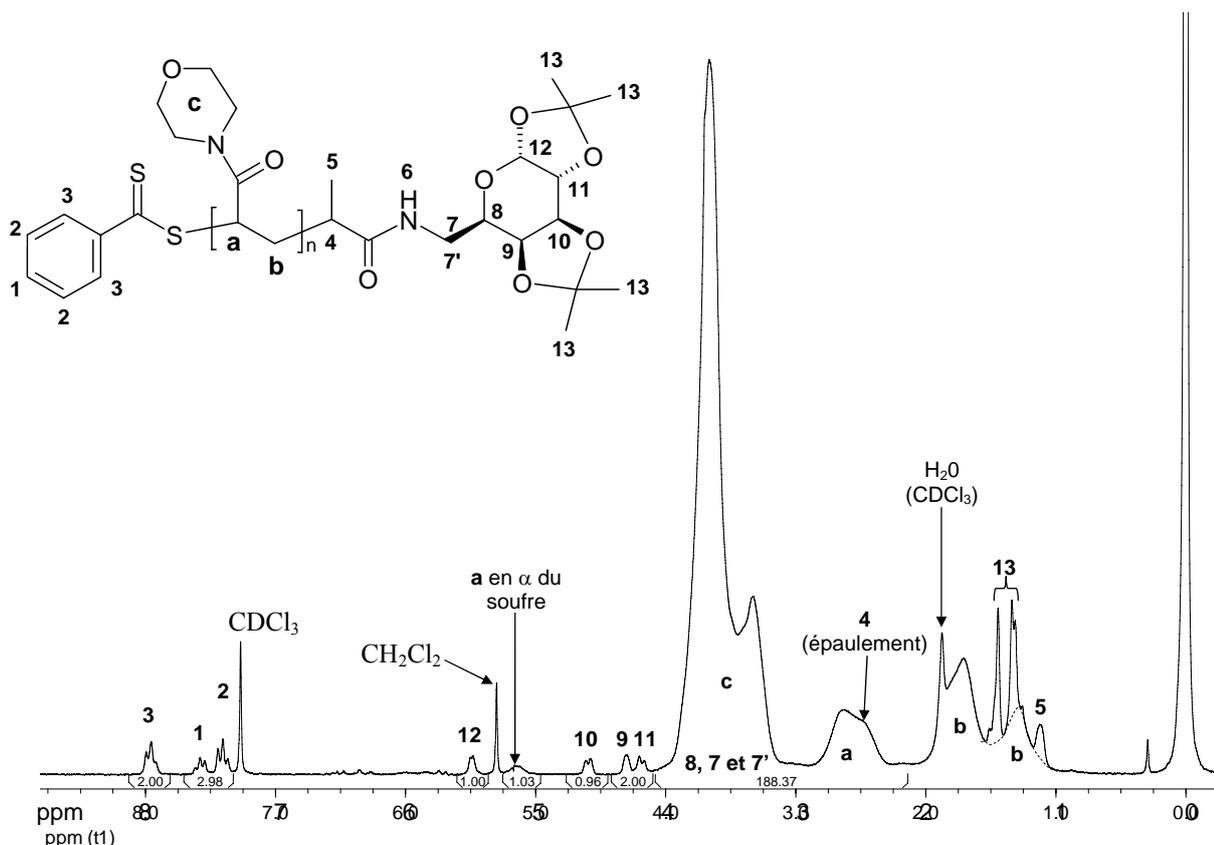


Figure 8 : Exemple de spectre de RMN ^1H (200 MHz ; CDCl_3 ; 27°C ; $n_s = 64$) d'un bio-conjugué de faible masse molaire (polyNAM-Sucre, $M_{n,\text{théo.}} = 2800$ g/mol).

La détermination par CES/DDI des M_n des échantillons de faibles masses molaires n'est pas fiable : les résultats donnés par cette technique ne sont pas reproductibles. Cela est dû à une trop faible sensibilité de la détection de diffusion de lumière pour des masses molaires inférieures à 5000 g/mol.

Ainsi, les M_n de ces échantillons ont été déterminées par RMN ^1H , par comparaison entre la valeur de l'intégrale des signaux du dithiobenzoate (protons **3**) et celle des signaux de la chaîne polyNAM (protons **a** et **c**). Cependant, ce genre de calcul ne fournit pas réellement une valeur expérimentale de M_n :

$$\text{DP}_{n,\text{RMN}} = \frac{A}{B} = \frac{\text{intégrale massif de la chaîne} / \text{nombre protons de la chaîne dans ce massif}}{\text{intégrale extrémité dithiobenzoate} / \text{nombre protons dithiobenzoate}}$$

Or le numérateur A est directement proportionnel au nombre total de motifs répétitifs dans l'ensemble des chaînes, donc proportionnel à la conversion et à la concentration initiale en NAM.

$$A = \beta \cdot [\text{NAM}]_0 \cdot \text{Conversion}^*$$

* β = facteur de proportionnalité entre la valeur de l'intégrale et le nombre de protons correspondants.

Le dénominateur B est directement proportionnel au nombre de molécules d'agent RAFT qui ont amorcé des chaînes, donc proportionnel à la consommation de l'agent RAFT (facteur d'efficacité f') et à la concentration initiale en agent RAFT.

$$B = \beta \cdot f' \cdot [\text{ATC}]_0$$

$$\text{D'où } DP_{n,\text{RMN}} = [\text{NAM}]_0 \cdot \text{Conversion} / (f' \cdot [\text{ATC}]_0)$$

$$\text{Or d'après sa définition : } DP_{n,\text{réel}} = [\text{NAM}]_0 \cdot \text{Conversion} / (\text{concentration totale en chaîne})$$

Donc $DP_{n,\text{RMN}} \neq DP_{n,\text{réel}}$ car la RMN ne donne pas d'éléments expérimentaux qui pourraient permettre de poser l'égalité suivante : $f' \cdot [\text{ATC}]_0 = (\text{concentration totale en chaîne})$.

D'autre part, d'après l'équation simplifiée (1) (cf. p.118) :

$$DP_{n,\text{théorique}} = [\text{NAM}]_0 \cdot \text{Conversion} / [\text{ATC}]_0$$

$$\text{D'où avec } f' = 1 : DP_{n,\text{RMN}} = DP_{n,\text{théorique}}.$$

Donc, **si l'agent RAFT est totalement consommé ($f'=1$), la détermination de M_n par RMN ^1H donnera toujours des valeurs proches des valeurs théoriques, aux incertitudes expérimentales près.** En particulier, les valeurs obtenues ne seront jamais inférieures aux valeurs théoriques, ce qui devrait pourtant être le cas si le nombre total de chaînes présentes est plus important que prévu (par exemple suite à de l'amorçage thermique ou à un phénomène de fragmentation des chaînes). Les analyses par RMN ne peuvent donc pas fournir à elles seules d'arguments suffisants pour confirmer le bon contrôle de la polymérisation et la présence négligeable de chaînes ne portant pas les deux fragments de l'agent RAFT.*

$$\text{Dans le cas de la Figure 8 : } DP_{n,\text{RMN}} = \frac{I_{\text{massif (c+a)}} - 4 \cdot I_{\text{proton 12}}}{I_{\text{protons (1+2+3)}} \cdot \frac{9}{5}}$$

Dans notre cas, les valeurs déterminées sont systématiquement supérieures aux masses théoriques, de 15 à 35%. Cela aurait pu indiquer une consommation incomplète de l'agent RAFT au moment du prélèvement. Or, sa consommation totale a été confirmée par la disparition progressive du signal à 4,70 ppm (caractéristique du dithioester initial, proton 4) lors de l'analyse des échantillons bruts (non précipités)** (Ainsi, nous étions typiquement dans le cas où la détermination du M_n par RMN ne servait à rien). Cet écart systématique a donc été attribué aux incertitudes expérimentales dues à l'intégration de signaux d'amplitudes très différentes.

La détermination des M_n des échantillons de faibles masses molaires a donc été réalisée par des analyses par spectrométrie de masse MALDI-ToF.

* Cela se trouve malheureusement dans la littérature ; un exemple typique est mentionné dans le chapitre 1 (p.55)

** Ce signal (quadruplet) à 4,7 ppm est effectivement visible dans les échantillons correspondant à des conversions inférieures à 30%.

II-2. Spectrométrie de masse MALDI-ToF

La technique de spectrométrie de masse de type MALDI-ToF (SM MALDI-ToF ; Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight) permet d'accéder à la distribution isotopique d'une espèce (mode réflecton). Lors de l'analyse d'un polymère, cette résolution fine permet donc d'accéder à la distribution individuelle des masses molaires des chaînes polymères dans l'échantillon. Le spectre de masse d'un polymère présente un ensemble de pics. La distance entre deux pics successifs de la distribution principale correspond à la masse molaire du motif de répétition (NAM).

Dans les conditions classiques d'analyse, les chaînes polymères peuvent être cationisées par un cation H^+ , Na^+ ou K^+ . Cependant, l'ajout d'iodure de sodium, NaI, au cours de la préparation des échantillons favorise la cationisation Na^+ , ce qui permet d'éviter la cationisation H^+ et de réduire fortement la cationisation K^+ .

a) Détermination des M_n et I_p

Les masses molaires des échantillons analysés étant faibles, il n'y a pas de déformation de la ligne de base des spectres (Figure 9, p.136). Cela permet de déterminer les M_n et I_p correspondant, à partir des spectres enregistrés en mode linéaire (Tableau 2).

Tableau 2 : M_n et I_p des échantillons analysés par spectrométrie de masse MALDI-ToF (mode linéaire).

ATC	Ligand	Conversion (%)	$M_{nthéo.}$ (g/mol)	$M_{n,MALDI}$ (g/mol)	$\Delta_{relatif}^*$ (%)	I_{pMALDI}
MEDBA	Morpholine	56	2600	3200	+24	1,06
BEDBA	Biotine	69	3400	3490	+4	1,08
SEDBA	Sucre	34	1800	2290	+26	1,07
		59	2800	2930	+3	1,03
		69	3200	3440	+6	1,08
		76	3500	3580	+2	1,09
LEDBA	Lipide	11	1900	2490	+31	1,10
		47	4800	4900	+2	1,11

* $\Delta_{relatif}$: écart relatif à la masse théorique.

Les valeurs de M_n déterminées par SM MALDI-ToF sont généralement très proches des valeurs théoriques (moins de 5% d'écart). Seuls trois échantillons présentent un écart plus significatif :

- Echantillon à 11% de conversion (LEDBA) : à une telle conversion, le pré-équilibre est encore existant ; les molécules d'agent RAFT n'ayant pas encore toutes été consommées, il est normal de déterminer une masse molaire plus élevée que la masse théorique.

- Echantillon à 34% de conversion (SEDDBA) : à cette conversion, la SEDDBA vient tout juste d'être totalement consommée. Ainsi, les toutes dernières petites chaînes (amorçées par le fragment ré-amorceur de la SEDDBA) ont peut-être été éliminées lors de la précipitation du polymère dans l'éther (puisque'il existe un degré de polymérisation limite de précipitation ~5-6).
- Echantillon à 56% de conversion (MEDDBA) : cet écart de +24% par rapport à la masse théorique semble indiquer une diminution du nombre de chaînes résultant probablement d'événements de terminaison sur les radicaux intermédiaires. Les preuves de l'existence de ces événements (particulièrement au cours de cet essai de polymérisation en présence de MEDDBA sont présentées dans la partie IV, p.150). Cependant, il est peut-être un peu hasardeux de s'appuyer sur une unique mesure pour attribuer une telle influence de la terminaison des radicaux intermédiaires sur la distribution des masses molaires.

Par ailleurs, pour tous les échantillons analysés, les indices de polymolécularité sont faibles (<1,12) ce qui confirme l'aptitude des dithioesters-ligands à véritablement contrôler la croissance des chaînes (de faibles masses molaires).

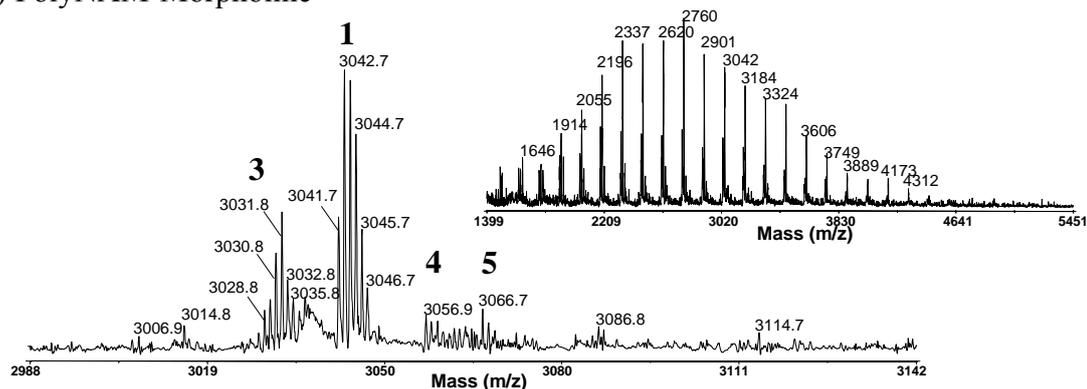
b) Analyse des extrémités de chaîne

La détermination de la structure exacte des chaînes et par conséquent l'identification des extrémités de chaîne s'effectue à partir des masses mono-isotopiques (masse du premier pic de la distribution isotopique) de chaque population, sur un spectre enregistré en mode réflectron (Figure 9, p.136). L'attribution de ces populations pour chaque polymère α -fonctionnel est présentée dans les Tableaux 3 à 6 suivants (pages 137 à 140).

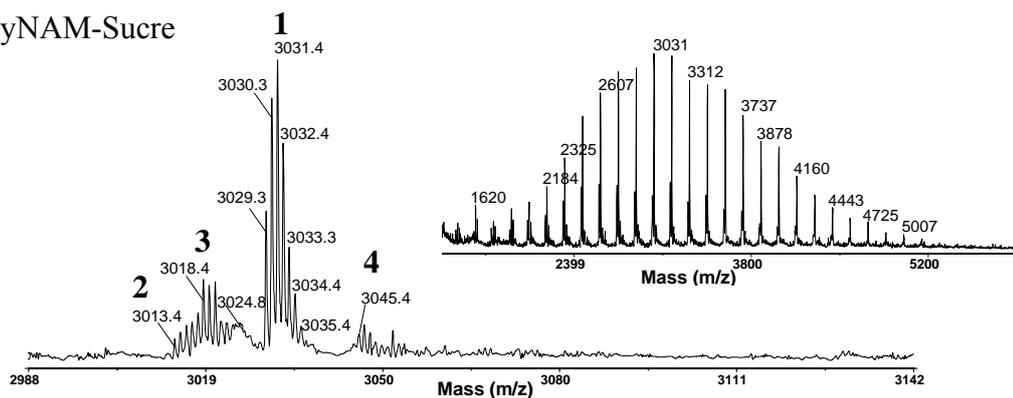
Même si la technique n'est pas quantitative, la population (1) attendue de chaînes dormantes fonctionnelles apparaît comme majoritaire dans tous les cas.

La présence de la population (3) correspondant à des chaînes terminées par un proton est la conséquence de la faiblesse de la liaison C-SC(S) qui peut subir une fragmentation dans le spectromètre. Ce phénomène de fragmentation en cours d'analyse a déjà été décrit notamment pour des chaînes de polyNAM synthétisées par le procédé RAFT.¹⁰ Ces chaînes terminées par un proton pourraient également correspondre à des chaînes terminées par transfert (irréversible) ou par dismutation.

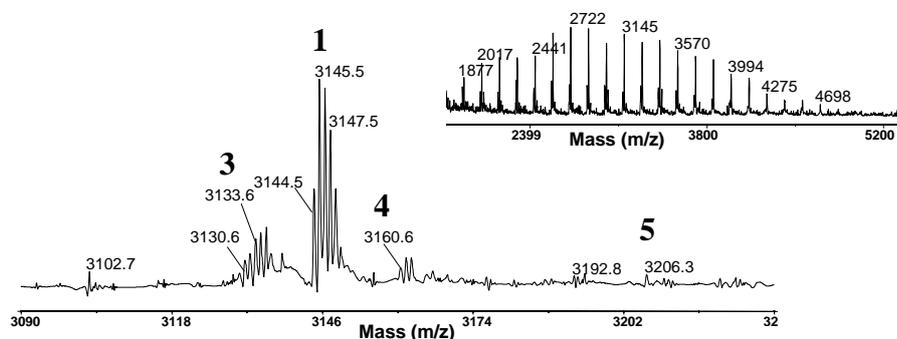
(A) PolyNAM-Morpholine



(B) PolyNAM-Sucre



(C) PolyNAM-Biotine



(D) PolyNAM-Lipide

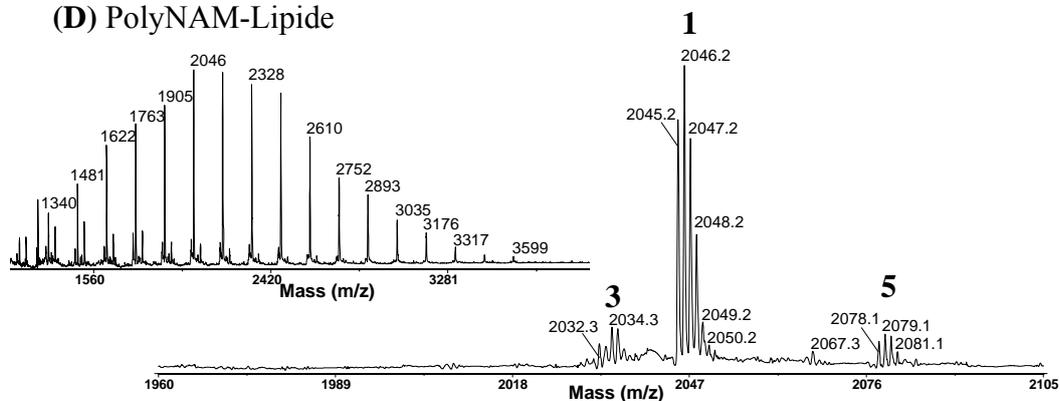
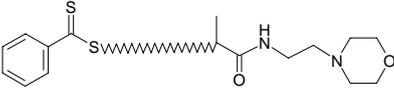
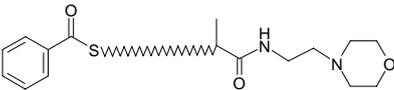
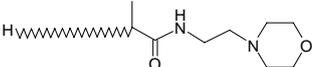
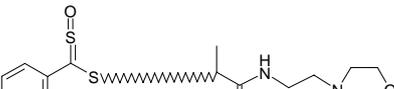
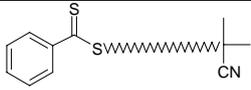


Figure 9 : Spectres de spectrométrie de masse MALDI-TOF : spectre général (mode linéaire) et zoom sur une séquence répétitive (mode réflectron).

Tableau 3 : Structures identifiées sur le spectre de SM MALDI-ToF du **polyNAM-Morpholine**.

(Spectre A de la Figure 9)

Pic	Masse mono-isotopique		Structure	Cationisation	DP _n
	expérimentale	théorique			
1	3041,7	3041,6	 espèce attendue	Na ⁺	19
		3041,6	espèce oxydée (thioester)	K ⁺	19
2	non observé	3025,6	 espèce oxydée (thioester)	Na ⁺	19
		3028,8	-	espèce oxydée (thioester)	Na ⁺
3	3030,8	3030,7	 espèce fragmentée	Na ⁺	20
4	3056,9	3057,7	espèce attendue	K ⁺	19
		3057,6	 espèce oxydée (sulfine)	Na ⁺	19
5	3066,7	3065,6	 chaîne amorcée par AIBN	Na ⁺	20

Remarques :

- Le massif non résolu, systématiquement observé entre les populations 3 et 1, correspond à des espèces fragmentées dans le tube de vol. Il a été vérifié que la hauteur de ce massif augmente avec l'augmentation de la puissance du laser.
- Une distribution de chaînes est présente juste avant la distribution isotopique (3) correspondant aux chaînes fragmentées. Elle correspond à des chaînes oxydées ; cependant, la masse mono-isotopique théorique de ces chaînes est inférieure de 2 ou 3 unités. Etant donné que la hauteur des pics de cette population est très faible, il est possible que la distribution isotopique soit modifiée (par les fluctuations de la ligne de base) de telle sorte que seul le 3^{ème} ou 4^{ème} pic de la distribution soit visible sur le spectre.

Tableau 4 : Structures identifiées sur le spectre de SM MALDI-ToF du **polyNAM-Sucre**.

(Spectre B de la Figure 9, p.136)

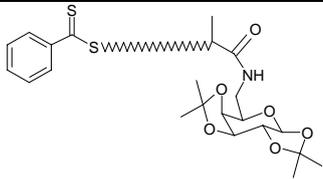
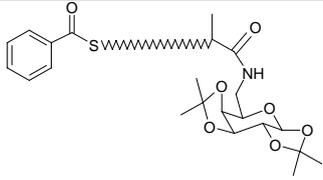
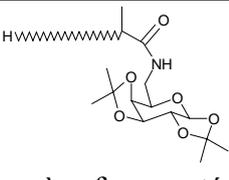
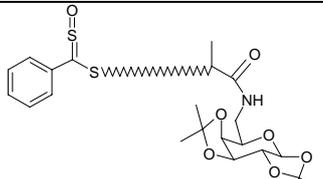
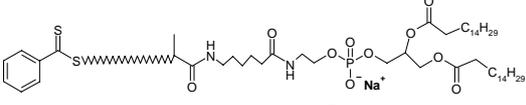
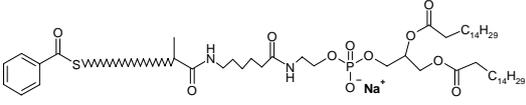
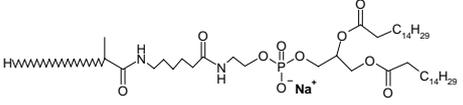
Pic	Masse mono-isotopique		Structure	Cationisation	DP _n
	expérimentale	théorique			
1	3029,3	3029,5	 espèce attendue	Na ⁺	18
		3029,6	espèce oxydée (thioester)	K ⁺	18
2	3013,4	3013,6	 espèce oxydée (thioester)	Na ⁺	18
3	3018,4	3018,7	 espèce fragmentée	Na ⁺	19
4	3045,5	3045,7	espèce attendue	K ⁺	18
		3045,4	 espèce oxydée (sulfine)	Na ⁺	18
5	non observé	3065,6	chaîne amorcée par AIBN	Na ⁺	20

Tableau 5 : Structures identifiées sur le spectre de SM MALDI-ToF du **polyNAM-Lipide**.

(Spectre D de la Figure 9, p.136)

Pic	Masse mono-isotopique		Structure*	Cationisation	DP _n
	expérimentale	théorique			
1	2045,2	2045,1	 espèce attendue	Na ⁺	7
		2045,2	espèce oxydée (thioester)	K ⁺	7
2	non observé [2028,9]**	2029,1	 espèce oxydée (thioester)	Na ⁺	7
		2032,3	-	espèce oxydée (thioester)	Na ⁺
3	2034,3	2034,2	 espèce fragmentée	Na ⁺	8
4	non observé	2061,1	espèce oxydée (sulfine)	Na ⁺	7
5	2078,1	2078,0	 chaîne amorcée par AIBN	Na ⁺	13

* contre-ion du phosphate du lipide = Na⁺

** valeur déterminée dans le cas d'une présence importante de chaînes oxydées (Figure 10 A')

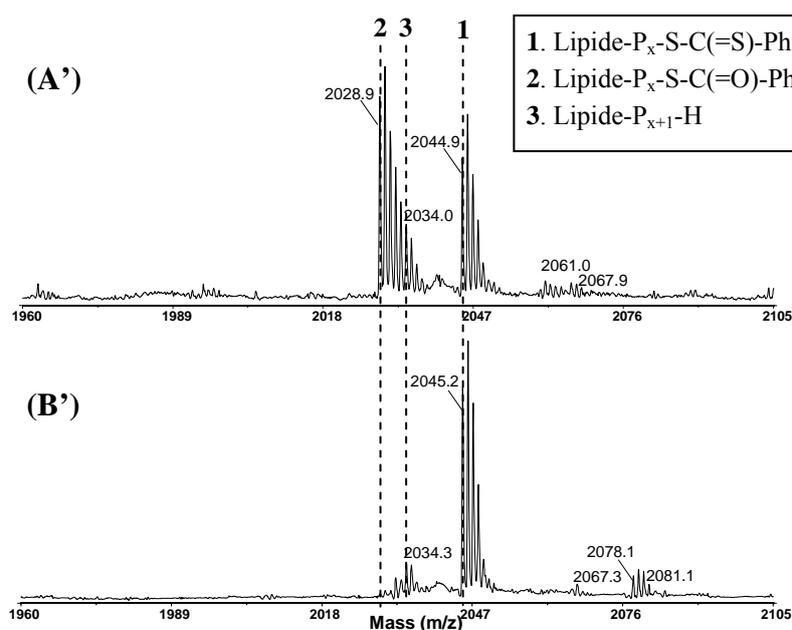
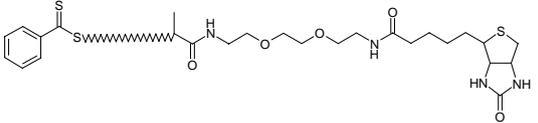
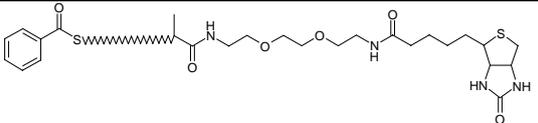
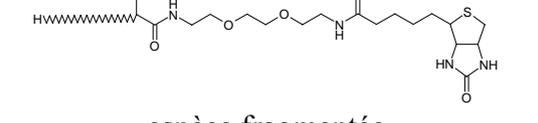
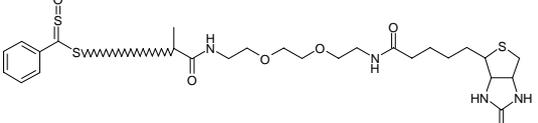
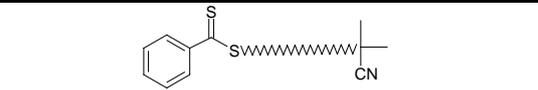
**Figure 10** : Spectres de SM MALDI-ToF du même échantillon de polyNAM-lipide dissous dans du **THF non distillé (A')** ou dans du **THF fraîchement distillé (B')**.

Tableau 6 : Structures identifiées sur le spectre de SM MALDI-ToF du **polyNAM-Biotine**.

(Spectre C de la Figure 9, p.136)

Pic	Masse mono-isotopique		Structure	Cationisation	DP _n
	expérimentale	théorique			
1	3144,6	3144,5	 espèce attendue	Na ⁺	18
		3144,6	espèce oxydée (thioester)	K ⁺	18
2	non observé	3128,6	 espèce oxydée (thioester)	Na ⁺	18
		3130,6	-	espèce oxydée (thioester)	Na ⁺
3	3133,6	3133,7	 espèce fragmentée	Na ⁺	19
4	3160,6	3160,7	espèce attendue	K ⁺	18
		3160,6	 espèce oxydée (sulfine)	Na ⁺	18
5	3206,3	3206,7	 chaîne amorcée par AIBN	Na ⁺	21

La présence de chaînes oxydées (sous forme sulfine ou thioester) a également été décrite, en attribuant initialement ce phénomène à une oxydation des fonctions terminales dithioester par l'oxygène de l'air pendant le stockage des échantillons.¹⁰ Après l'étude de plusieurs autres explications possibles, il est apparu que l'utilisation d'un solvant fraîchement distillé (THF ou dioxane) lors de la préparation des échantillons, permet de réduire considérablement la quantité de chaînes oxydées (Figure 10, p.139). Après ajout de THF non distillé dans l'échantillon puis analyse immédiate (temps de contact d'environ 10min), la proportion de chaînes oxydées devient aussi importante que lors de l'utilisation directe de THF non distillé (spectre A' de la Figure 10). Comme il est connu que les dithioesters sont sensibles à l'oxydation en présence de peroxydes¹¹, ces observations semblent indiquer que les peroxydes présents dans le THF non distillé ont une très forte activité d'oxydation sur les extrémités dithiobenzoate, probablement amplifiée par la puissance du laser du spectromètre.

Il a ensuite été vérifié que ni l'étape de précipitation dans l'éther (contenant éventuellement des peroxydes), ni le séchage sous air de nos échantillons ne pouvaient être responsables des chaînes oxydées encore détectées (dans le cas du polyNAM-Sucre) malgré l'utilisation de solvant distillé. De même, un changement de matrice n'a aucune influence. Il

est donc fort probable que cette présence d'espèces oxydées soit due à d'infimes traces de peroxydes dans le THF distillé.

L'ensemble des spectres de SM MALDI-ToF pour lesquels du THF non distillé a été utilisé est présenté dans l'annexe 5 (p.234). Ces spectres présentent les mêmes structures que les spectres précédents, sauf dans le cas du polyNAM-Biotine pour lequel les chaînes oxydées sous forme thioester sont étrangement inexistantes alors que d'autres structures apparaissent.

Enfin, les chaînes amorcées par l'AIBN sont peu (voire pas) visibles sur les spectres. Cela n'est pas étonnant compte tenu du rapport initial $[ATC]_0/[AIBN]_0$ utilisé (égal à 10). Dans la littérature, ces chaînes sont en général observées pour des rapports de l'ordre de 3 à 5.^{10,12,13}

II-3. Conclusion

Les résultats des analyses par RMN 1H et spectrométrie de masse MALDI-ToF considérés ensemble, ont confirmé à la fois la présence des ligands (morpholine, biotine, sucre ou lipide) en extrémité α sur une très large majorité de chaînes ainsi que leur intégrité après la polymérisation RAFT. Cela valide la stratégie de synthèse de bio-conjugués à partir d'agents RAFT préalablement fonctionnalisés.

Afin d'analyser des échantillons représentatifs des chaînes α -fonctionnelles obtenues, les prélèvements ont été effectués à conversion moyenne lors de polymérisations visant une faible masse molaire. La spectrométrie de masse MALDI-ToF a permis la détermination expérimentale des valeurs de M_n et I_p des échantillons. Ces dernières confirment le très bon contrôle de la polymérisation en présence des divers agents RAFT bio-fonctionnels.

Enfin, la cause de la détection très importante de chaînes oxydées (au niveau de la fonction dithioester) par la technique de spectrométrie de masse MALDI-ToF a été décelée : il s'agit probablement d'une oxydation par les peroxydes présents dans le solvant de préparation des échantillons (THF). L'utilisation d'un solvant fraîchement distillé permet de rendre négligeable la présence de ces espèces oxydées.

III. Influence des extrémités de chaînes sur les analyses par chromatographie d'exclusion stérique.

Avant même l'utilisation de la RMN ^1H ou de la SM MALDI-ToF, les analyses par chromatographie d'exclusion stérique en phase aqueuse des échantillons de polyNAM-ligand ont permis diverses observations expérimentales inhabituelles qui constituaient déjà des preuves indirectes de l' α -fonctionnalisation des chaînes. Le cas le plus flagrant est celui des échantillons de polyNAM-Lipide.

III-1. Cas des polymères fonctionnalisés par un lipide

- Analyse par diffusion quasi-élastique de la lumière :

Tout comme les phospholipides seuls, les chaînes de polyNAM-Lipide ont une forte tendance à former des arrangements de type micellaire en milieu aqueux : par diffusion quasi-élastique de la lumière, le diamètre des objets formés a été estimé à environ **32 nm** pour un échantillon de M_n théorique de **30.000g/mol**, et à environ **18 nm** pour un échantillon de M_n théorique de **9.200g/mol**. En comparaison, le diamètre des arrangements de phospholipides seuls (vésicules uni-lamellaires) est d'environ 100 nm.¹⁴ La diminution de la taille des objets (diminution du rayon de courbure si ces objets sont sphériques) pourtant constitués d'espèces plus volumineuses (polyNAM-Lipide > phospholipide), indiquerait une diminution du nombre d'agrégation. La présence d'une chaîne polyNAM (hydrophile) sur un phospholipide renforce le caractère amphiphile de l'espèce lipidique.

- Analyse par CES/DDL en phase aqueuse :

Ce comportement des échantillons polyNAM-Lipide en milieu aqueux a également été mis en évidence lors des analyses par chromatographie d'exclusion stérique. En comparaison avec un échantillon de polyNAM-Morpholine, l'analyse du polyNAM-Lipide présente une amplitude des signaux bruts beaucoup plus faible, tout en dévoilant un nouveau pic (annoté **2**), attribué à la présence d'agrégats micellaires (Figure 11).

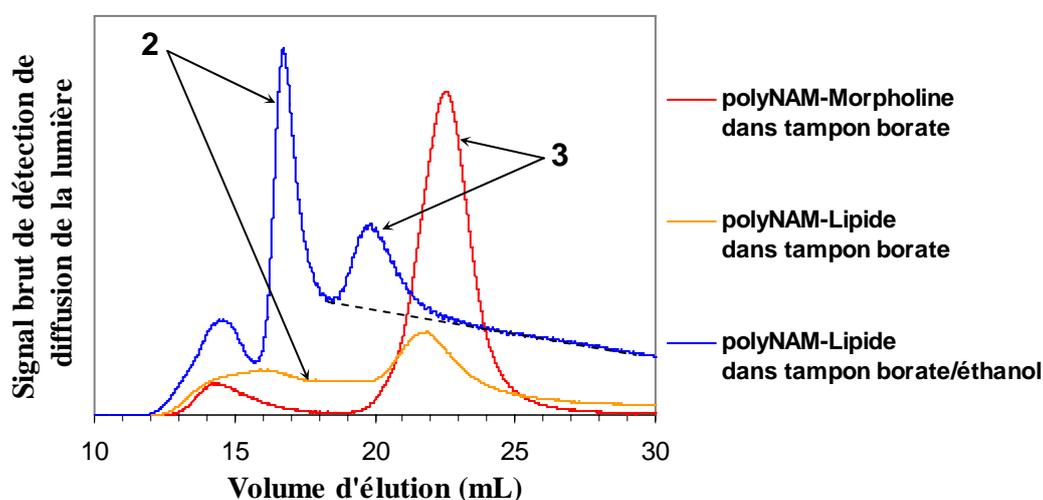


Figure 11 : Signaux bruts de la détection par diffusion de lumière lors des analyses CES/DDL d'échantillons de polyNAM-Morpholine et de polyNAM-Lipide de masses molaires identiques ($M_{n\text{théo.}} = 38.000\text{g/mol}$).

Bien que les chaînes de l'échantillon analysé soient relativement longues ($M_{n,théo.} = 38000$ g/mol, $DP_n = 270$), la présence d'un unique lipide à l'une de leurs extrémités modifie très fortement leur comportement en solution aqueuse.

L'ajout d'éthanol (bon solvant des lipides) dans l'éluant aqueux permet de retrouver une amplitude de signal exploitable et d'obtenir des pics mieux définis (Figure 11). Cependant le retour à la ligne de base après le pic **3** (attribué à des unimères) est toujours extrêmement long, ce qui semble indiquer une importante rétention des chaînes polyNAM-Lipide sur la phase stationnaire des colonnes du système chromatographique.

En fixant arbitrairement, mais systématiquement, une ligne de base au pied du pic **3** (ligne en pointillé sur la Figure 11), des valeurs de M_n ont été obtenues ; elles suivent une évolution linéaire avec la conversion (de 25 à 75%, cf. Figure 4, p.124). Il ne s'agit pas ici de valeurs absolues mais de valeurs « relatives » au positionnement de la ligne de base.

L'effet d'un changement de température sur l'allure des chromatogrammes a également été étudié mais cela n'a pas fourni de résultats plus exploitables. Une étude plus détaillée de ce phénomène d'agrégation des chaînes polyNAM-lipide (lors des analyses par CES/DDL) est présentée en annexe (cf. annexe 6, p.240).

- Analyse par CES en phase organique (THF) / Calibration polyNAM:

Compte tenu de ces problèmes d'agrégation en milieu aqueux, des essais d'analyse dans le THF ont été effectués. La dissolution des échantillons dans le THF est très rapide et conduit à une solution limpide, contrairement aux solutions aqueuses des mêmes échantillons. Les chromatogrammes semblent classiques et ne présentent pas plusieurs pics (contrairement aux analyses en phase aqueuse) ce qui semble indiquer qu'il n'y a pas ici de problème d'agrégation (Figure 12). Cependant, la comparaison des chromatogrammes à ceux de chaînes polyNAM-Morpholine de longueur théorique identique (prélevés à même conversion) met en évidence un phénomène de **rétention des conjugués lipidiques sur les colonnes** du système chromatographique : les sommets des pics sont systématiquement décalés vers des volumes d'éluion plus élevés et les pics s'élargissent. Le THF n'étant pas l'un des meilleurs solvants des lipides*, il se peut que l'extrémité phospholipidique des chaînes ait effectivement une affinité non négligeable avec les colonnes (polystyrène réticulé, donc hydrophobe).

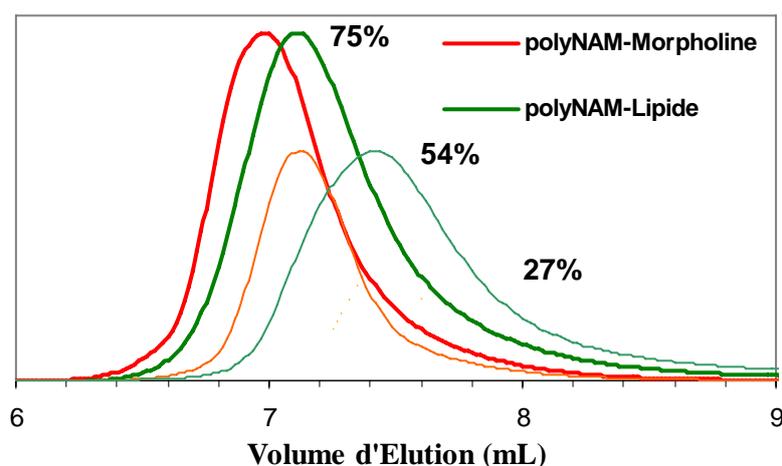


Figure 12 : Comparaison des chromatogrammes de CES en éluant THF d'échantillons polyNAM-Lipide et de polyNAM-Morpholine, à même taux de conversion (27%, 54%, 75%) (c-a-d de masses molaires comparables deux par deux).

* Il est bien sûr tout de même bien meilleur solvant que l'eau.

A l'aide d'une calibration polyNAM réalisée précédemment¹, des valeurs de M_n et I_p ont été obtenues (Figure 13) :

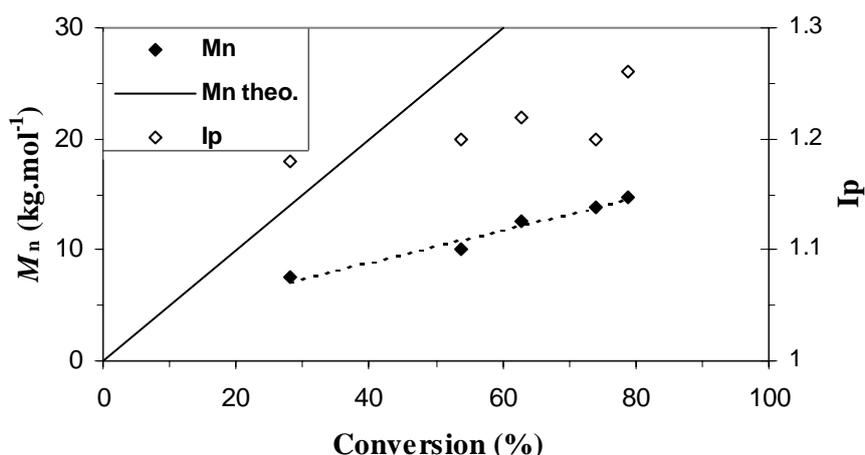


Figure 13 : Evolution de M_n et I_p avec la conversion pour la polymérisation de la NAM en présence de LEDBA (CES en éluant THF avec une calibration polyNAM).

Du fait du phénomène de rétention, les valeurs de M_n obtenues à l'aide de cette calibration inadéquate sont logiquement plus faibles que les valeurs théoriques ; cependant, une évolution linéaire avec la conversion est conservée. De plus, les valeurs des indices de polymolécularité, bien que surestimées par l'élargissement des pics également dû au phénomène de rétention, restent inférieures à 1,3. Ces deux éléments indiquent un contrôle effectif de la polymérisation de la NAM par le dithioester-lipide.

- Analyse par CES en phase organique (THF) / Système Viscotek:

A l'occasion d'une démonstration d'appareil, trois échantillons de polyNAM-Lipide ont pu être analysés par la technique de CES développée par la société Viscotek, basée sur trois détecteurs en série : réfractomètre, détecteur de diffusion de lumière (7° et 90°) et viscosimètre différentiel. Cette technique est ainsi censée fournir des valeurs de masses molaires absolues comme la technique CES/DDL (détection à au moins 3 angles). Les valeurs d'indice de polymolécularité obtenues sont très faibles*, et les masses molaires sont significativement supérieures aux masses théoriques (Tableau 7 et Figure 14).

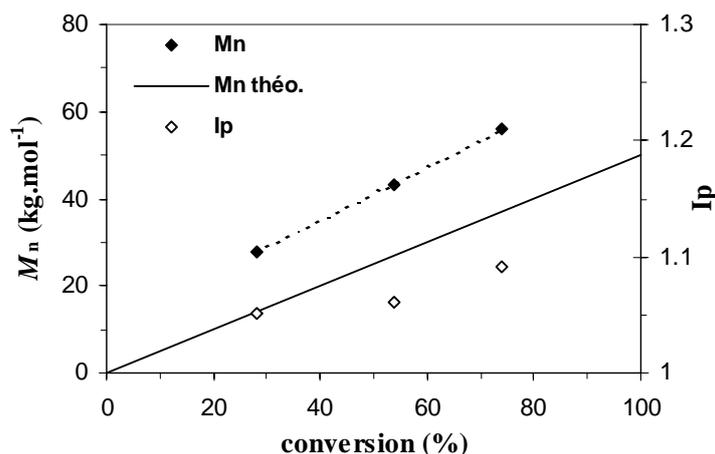
Par ailleurs, le phénomène de rétention sur les colonnes a également été détecté par l'ingénieur ayant réalisé les analyses (sans qu'il ne connaisse la nature exacte des échantillons). Le volume d'éluion n'étant pas un paramètre intervenant dans le calcul des M_n , ce phénomène de rétention ne devrait pas avoir d'influence. Cependant, la méthode de calcul est basée sur une séparation optimale des chaînes selon leur masse molaire et suppose la présence d'une unique population de chaînes pour chaque intervalle d'intégration. Or, le phénomène de rétention ne semblant pas uniforme pour l'ensemble des chaînes**, il est peut-être possible de retrouver des chaînes de masses molaires différentes dans un même intervalle. Ce mélange de chaînes pourrait influencer les valeurs de M_n calculées et, dans une moindre mesure, les valeurs de I_p .

* Valeurs d' I_p très faibles et du même ordre de grandeur que celles obtenues pour les autres conjugués (cf. Tableau 7, page suivante et Figure 4, p.124).

** D'après l'allure des chromatogrammes obtenus, on observe que des chaînes de même masse molaire présentent des volumes d'éluion différents.

Tableau 7 : Résultats des analyses d'échantillons de polyNAM-Lipide par le système de CES de la société Viscotek (éluant THF).

Conversion (%)	$M_{n,\text{théorique}}$ (g/mol)	$M_{n,\text{exp.}}$ (g/mol)	I_p	M_{pic} (g/mol)	coeff. de Mark-Houwink
28	15070	27890	1,05	30360	0,42
54	27920	43020	1,06	50280	0,38
74	32400	55980	1,09	69680	0,35

**Figure 14** : Evolution de M_n et M_{pic} avec la conversion pour la polymérisation de la NAM en présence de LEDBA (CES du système Viscotek ; éluant THF).

Une autre source d'erreur sur le calcul de M_n concerne la valeur de l'incrément d'indice de réfraction, dn/dc , utilisée. Elle correspond à la valeur des chaînes polyNAM non fonctionnalisées. Or, compte tenu de l'influence considérable de l'extrémité lipidique sur le comportement des chaînes, cette valeur n'est probablement pas adéquate. Une sous-estimation de la valeur de dn/dc induit une sur-estimation des valeurs des M_n . Cependant, l'erreur éventuelle sur la valeur de dn/dc ne semble pouvoir expliquer que partiellement l'écart de masse observé*.

Enfin, un autre paramètre calculé à partir des mesures viscosimétriques confirme que le THF n'est pas l'éluant adéquat pour analyser ces conjugués lipidiques : les valeurs du coefficient de Mark-Houwink sont proches de la valeur théorique de 0,3 qui correspond à une conformation sphérique (rétractée) de la pelote. Cela est généralement le signe d'une mauvaise solvation du polymère. En effet, le THF n'est pas l'un des meilleurs solvants des lipides. Un système chromatographique en phase chloroforme serait peut-être plus approprié.

- Bilan sur les analyses par CES des échantillons polyNAM-Lipide:

Ainsi, malgré l'utilisation de différentes techniques de CES, une détermination fiable des M_n des échantillons de polyNAM-lipide n'a pu être effectuée. Cependant, d'après le comportement des autres dithioesters-ligands, d'après la croissance linéaire des masses molaires « relatives » obtenues et d'après les faibles valeurs de I_p , les masses molaires moyennes en nombre sont vraisemblablement très proches des valeurs théoriques.

* Sur un intervalle d'intégration, M_i est proportionnel à (signal DDL/signal RI)/(dn/dc). Il faudrait alors augmenter la valeur de dn/dc de plus de 50% pour obtenir des valeurs de M_n proches des valeurs théoriques.

III-2. Influence de l'extrémité α

L'impact de l'insertion d'un lipide en extrémité α des chaînes a été flagrant lors des analyses par CES/DDL en phase aqueuse. Pour les autres ligands (biotine et sucre), l'influence de la nature de l'extrémité α des chaînes est plus subtile mais bien existante.

La comparaison des volumes d'élution et des masses au pic (M_{pic}) correspondantes pour les divers conjugués montre clairement cette influence (Figure 15). Des échantillons de masses molaires différentes peuvent présenter le même volume d'élution (Figure 15-a) ou inversement (Figure 15-c pour $M_{pic} = 24000$ g/mol) ; des échantillons de masse au pic donnée peuvent présenter des volumes d'élution plus faibles que d'autres échantillons de masse au pic plus élevée (Figure 15-b et -c) (Exemple : l'échantillon polyNAM-Morpholine de M_{pic} égal à 14200 g/mol présente un volume d'élution de 24,2 mL alors que l'échantillon polyNAM-Sucre de M_{pic} égal à 17300 g/mol présente un volume d'élution de 25,0 mL).

La part de chromatographie d'affinité entre les chaînes polymères fonctionnalisées et les colonnes n'est donc pas négligeable sur la gamme de masses molaires étudiée (<30000 g/mol).

Une autre explication reviendrait à remettre en cause la masse au pic calculée, en considérant que la valeur de l'incrément d'indice de réfraction, dn/dc , varie fortement en fonction du ligand considéré. En effet, en augmentant arbitrairement cette valeur de 0,027 (0,190 à la place de 0,163), l'échantillon polyNAM-Biotine de la Figure 15-a présente alors la même masse au pic pour le même volume d'élution que l'échantillon de polyNAM-Morpholine.

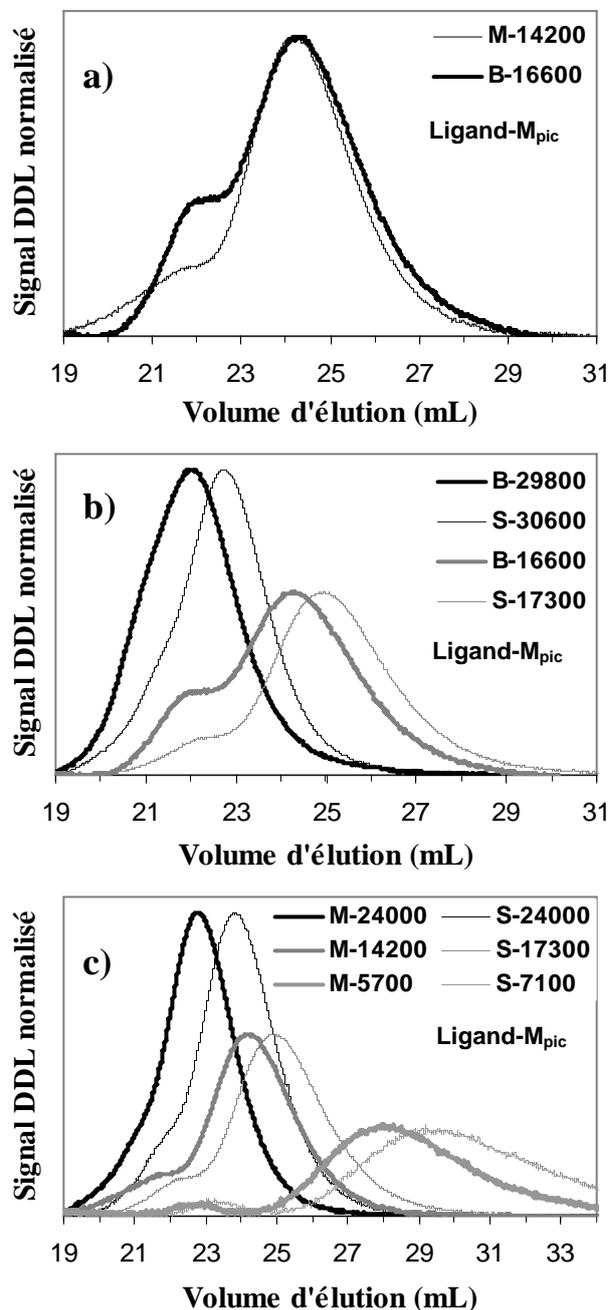


Figure 15 : Effet de la nature des extrémités de chaîne sur les volumes d'élution (légende : X - *nombre* = nature de l'extrémité - *masse au pic* M_{pic} (g/mol); M = morpholine, S = sucre, B = biotine)

Cependant, deux éléments ne justifient pas une telle augmentation de la valeur du dn/dc :

- La valeur du coefficient de récupération est modifiée de manière injustifiée.*
- Augmenter la valeur du dn/dc provoque une diminution proportionnelle de la valeur de M_n . Il y aurait donc une influence du ligand biologique sur le contrôle de la polymérisation RAFT. Cela paraît difficilement concevable d'autant plus que les analyses des extrémités de chaîne (cf. § II) ont montré que les ligands biologiques n'étaient pas dégradés pendant la polymérisation.

Ces variations du volume d'élution en fonction de la nature du ligand présent en extrémité α des chaînes mettent en avant **l'importance d'utiliser une technique d'analyse de la distribution des masses molaires indépendante de toute calibration pour l'étude de polymères α -fonctionnalisés**. En effet, dans notre étude, la nature du ligand présent dans l'agent de contrôle n'a aucune influence sur le déroulement des polymérisations RAFT et les valeurs des M_n sont par conséquent toutes très proches des valeurs théoriques. La même étude basée sur l'utilisation d'une courbe de calibration pour les analyses par CES n'aurait pas fourni les mêmes conclusions !

III-3. Influence de l'extrémité ω / Hydrolyse des chaînes dormantes

Non seulement la nature de l'extrémité α a une influence sur les volumes d'élutions avec le système chromatographique utilisé ici, mais également la nature de l'extrémité ω (c'est-à-dire la fonction dithiobenzoate) a un impact considérable sur l'élution de nos échantillons. En effet, chaque chromatogramme d'un échantillon de masse molaire intermédiaire (10000 à 30000 g/mol) présente un léger épaulement (visible sur les signaux réfractométrique et de diffusion de lumière). En revanche, la trace UV à 309 nm (maximum d'absorption de la fonction dithiobenzoate) n'en présente pas (Figure 16-a). C'est toujours le cas lorsque l'épaulement est devenu un pic après deux mois de stockage à 24°C de l'échantillon dans le tampon aqueux d'analyse (Figure 16-b). Or, *la masse au pic calculée pour ce nouveau pic est identique à celle du pic initial*. Ces éléments indiquent une hydrolyse partielle des fonctions dithioester terminales. Cela n'est pas surprenant compte tenu du pH basique du tampon d'analyse.¹⁵ Le volume d'élution des chaînes résultantes (extrémité thiol) est plus faible (~22 mL) que celui des chaînes dormantes de même masse molaire (~24 mL), ce qui est assez surprenant pour une chromatographie censée être « d'exclusion stérique ». Cela indique que la présence de la fonction dithioester induit une certaine « rétention » des chaînes (même pour un échantillon de $M_n = 22000$ g/mol).

* Coefficient de récupération = masse détectée par le réfractomètre (et calculée grâce à la valeur de dn/dc) rapportée à la masse d'échantillon injectée. Le coefficient de récupération est généralement supérieur à 80%. La modification de la valeur du dn/dc à 0,190 le diminue à environ 70%.

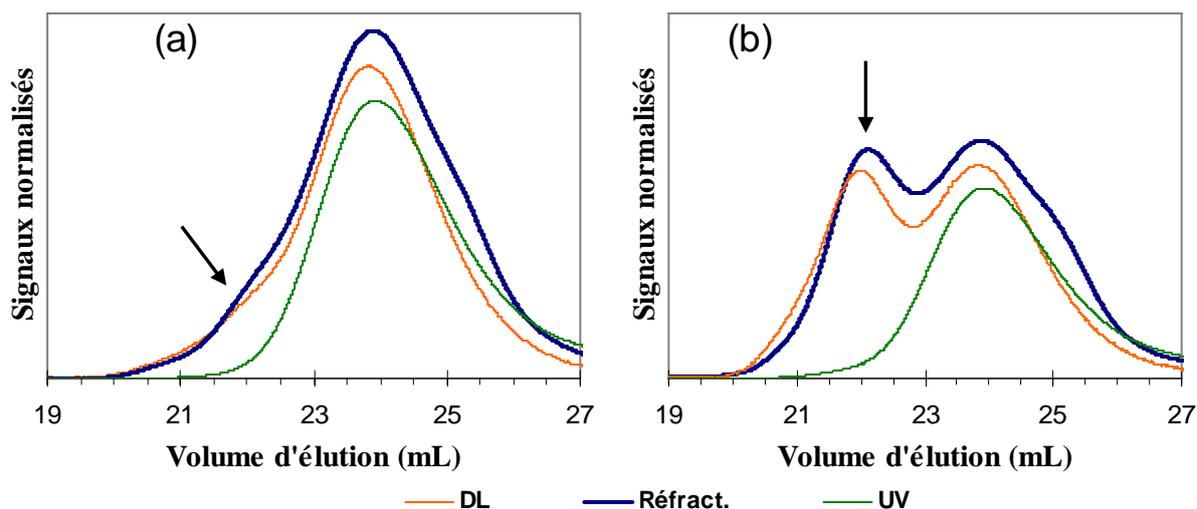


Figure 16 : Chromatogrammes CES/DDL d'un échantillon polyNAM-Morpholine ($M_n=21700\text{g/mol}$; $I_p=1,04$; $M_{pic}=24000\text{ g/mol}$) injecté 1h après sa dissolution dans le tampon aqueux d'analyse (a) et injecté deux mois après (b) (conservation à 24°C).

(légende : DL = signal du détecteur de diffusion de lumière, Réfract. = signal du détecteur réfractométrique, UV = signal du détecteur UV (309nm))

La différence de volume d'éluion entre les chaînes hydrolysées (thiol) et les chaînes dormantes (dithioester) est encore plus flagrante avec les échantillons de faibles masses molaires (Figure 17). L'hydrolyse est logiquement bien plus rapide avec ces échantillons : l'injection environ une heure après la dissolution de l'échantillon, présente déjà un pic bien distinct (Figure 17-a). Après 1 mois dans le tampon aqueux, la quasi-totalité des chaînes est hydrolysée (Figure 17-b).

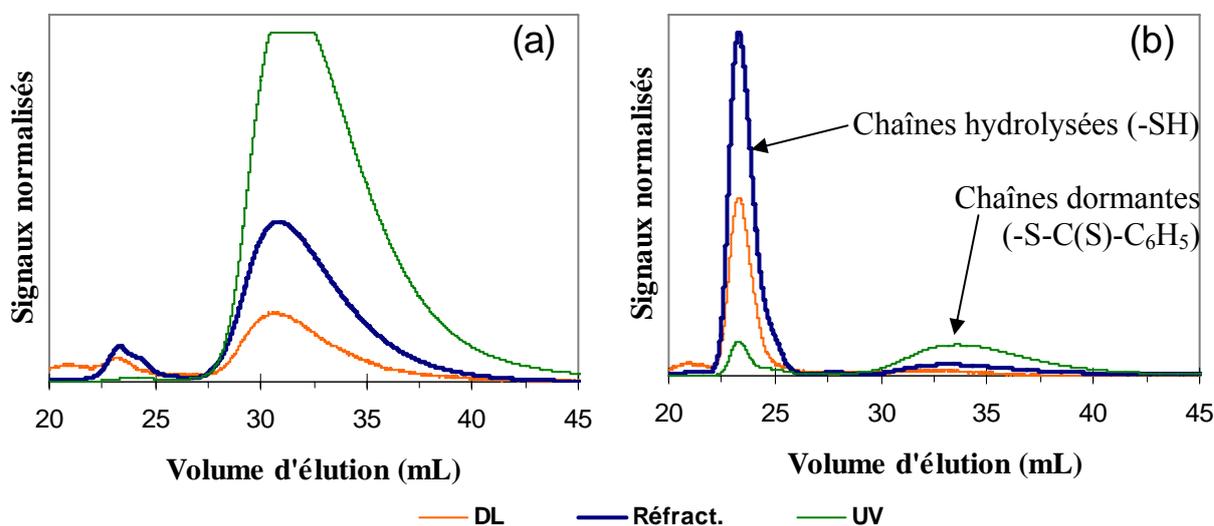


Figure 17 : Chromatogrammes CES/DDL d'un échantillon polyNAM-Morpholine ($M_{n,theo}=2900\text{g/mol}$) injecté 1h après sa dissolution dans le tampon aqueux d'analyse (a) et injecté un mois après (b) (conservation à 24°C).

(légende : DL = signal du détecteur de diffusion de lumière, Réfract. = signal du détecteur réfractométrique, UV = signal du détecteur UV (309nm))

En conséquence, un phénomène de rétention des chaînes dormantes est fortement suspecté. Il serait dû à une affinité non négligeable des extrémités hydrophobes dithiobenzoate avec les colonnes utilisées. Cette affinité paraît d'autant plus importante que les chaînes sont courtes. Ce phénomène de rétention explique ainsi toutes les « anomalies » observées :

- Volume d'élution des chaînes hydrolysées plus faible que celui des chaînes dormantes.
- Étroitesse du pic des chaînes hydrolysées par rapport au pic des chaînes dormantes.
- Volume d'élution des chaînes dormantes de faibles masses molaires (jusqu'à ~41 mL, Figure 17) supérieur à celui du monomère ($V_{\text{NAM}}=27,7$ mL).
- Réduction assez significative de la largeur des pics à mi-hauteur avec la conversion (cf. Figure 3, p.123) sans que les valeurs de I_p correspondantes n'en soient modifiées (cf. Figure 4, p.124).

Ainsi, « grâce à » l'hydrolyse partielle des chaînes dormantes dans le système chromatographique en phase aqueuse, l'effet des extrémités dithiobenzoates sur les volumes d'élution des chaînes a clairement été mis en évidence. *A priori*, pour des chaînes de masses molaires relativement importantes (>10000 g/mol), cet effet n'avait même pas été soupçonné.

L'utilisation du système chromatographique en phase THF disponible au laboratoire (système dépendant d'une calibration) aurait permis d'éviter l'hydrolyse des chaînes dormantes. De plus, la courbe de calibration utilisée aurait été celle réalisée à partir d'échantillons polyNAM également synthétisés par le procédé RAFT. Elle aurait donc permis de s'affranchir d'un éventuel phénomène de rétention des chaînes dormantes (car les échantillons servant à l'établissement de la courbe de calibration auraient aussi subi ce phénomène de rétention). Ce phénomène de rétention n'a toutefois pas été confirmé avec ce système chromatographique en phase THF ; cependant, s'il avait constitué l'unique méthode d'analyse des échantillons, l'absence de ce phénomène n'aurait pas été vérifiée (car le phénomène n'aurait pas été envisagé). L'utilisation d'une courbe de calibration adéquate n'aurait été due qu'à un facteur chance !

Là encore, l'importance d'utiliser une technique d'analyse de la distribution des masses molaires indépendante de toute calibration pour l'étude de polymères synthétisés par le procédé RAFT est mise en valeur.

III-4. Conclusion

La nature des extrémités α (ligand variés) et des extrémités ω (dithiobenzoate ou thiol) a une influence importante sur les volumes d'élutions et sur l'allure générale des chromatogrammes. Comme la technique de diffusion de lumière fournit des valeurs de M_n et I_p absolues (indépendantes du volume d'élution), son utilisation a permis de s'affranchir de l'influence de la nature des extrémités de chaîne.

Ainsi, seuls les échantillons lipidiques qui ont montré un comportement micellaire en milieu aqueux n'ont pu être fidèlement analysés par la technique de CES/DDL. Malheureusement, à cause d'un phénomène de rétention sur les colonnes, les techniques de CES en phase THF n'ont pas permis une analyse fiable de tels échantillons. Cependant, l'ensemble des résultats récoltés plaide en faveur du caractère contrôlé des échantillons de polyNAM-Lipide.

IV. Phénomène de « sur-retard » / Terminaison sur les radicaux intermédiaires.

IV-1. Mise au jour du phénomène de « sur-retard »

L'absence d'influence significative de la nature du ligand vis-à-vis de la cinétique de polymérisation RAFT de la NAM a été montrée précédemment (§ I-2.a), p.122). Cependant, à l'occasion de la synthèse de polymères α -fonctionnels de faibles masses molaires en vue de l'identification des extrémités de chaîne (4000g/mol, cf. §II, p.131), une allure cinétique inhabituelle a été observée pour la polymérisation de la NAM en présence de MEDBA.

En gardant un rapport $[ATC]/[AIBN]$ constant, la polymérisation RAFT de la NAM a la particularité de présenter toujours la même cinétique quelle que soit la masse visée (c'est-à-dire quel que soit le rapport $[NAM]/[ATC]$).² Ceci est parfaitement respecté pour la polymérisation en présence de BEDBA ou de SEDBA (Figure 18). En revanche, la polymérisation utilisant la MEDBA est systématiquement plus lente lorsqu'une masse plus faible est visée: les trois essais réalisés dans des conditions identiques présentent tous un plateau de conversion final aux alentours de 65% contre 75% pour l'allure habituelle (Figure 18).

Etant donné que la polymérisation RAFT de la NAM est déjà « retardée » par rapport à une polymérisation conventionnelle équivalente (cf. Figure 1, p.119), ce ralentissement supplémentaire de la polymérisation, observé uniquement en présence de MEDBA pour de faibles masses molaires visées, peut être vu comme un phénomène de « sur-retard ».

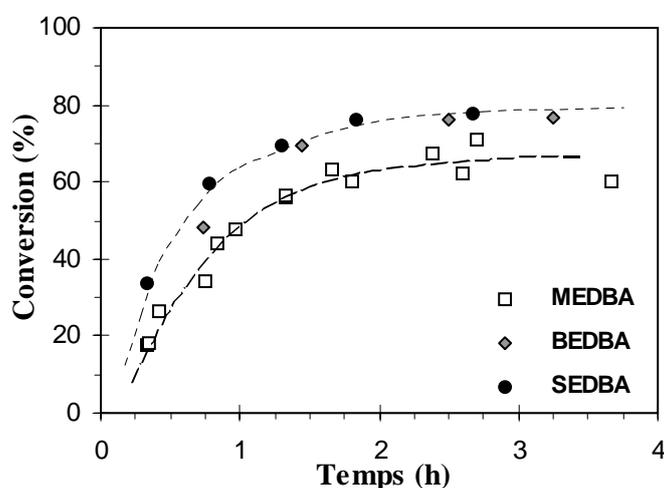


Figure 18 : Cinétiques de polymérisation RAFT de la NAM en présence de divers dithioesters-ligands ($[NAM]/[ATC]=28$) (MEDBA : compilation des points de 3 essais identiques; la courbe en pointillés supérieure est identique à celle de la Figure 2, p.122 et correspond au rapport $[NAM]/[ATC]=355$) [cond. exp. : cf. p.117]

IV-2. Hypothèses

Pour tenter de comprendre ce phénomène de « sur-retard » dans notre cas particulier, une première étape nécessaire est un bilan sur les connaissances actuelles au sujet du phénomène de retard.

a) Hypothèses de la littérature expliquant le phénomène de « retard »

La mise au jour du phénomène de retard provient de l'observation expérimentale d'un ralentissement de la polymérisation RAFT en comparaison à une polymérisation conventionnelle équivalente (c-a-d utilisant la même quantité d'amorceur). Les cas typiques et les plus étudiés sont les systèmes styrène/dithiobenzoate de cumyle^{16,17} et acrylate de méthyle/dithiobenzoate de cumyle^{5,16} pour lesquels un fort « retard » est observée. Dans ces cas-là, la concentration initiale en agent RAFT a une influence énorme sur l'allure cinétique : plus cette concentration augmente (à concentration en amorceur constante), plus la cinétique est ralentie. Un autre exemple de dépendance de la vitesse de polymérisation vis-à-vis de la concentration en agent RAFT est fourni par le système NIPAAm/dithiobenzoate de benzyle¹⁸.

Cependant, ce phénomène ne semble pas généralisable à tous les systèmes : certains cas présentent très peu de « retard » (ex : système styrène/ phenyldithioacetate de cumyle¹⁹). Dans ces cas-là, les cinétiques semblent indépendantes de la concentration initiale en agent RAFT.

Plus « inquiétant », ce ralentissement de la polymérisation RAFT n'est pas prédit par les équations cinétiques. En considérant un état quasi-stationnaire à l'équilibre, le traitement du mécanisme général de la polymérisation RAFT (cf. chapitre 2, p.67) conduit aux équations suivantes :

$$\text{AEQS} \rightarrow d[\text{P}^\bullet]/dt = 0 = V_a - 2.k_t.[\text{P}^\bullet]^2 - k_{add}.[\text{P}^\bullet].[P-X] + k_{frag}.[P-X^\bullet-P] \quad *$$

(avec V_a = vitesse d'amorçage)

$$\text{Equilibre} \rightarrow d[P-X^\bullet-P]/dt = 0 = -k_{add}.[\text{P}^\bullet].[P-X] + k_{frag}.[P-X^\bullet-P]$$

$$\text{d'où } [\text{P}^\bullet] = (V_a/(2.k_t))^{1/2}$$

$$\text{donc : vitesse de polymérisation } V_p = -d[M]/dt = k_p.[M].[\text{P}^\bullet] = k_p.[M].(V_a/(2.k_t))^{1/2} = V_{p,0} \quad !$$

($V_{p,0}$ = vitesse en polymérisation conventionnelle)

Ainsi, la cause chimique du phénomène de retard est le sujet d'une controverse active depuis les années 2000. Dans la littérature, deux hypothèses principales ont été avancées pour l'expliquer :

- 1- La constante de vitesse de fragmentation des radicaux intermédiaires k_{frag} serait relativement faible ($\sim 10^{-1}-10^{-2} \text{ s}^{-1}$), c'est-à-dire que la constante d'équilibre $K = k_{add}/k_{frag} = [P-X^\bullet-P]/([\text{P}^\bullet].[P-X])$ serait élevée. Par conséquent, la majeure partie des radicaux seraient sous la forme de radicaux intermédiaires (RI) ce qui réduirait d'autant la concentration en (macro)-radicaux propageants. Selon cette hypothèse, les RI sont supposés être insensibles à la terminaison à cause d'un encombrement stérique important. Parmi de nombreuses publications, celles de Christopher Barner-Kowollik^{5,17,19,20} et celles de Michelle L.

* $[P-X^\bullet-P]$, $[\text{P}^\bullet]$ et $[P-X]$ étant les concentrations respectives en radicaux intermédiaires, en radicaux propageants et en chaînes dormantes.

Coote²⁰⁻²² étayent cette hypothèse. Dans ce cas, la durée de vie des radicaux intermédiaires serait relativement élevée (de l'ordre de la seconde).²⁰

2- Les radicaux intermédiaires subiraient des réactions de terminaison *irréversibles* avec des (macro)radicaux (voire avec un autre radical intermédiaire). Ceci ajouterait une étape de terminaison supplémentaire dans le mécanisme général de la polymérisation RAFT, et réduirait le nombre global de radicaux dans le milieu et en particulier le nombre de radicaux propageants*. Cette hypothèse a été initialement proposée par Michael J. Monteiro²³⁻²⁵ avant d'être soutenue par, entre autres, Takeshi Fukuda²⁵⁻²⁸. La terminaison sur les radicaux intermédiaires devrait produire des chaînes polymère en étoile (à trois branches, voire à quatre branches). Même si de telles espèces ont effectivement été détectées dans des expériences modèles (sans monomère et avec une concentration élevée en amorceur)²⁷⁻²⁹ ou qu'elles ont parfois été suspectées lors d'analyses par SM MALDI-ToF d'échantillons issus de polymérisations RAFT^{10,30}, aucune publication n'a pour l'instant reporté la détection incontestable de telles structures parmi les produits d'une polymérisation RAFT.

Remarque : dans chacune des deux hypothèses, la propagation à partir du radical intermédiaire n'est pas envisagée en raison de sa forte stabilisation qui le rend inapte à l'amorçage de nouvelles chaînes.

Très rapidement, la superposition des deux hypothèses a été envisagée³¹. En effet, ces deux théories ne sont pas contradictoires : plus la durée de vie des radicaux intermédiaires est élevée, plus la probabilité qu'ils subissent des réactions de terminaison est également élevée. Les deux hypothèses peuvent donc se compléter, même si des désaccords importants subsistent concernant l'ordre de grandeur de k_{frag} (une différence de 6 ordres de grandeur entre les deux « camps »)*. Ainsi, dans le cas de l'utilisation de dithiobenzoates comme agents RAFT, la possibilité d'une terminaison *réversible* entre deux RI a également été proposée par C. Barner-Kowollik³².

Récemment, une publication de Buback *et al.*³³ conclut que l'hypothèse de la fragmentation lente ne peut se passer de l'hypothèse de la terminaison (irréversible) des RI : supposer à la fois que les radicaux intermédiaires fragmentent lentement et ne participent pas à des réactions de terminaison n'est pas compatible avec les résultats expérimentaux présentés dans cette étude (mesures par ESR de concentrations des diverses espèces radicalaires).

b) Hypothèse concernant le « sur-retard »

En supposant que le phénomène de « sur-retard » observé soit tout simplement un phénomène de retard *amplifié*, l'application des hypothèses mentionnées ci-dessus n'est pas évidente et peut se résumer en quatre questions:

- En quoi la présence d'un ligand morpholine en extrémité α diminuerait k_{frag} ?
- Pourquoi cette influence particulière ne serait-elle pas présente lorsque les masses molaires visées sont plus importantes ?
- En quoi la présence d'un ligand morpholine en extrémité α favoriserait la terminaison sur les radicaux intermédiaires ?

* ici, $k_{frag} \sim 10^3 - 10^5 \text{ s}^{-1}$.

* A la lecture des titres de certaines publications, le débat semble effectivement engagé : réf. 17 : « ...Comment on "The Magnitude of the Fragmentation Rate Coefficient" » et réf. 22 : « A Difference of Six Orders of Magnitude: A Reply to "The Magnitude of the Fragmentation Rate Coefficient" ».

- Quelle est la particularité du ligand morpholine par rapport aux autres ligands ?

La structure éthyldithiobenzoate amide (EDBA) étant commune à tous nos dithioesters-ligands, il est difficile de concevoir une influence de la nature du ligand sur la valeur de la constante de vitesse de fragmentation, k_{frag} . De plus, si le ligand morpholine induisait effectivement une diminution de cette valeur, une diminution de la vitesse de polymérisation aurait dû être également observée lors de la polymérisation visant une masse molaire de 50000 g/mol.

En revanche, sans donner de réponse à la troisième question, l'influence de la longueur des chaînes portées par le radical intermédiaire est facilement imaginable : plus la masse molaire augmente, plus le radical intermédiaire est encombré et par conséquent moins il est sensible aux réactions de terminaison éventuelles.² Dans le cadre de l'hypothèse 2, on peut donc concevoir que la nature du ligand ait une influence sur la probabilité de terminaison des radicaux intermédiaires, uniquement sur la gamme des faibles masses molaires. Reste à imaginer laquelle ?

Or, une particularité du ligand morpholine qui le distingue des autres ligands (dans le cadre de la polymérisation de la NAM) est sa *similitude de structure* avec le monomère. Ainsi, une différence de conformation des chaînes autour du radical intermédiaire peut être envisagée. Cela aurait un impact direct sur la possibilité de réactions de terminaison (Schéma 5).

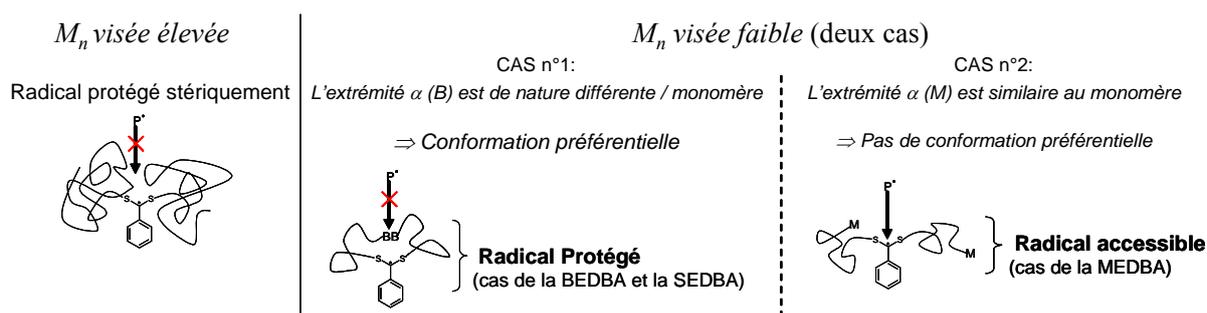


Schéma 5 : Représentation schématique de l'hypothèse de l'influence de la nature du ligand présent en α des chaînes, sur la conformation des radicaux intermédiaires de faibles masses molaires.

Selon notre hypothèse, un ligand de nature différente de celle du monomère (par exemple la biotine, le sucre protégé, le lipide,...) favoriserait une conformation particulière des chaînes qui permettrait de les confiner autour du radical intermédiaire (RI). Ce confinement des chaînes amènerait une protection du RI vis-à-vis de la terminaison, même lorsque les chaînes sont trop petites pour assurer d'elles même un encombrement stérique suffisant. Dans le cas du ligand morpholine, ce confinement est absent et par conséquent il est nécessaire que les chaînes atteignent une longueur critique avant de pouvoir protéger le RI vis-à-vis d'un événement de terminaison.

Cette hypothèse expliquerait pourquoi le phénomène de « sur-retard » n'est observable que lorsque la masse visée est faible : imaginons que la « longueur minimale de protection du RI » soit 1000g/mol (c-a-d DP~6 avec la NAM). Lorsque la masse molaire visée est égale à 4000g/mol, il faut atteindre 25% de conversion pour assurer la protection des RI. Lorsque la masse molaire visée est de 50000g/mol, il suffit d'atteindre seulement 2% de conversion, donc dès les premières minutes de la polymérisation (et dès la période d'induction) les radicaux intermédiaires seraient déjà « protégés ».

Les travaux récents de Wang *et al.*³⁴ au sujet de la polymérisation RAFT en présence d'un trithiocarbonate symétrique étayent le principe de protection des RI par des chaînes ayant atteint une longueur critique : dans cette publication, un schéma similaire au Schéma 5 ci-dessus illustre l'encombrement stérique de l'agent RAFT dû à la croissance de deux chaînes polymère de part et d'autre du trithiocarbonate (Schéma 6). Celles-ci l'empêchent de jouer son rôle d'agent de contrôle ce qui conduit à une perte flagrante de contrôle lorsque la masse molaire visée est égale à 30000 g/mol. Pour les polymérisations visant une masse molaire inférieure à 7000g/mol aucun problème n'est reporté, ce qui laisse supposer que les chaînes ne sont jamais assez longues pour « protéger stériquement » le trithiocarbonate de l'addition d'un radical propageant. Dans ce cas, la protection stérique est néfaste au bon déroulement de la polymérisation RAFT, alors que dans notre cas elle est favorable puisqu'elle empêche des événements de terminaison irréversible.

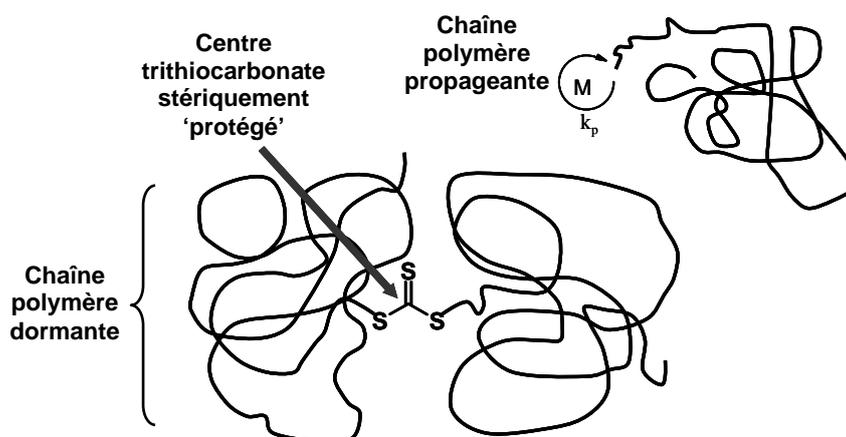


Schéma 6 : Hypothèse de la protection stérique d'un centre trithiocarbonate, proposée par Wang *et al.*³⁴
(Schéma traduit issu de la publication)

Si l'hypothèse d'influence de la nature du ligand sur une protection stérique des radicaux intermédiaires de faibles masses molaires s'avère proche de la réalité, un essai de polymérisation de la NAM en visant une masse molaire encore plus faible (~2.000 g/mol) devrait présenter un ralentissement de la cinétique encore plus important, et une plus grande différence entre la MEDBA et les autres dithioesters-ligands.

IV-3. Confirmation cinétique

Comme prédit par l'hypothèse ci-dessus, la diminution supplémentaire du rapport $[NAM]/[ATC]$ (de 28 à 14, c-a-d une masse molaire visée de 4000 g/mol et 2000 g/mol respectivement) a effectivement une influence très importante sur la cinétique de polymérisation en présence de MEDBA, alors que l'influence est négligeable dans le cas de la SEDBA (Figure 19).

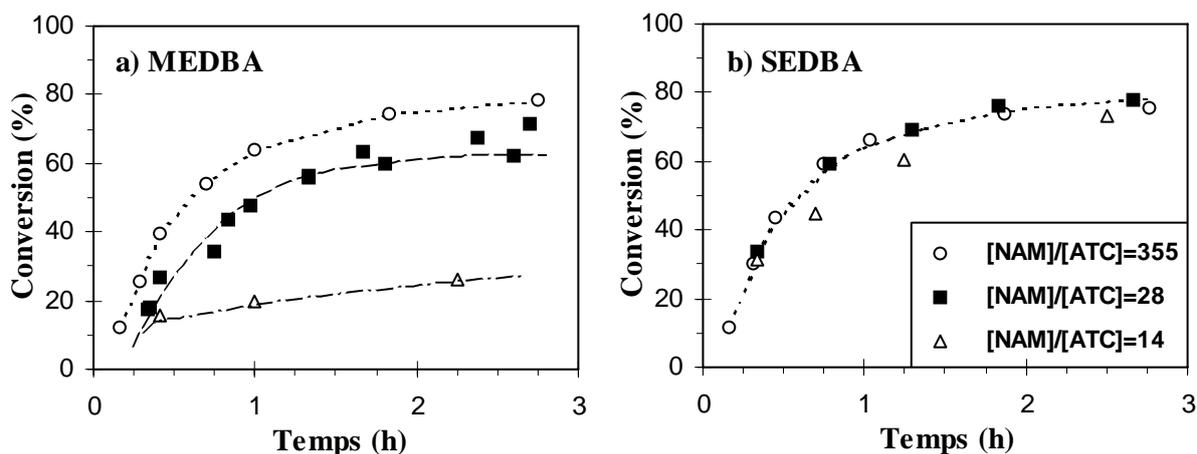


Figure 19 : Cinétiques de polymérisation RAFT de la NAM en présence de MEDBA (a) ou de SEDBA (b) pour différents rapports $[NAM]/[ATC]$ (courbe en pointillé identiques en a et b) [cond. exp. : cf. p.117].

La cinétique est extrêmement ralentie dans le cas de la polymérisation en présence de MEDBA avec un rapport $[NAM]/[ATC]$ égal à 14. Cela pourrait indiquer l'intervention encore plus importante de réactions de terminaison sur les radicaux intermédiaires. Serait-il possible d'identifier ces RI terminés par spectrométrie de masse MALDI-ToF, malgré l'utilisation d'un rapport $[ATC]/[AIBN]$ élevé (égal à 10)* ?

IV-4. Confirmation par spectrométrie de masse MALDI-ToF

L'analyse par spectrométrie de masse MALDI-ToF de l'échantillon final (26% de conversion) de la polymérisation fortement « sur-retardée » correspond *a priori* à un spectre classique d'une polymérisation RAFT pour laquelle l'étape de pré-équilibre est encore présente : les pics principaux correspondent bien aux chaînes dormantes, la distribution s'étend d'un degré de polymérisation nul (c-a-d MEDBA résiduelle) au degré de polymérisation 10 (Figure 20).

* $[ATC]/[AIBN] = 10 \Rightarrow$ La proportion maximale de chaînes mortes, dont les RI terminés ne sont qu'une partie, est théoriquement réduite à 9% de l'ensemble des chaînes.

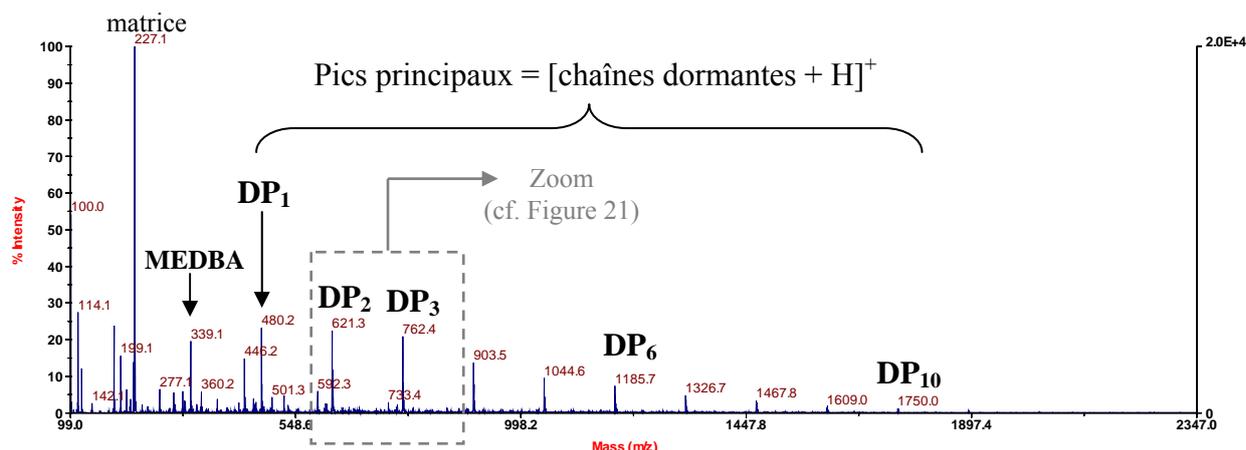


Figure 20 : Spectre de masse MALDI-ToF de l'échantillon de polyNAM issu de la polymérisation en présence de MEDBA avec le rapport [NAM]/[ATC] égal à 14 (Figure 19) (cationisation principale = H⁺).

Cependant, après une analyse méticuleuse, la masse des populations secondaires visibles autour des degrés de polymérisation 2 et 3 s'avère correspondre à des radicaux intermédiaires terminés (Figure 21) !

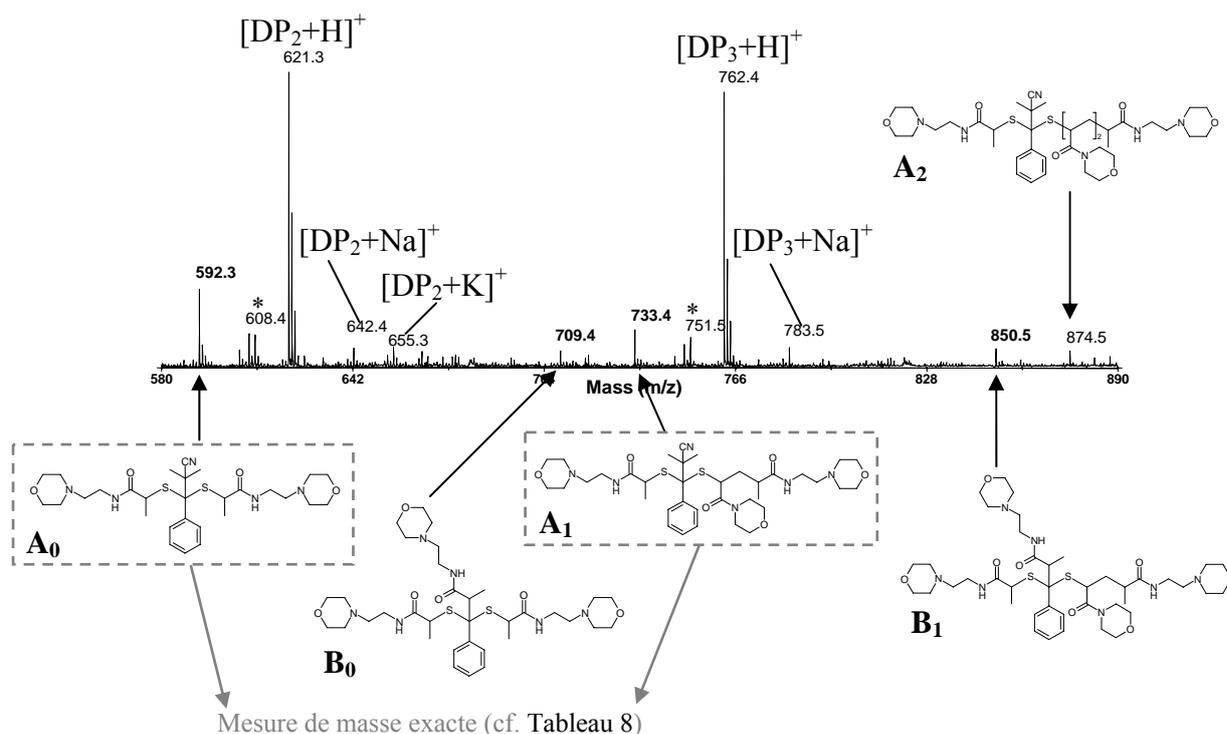


Figure 21 : Zoom du spectre de la Figure 20 ; identification de la structure des radicaux intermédiaires terminés (* fragmentation des chaînes dormantes dans le spectromètre).

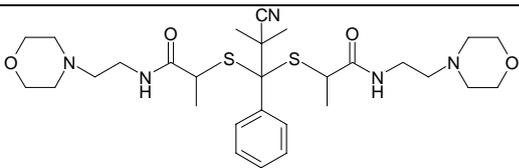
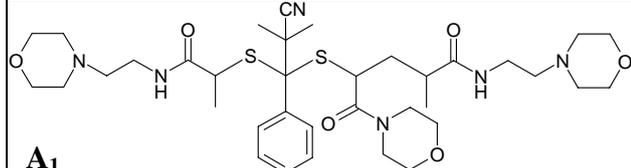
De manière un peu inattendue, les structures identifiées (A₀, A₁, A₂, B₀ et B₁) ne présentent aucune, une seule ou deux unités NAM : la structure A₀ correspond à un RI issu de l'addition d'un radical ré-amorceur R[•] sur l'agent RAFT initial et terminé par un radical primaire issu de l'AIBN (ou inversement). La structure B₀ correspond à un RI issu de l'addition d'un radical ré-amorceur R[•] sur l'agent RAFT initial et terminé également par un radical R[•]. Les structures A₁, A₂ et B₁ sont respectivement semblables à A₀ et à B₀ mais avec une ou deux unités NAM additionnelles (la position de ces unités dans les structures proposées n'est qu'un exemple parmi les autres structures possibles).

Des structures présentant plus de deux unités NAM n'ont pas été détectées ; cela semblerait indiquer que l'encombrement stérique minimal limitant la terminaison sur les RI serait atteint dès l'addition de quelques unités monomères.

D'autre part, le schéma général du mécanisme RAFT (cf. p.67) proposé dans la plupart des publications suggère l'addition de quelques unités monomères sur les radicaux primaires conduisant à des oligoradicaux qui interviennent alors dans l'étape de pré-équilibre. Comme déjà proposé³¹, la détection des espèces A_x confirme que dans nos conditions de polymérisation, les radicaux primaires eux-même peuvent être impliqués dans cette étape (addition directe sur un agent RAFT ou terminaison d'un RI) avant même l'addition d'une unité monomère.

Pour s'assurer d'une attribution correcte des pics, une détermination de masse exacte* a été réalisée sur les deux pics les plus importants (A_0 et A_1). Après calibration du spectre sur les pics principaux correspondant aux chaînes dormantes, les masses déterminées confirment avec certitude la présence des structures A_0 et A_1 dans notre échantillon (Tableau 8).

Tableau 8 : Mesure de masse exacte de 2 des structures identifiées à la Figure 21.

Structure	Formule brute	Masse calculée	Masse expérimentale	Ecart relatif (ppm)
<p>A₀</p> 	$C_{29}H_{46}N_5O_4S_2$	592,2986	592,3002	2,7
<p>A₁</p> 	$C_{36}H_{57}N_6O_6S_2$	733,3775	733,3761	-2,0

* Détermination de la masse avec une précision de 4 chiffres après la virgule. Cela est généralement possible grâce à une calibration interne du spectre (en mode réflectron). Dans le cas d'une calibration externe, la précision est limitée à 1 chiffre après la virgule.

IV-5. Conclusion

- Origine du « sur-retard »

La terminaison sur les radicaux intermédiaires est très probablement la cause du phénomène de « sur-retard » observé uniquement lors de la polymérisation RAFT de la NAM en présence de MEDBA et en visant de faibles masses molaires (<5000 g/mol).

Lorsque des masses molaires plus élevées sont visées et quelle que soit la nature des extrémités de chaîne, l'encombrement stérique des deux chaînes portées par le radical intermédiaire semble suffisant pour éviter les événements de terminaison.

Dans la gamme des faibles masses molaires, la nature de l'extrémité α des chaînes par rapport à la structure du monomère semble jouer un rôle primordial : dans la plupart des cas, une nature différente permet une modification de la conformation du RI. Cela conduirait à un confinement des chaînes autour du RI réduisant ainsi sa probabilité de terminaison. Dans l'unique cas de la MEDBA, la similitude de structure du ligand morpholine avec celle du monomère n'induit pas de conformation préférentielle ; l'approche d'un radical puis la terminaison irréversible n'est pas défavorisée.

Cependant, la nature des radicaux intermédiaires terminés décelés par spectrométrie de masse MALDI-ToF semble indiquer que le phénomène de protection des RI par modification de sa conformation n'est profitable que pour des chaînes de degré de polymérisation extrêmement réduit (oligomère de DP <3) : seul des RI terminés de DP inférieur à 3 ont été détectés dans le cas où la nature du ligand ne permet pas de protection (MEDBA).

- Conséquence sur l'origine du « retard » :

Malgré la preuve que la terminaison des radicaux intermédiaires est possible dans des conditions de polymérisation RAFT, les résultats décrits ne sont guère en faveur de l'hypothèse de cette terminaison irréversible comme origine du phénomène de « retard ». En effet, les polymérisations non « sur-retardées » pour lesquelles la terminaison sur les RI semble absente sont « retardées » en comparaison à la polymérisation conventionnelle. De plus, il semble que la terminaison des RI soit limitée aux espèces oligomères présentes en tout début de polymérisation alors que, par exemple, le phénomène de « retard » a également lieu lorsque la polymérisation RAFT est effectuée en présence de macro-agent RAFT²⁷. La généralisation du phénomène de terminaison des radicaux intermédiaires, pourtant détectés dans notre cas, semble ainsi extrêmement délicate.

L'hypothèse de M.J. Monteiro ne paraît donc pas compatible avec nos résultats expérimentaux. Or, d'après la récente publication de Buback *et al.*³³ (cf. p.152), celle de C. Barner-Kowollik (k_{frag} faible) ne semble pas valide sans la première.... Ainsi, d'après les résultats présentés ici, aucune des deux hypothèses de la littérature ne semble donc correspondre à la réalité du phénomène de « retard »...

V. Conclusion du chapitre 3

Après le chapitre 2 qui a décrit en détail la synthèse de dithioesters-ligands, ce chapitre valide la deuxième étape que constitue la polymérisation de type RAFT en présence de chacun des dithioesters-ligands synthétisés.

En effet, la polymérisation de la NAM est contrôlée, et, présente dans la majorité des cas, une unique cinétique, relativement rapide, et indépendante de la nature du ligand.

Les techniques de caractérisation telles que la chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur de diffusion de la lumière (CES/DDL), la RMN ^1H et la spectrométrie de masse MALDI-ToF ont permis de rassembler tous les critères assurant l'obtention de polymères α -fonctionnels parfaitement définis :

- croissance linéaire des masses molaires moyennes en nombre avec la conversion (et valeurs très proches des valeurs théoriques).
- indice de polymolécularité très faible, inférieur à 1,1.
- conservation des ligands biologiques présents en extrémité α des chaînes en cours de polymérisation.
- taux de fonctionnalisation des chaînes élevés (au moins supérieurs à la valeur théorique de 91%).

Pour assurer un taux de fonctionnalisation optimal, il convient de limiter un phénomène de fragmentation de chaînes (consécutif à du transfert au polymère), également mis à jour lors de la polymérisation conventionnelle de la NAM à 90°C. Cependant, en utilisant la technique RAFT, l'arrêt de la polymérisation à 70-75% de conversion est un moyen très simple d'éviter ce phénomène défavorable à la synthèse de conjugués bien définis.

D'un point de vue plus fondamental, deux phénomènes distincts ont été mis en évidence :

- La nature de l'extrémité α (ligand) ainsi que celle de l'extrémité ω (dithiobenzoate) des chaînes a une influence non négligeable sur l'élution des chaînes polyNAM-ligand dans les colonnes de chromatographie. Ce constat met en avant l'importance d'utiliser une technique d'analyse de la distribution des masses molaires indépendante de toute calibration, telle que la technique CES/DDL par exemple.
- Tous les essais de polymérisations RAFT effectués sont classiquement « retardés » en comparaison à une polymérisation conventionnelle. En plus de ce phénomène, dont l'origine reste encore en débat, un épiphénomène de « sur-retard » a été mis en évidence lors de l'utilisation du dithioester-morpholine en polymérisation RAFT de la NAM. L'origine de ce phénomène est vraisemblablement une des hypothèses proposées dans la littérature pour expliquer le « retard » : la terminaison irréversible sur les radicaux intermédiaires. Pour la première fois, des radicaux intermédiaires terminés ont été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-ToF dans un échantillon issu d'une polymérisation RAFT.

Cependant, et de manière assez inattendue, nos résultats expérimentaux associés à ceux de Buback *et al.*³³ (cf. p.152) mettent en doute la validité des deux hypothèses proposées dans la littérature concernant le phénomène de « retard ». Cela élargit le débat et pourrait laisser la place à de nouvelles hypothèses...

Les chapitres 2 et 3 ont fait l'objet :

- d'un dépôt de demande de brevet, par la Société bioMérieux, le CNRS et l'ESCPE.
Inventeurs : F. D'Agosto, M. Bathfield, M-T. Charreyre.

- d'une publication :

"Versatile Precursors of Functional RAFT Agents. Application to the Synthesis of Bio-Related End-Functionalized Polymers"

Maël Bathfield, Franck D'Agosto, Roger Spitz, Marie-Thérèse Charreyre, Thierry Delair
J. Am. Chem. Soc. **2006**, 128, 2546-2547.

- de deux posters :

"Bio-related α -end-functionalized polymers synthesized by the RAFT process"

M. Bathfield, C. Ladavière, F. D'Agosto, M-T. Charreyre, T. Delair.

8th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies (PAT 2005),
Budapest, Hongrie (13-16 sept. 2005).

"Additional Retardation during RAFT Polymerization: Detection of Terminated Intermediate Radicals"

M. Bathfield, F. Delolme, C. Ladavière, F. D'Agosto, M-T. Charreyre, T. Delair.

4th IUPAC sponsored International Symposium on Radical Polymerization: Kinetics and Mechanism (SML'06), Lucca, Italie (3-8 sept. 2006).

- de trois publications en préparation :

"Additional Retardation during RAFT Polymerization: Detection of Terminated Intermediate Radicals"

Maël Bathfield, Franck D'Agosto, Roger Spitz, Catherine Ladavière, Marie-Thérèse Charreyre, Thierry Delair

"Kinetics and Molecular Weight Distribution Studies on RAFT polymerization using bio-functional dithioesters"

Maël Bathfield, Franck D'Agosto, Roger Spitz, Marie-Thérèse Charreyre, Thierry Delair

"MALDI-TOF MS investigation of the RAFT polymerization using bio-functional dithioesters".

Maël Bathfield, Franck D'Agosto, Roger Spitz, Catherine Ladavière, Marie-Thérèse Charreyre, Thierry Delair

Versatile Precursors of Functional RAFT Agents. Application to the Synthesis of Bio-Related End-Functionalized Polymers

Maël Bathfield,^{†,‡} Franck D'Agosto,^{*,‡} Roger Spitz,[‡] Marie-Thérèse Charreyre,^{*,†} and Thierry Delair[†]

Unité Mixte CNRS-bioMérieux, École Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France, and The Laboratoire de Chimie et Procédés de Polymérisation, UMR 140 CNRS/ESCP, Bât 308 F, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, BP 2077, 69616 Villeurbanne Cedex, France

Received November 15, 2005; E-mail: mtcharre@ens-lyon.fr; franck.dagosto@lcpp.cpe.fr

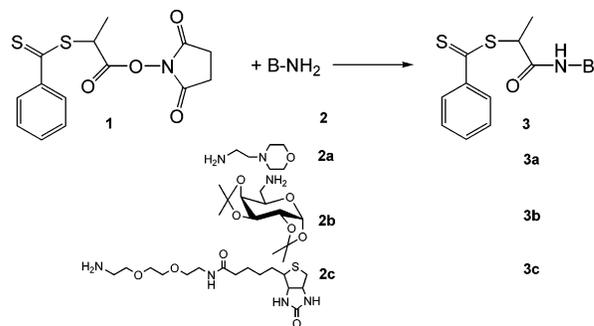
Biomolecule–polymer conjugates are widely used in medicine and biotechnology,^{1–3} with the biomolecule being either a macromolecule, such as a nucleic acid sequence, a peptide, or a protein, or a molecular species, such as a sugar, a lipid, or a biotin. Usually, the biomolecule–polymer conjugate is designed such that multiple copies of the biomolecule are randomly bound all along the polymer chain. Another interesting conjugate architecture consists of the presence of a single biomolecule located, for instance, at one chain end. Such a structure may (i) favor an oriented binding of the polymer chain onto a specific support exhibiting complementary moieties to the chosen biomolecule; (ii) promote the occurrence of various types of recognition events on a single chain, if another kind of biomolecule is bound along the chain; (iii) lead to a great variety of conjugates, bearing, for instance, a biomolecule at one end and non-bio-related compounds along the polymer chain, such as colorimetric or fluorescent labels.

The usual strategy to introduce a molecule of interest at a polymer chain end consists in binding an appropriate derivative of that molecule onto a reactive group located at the polymer chain end.^{4–6} However, the binding yield depends on the reactivity of the two counterparts and decreases with the increase in the polymer chain length. Another strategy consists in introducing the molecule of interest in a compound which will be used to initiate the polymer chains. Hence, each polymer chain will bear one biomolecule at the α -end.^{7–9} In addition, if a homogeneous chain size distribution is required, it will be necessary to use a so-called living/controlled polymerization process.

In recent years, the field of free-radical polymerization has been revolutionized by the development of techniques for controlling the molecular weight and the architecture of polymer chains. Among the most versatile approaches, the reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization is carried out with thiocarbonylthio compounds (of the general formula $Z-C(=S)-SR$, known as RAFT agents), which reversibly react with growing radicals via chain transfer reactions.^{10,11} Consequently, chains undergo successive active/dormant cycles that minimize radical–radical termination processes and lead to a simultaneous growth of all chains. Besides exhibiting a narrow molar mass distribution and a controlled chain length, the obtained polymer chains are characterized by the presence of the R and Z groups—from the RAFT agent—at their α - and ω -ends, respectively.

Then, the modification of the structure of the RAFT agent, that is, the R and Z groups, appears as a highly powerful means for introducing a molecule of interest at polymer chain ends. As the Z group may easily be removed from the chain via hydrolysis or aminolysis, focusing on R group modifications seems to be a promising strategy. Several RAFT agents bearing a molecule of

Scheme 1. Functional RAFT Agent Synthesis from Precursor 1



interest in the R group were recently synthesized with either a fluorophore,¹² carbohydrates,¹³ or a natural polymer, such as cotton.¹⁴ However, in these various examples, the link between that molecule and the thiocarbonylthio moiety was an ester, a labile group imparting a limited stability to the material. In any case, the modification chemistry should preserve the thiocarbonylthio moiety responsible for the control of the polymerization. For instance, chemistry involving amine groups should be proscribed since they rapidly degrade the thiocarbonylthio function by thioamidation.¹⁵

The approach we propose relies on the design of RAFT agent precursor, **1**, bearing an activated ester in the R group (Scheme 1).¹⁶ Succinimidyl ester moieties readily react with nucleophiles in a one-step reaction;¹⁷ hence the amidation reaction of **1** by amino derivatives, **2**, should be favored rather than the thioamidation. Moreover, the resulting RAFT agent, **3**, would present a more stable link compared to esters.

This synthetic approach was first assessed with a model compound, *N*-aminoethylmorpholine, **2a**. A careful optimization of the conditions led to functional RAFT agent **3a** (68% yield after purification, full characterization in Supporting Information), without any degradation of the thiocarbonylthio moiety as long as the **2/1** molar ratio remained lower than 1.

The successful synthesis of the model compound prompted us to explore the use of amino derivatives of biomolecules, a carbohydrate derivative, 6-amino-6-desoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropylidene-6- α -D-galactopyranose, **2b**, and a biotin derivative, (+)-biotinyl-3,6-dioxaoctanediamine, **2c**. They reacted with **1** under the same conditions as for **2a** (Scheme 1). After purification, pure RAFT agents **3b** and **3c** were isolated (66 and 72% yield, respectively) and characterized by ¹H and ¹³C NMR, elemental analyses, and mass spectrometry (Figure 1 and Supporting Information).

To assess the control efficiency of the new functional RAFT agents, the polymerization of a biocompatible acrylamide derivative, *N*-acryloylmorpholine (NAM), was performed in the presence of **3a** using previously optimized conditions for NAM.¹⁸ A conversion

[†] École Normale Supérieure de Lyon.

[‡] Laboratoire de Chimie et Procédés de Polymérisation.

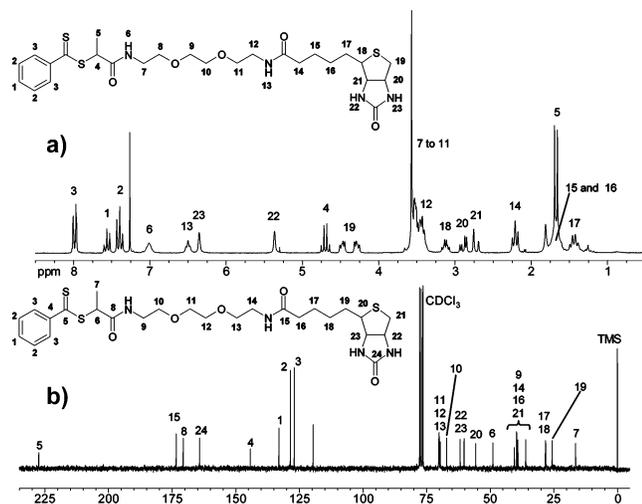


Figure 1. (a) ^1H NMR (200 MHz) and (b) ^{13}C NMR (50 MHz) spectra of **3c** in CDCl_3 with the corresponding assignments.

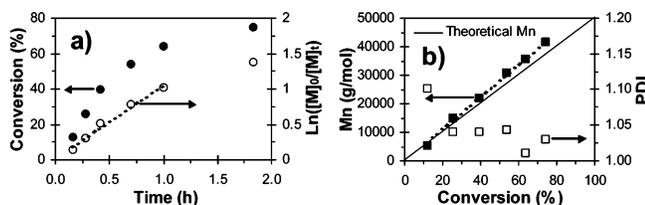


Figure 2. *N*-Acryloylmorpholine (NAM) polymerization mediated by **3a** in dioxane at 90°C ; $[\text{NAM}]_0 = 1.6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{NAM}]_0/[\mathbf{3a}]_0 = 355$; $[\mathbf{3a}]_0/[\text{AIBN}]_0 = 10$. (a) Kinetics plots. (b) Evolution of molar masses and polydispersity indexes (PDI) versus conversion.

Table 1. Theoretical and Experimental Molar Masses Obtained by Size Exclusion Chromatography (using light scattering detection) for *N*-Acryloylmorpholine RAFT Polymerization Mediated by **1** or **3b** or **3c** in Dioxane at 90°C ; $[\text{NAM}]_0 = 1.6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{NAM}]_0/[\text{RAFT Agent}]_0 = 355$; $[\text{RAFT Agent}]_0/[\text{AIBN}]_0 = 10$

RAFT agents	conversion (%)	theoretical M_n ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	SEC M_n ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	PDI
1	42	21200	28200	1.07
	82	41000	42300	1.11
3b	43	22200	22600	1.02
	74	37300	38200	1.03
3c	28	14800	15500	1.02
	63	32100	31800	1.09

higher than 70% was reached in less than 2 h, and the linearity of the first-order kinetic plot confirmed that steady-state conditions were fulfilled (Figure 2a). The linear increase of the molar masses versus conversion (Figure 2b, obtained by aqueous size exclusion chromatography (SEC) using a three angle light scattering detector; see Supporting Information) as well as the low PDI values evidenced the controlled behavior of the polymerization.

Then, the RAFT homopolymerization of NAM was carried out in the presence of **3b** and **3c**. Again, an excellent agreement was observed between experimental and theoretical molar masses together with low PDI values (Table 1). Finally, MALDI-ToF mass spectrometry analyses confirmed the presence of the biomolecule at the chain end: in the case of a poly(NAM)-carbohydrate of polymerization degree 18, a molar mass of 3029.3 mass units was obtained for a theoretical value of 3029.6 mass units (3144.5 mass units for 3144.6 mass units in the case of a poly(NAM)-biotin).

As shown in Table 1, it is worth mentioning that the precursor **1** itself does control the RAFT polymerization of NAM, leading to polymer chains with a succinimidyl ester α -end group.

In conclusion, we have developed a new straightforward approach to prepare functional RAFT agents for applications in various fields. The use of a precursor RAFT agent bearing a succinimidyl activated ester group favors the reaction of amino derivatives without any competitive degradation of the thiocarbonylthio function. The generated amido link makes these RAFT agents very stable. In addition to precursor **1** (leading to a secondary fragment radical during the RAFT process), another precursor leading to a tertiary fragment radical has been synthesized (**4**; see Supporting Information).¹⁶ This molecule was prepared at the same time by Pan et al. to elaborate dithioester-terminated dendrimers.¹⁹ A wide range of monomers may be polymerized with the two RAFT agent precursors or with their amido-linked derivatives, giving rise to polymer chains carrying a succinimidyl ester or a biomolecule as the α -end group. Other amino derivatives, either bio-related (nucleotides, lipids, peptides) or non-bio-related (fluorophores, silanes, polymer chains) may be introduced into RAFT agents according to this very general strategy.

Acknowledgment. The authors thank G. Gody and Dr. P. Boullanger (UMR 5181, Villeurbanne, France) for the synthesis of the carbohydrate derivative **2b**, Dr. A. Favier (CNRS-bioMérieux) for the synthesis of ACPS, as well as Dr. C. Ladavière (CNRS-bioMérieux) for the MALDI-ToF mass spectrometry analyses. M.B. acknowledges the French Research Ministry for a Ph.D. grant.

Supporting Information Available: Materials and methods and characterizations of the different RAFT agents. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- Hoffman, A. S. *Clin. Chem.* **2000**, *46*, 1478–1486.
- Duncan, R. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 347–360.
- Delair, T.; Charles, M.-H.; Cros, P.; Laayoun, A.; Mandrand, B.; Pichot, C. *Polym. Adv. Technol.* **1998**, *9*, 349–361.
- Tao, L.; Mantovani, G.; Lecolley, F.; Haddleton, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13220–13221.
- Kulkarni, S.; Schilli, C.; Mueller, A. H. E.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 747–753.
- (a) Mantovani, G.; Lecolley, F.; Tao, L.; Haddleton, D. M.; Clerx, J.; Cornelissen, J. J. L. M.; Velonia, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2966–2973. (b) Ladmiral, V.; Monaghan, L.; Mantovani, G.; Haddleton, D. M. *Polymer* **2005**, *46*, 8536–8545. (c) Lecolley, F.; Tao, L.; Mantovani, G.; Durkin, I.; Lautru, S.; Haddleton, D. M. *Chem. Commun.* **2004**, *18*, 2026–2027.
- Bon, S. A. F.; Haddleton, D. M. *Polymer Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry)* **1999**, *40*, 248–249.
- (a) Gotz, H.; Harth, E.; Schiller, S. M.; Frank, C. W.; Knoll, W.; Hawker, C. J. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2002**, *40*, 3379–3391. (b) Qi, K.; Zhou, C.; Walker, A. V.; Wooley, K. L.; Jhaveri, S. B.; Malkoch, D. Y. S. M.; Beinhoff, M.; Carter, K. R.; Hawker, C. J. *Polymer Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry)* **2005**, *46*, 363.
- Qi, K.; Ma, Q.; Remsen, E. E.; Clark, C. G., Jr.; Wooley, K. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6599–6607.
- Le, T. P.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. (E.I. Du Pont De Nemours and Co., USA), WO 9801478, 1998.
- Chiefari, J.; Chong, Y. K.; Ercole, F.; Krstina, J.; Le, T. P. T.; Mayadunne, R. T. A.; Meijs, G. F.; Moad, G.; Moad, C. L.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559–5562.
- Chen, M.; Ghiggino, K. P.; Mau, A. W. H.; Rizzardo, E.; Thang, S. H.; Wilson, G. *J. Chem. Commun.* **2002**, 2276–2277.
- Stenzel, M. H.; Davis, T. P.; Fane, A. G. *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2090–2097.
- Perrier, S.; Takolpuckdee, P.; Westwood, J.; Lewis, D. M. *Macromolecules* **2004**, *37*, 2709–2717.
- Deletre, M.; Levesque, G. *Macromolecules* **1990**, *23*, 4733–4741.
- D'Agosto, F.; Bathfield, M.; Charreyre, M.-T. France Patent Application Filing, July 4, 2005.
- Anderson, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1839–1842.
- Favier, A.; Charreyre, M.-T.; Pichot, C. *Polymer* **2004**, *45*, 8661–8674.
- Zheng, Q.; Pan, C.-Y. *Macromolecules* **2005**, *38*, 6841–6848.

JA057481C

Maël Bathfield^{1,2}, Catherine Ladavière¹, Franck D'Agosto², Marie-Thérèse Charreyre¹, Thierry Delair¹

franck.dagosto@lcpp.cpe.fr, marie-therese.charreyre@ens-lyon.fr

¹ SMPH - CNRS/bioMérieux - UMR 2714 - ENS-Lyon - 46, Allée d'Italie - 69364 Lyon cedex 07 - FRANCE

² LCPP - CNRS/ESCE - UMR 140 - Bât. 308F - 43, Bd du 11 Novembre 1918 - B.P. 2077 - 69616 Villeurbanne cedex - FRANCE

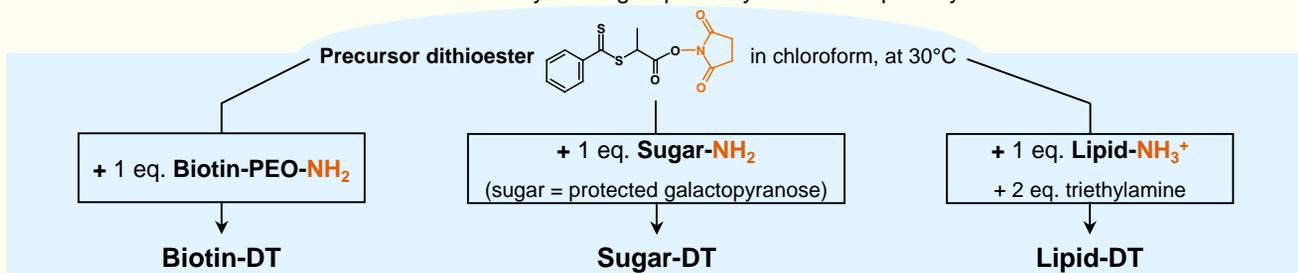
How to get well-defined polymers bearing a bio-molecule at one end ?

Why not using RAFT polymerization mediated by a bio-functionalized chain transfer agent ?

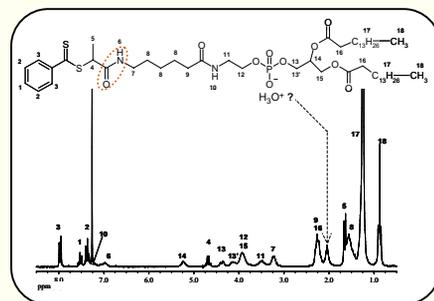
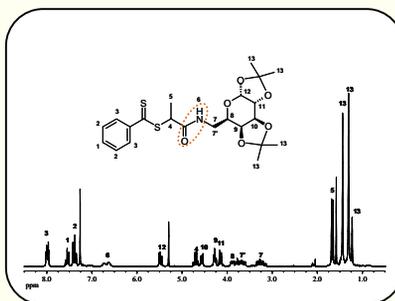
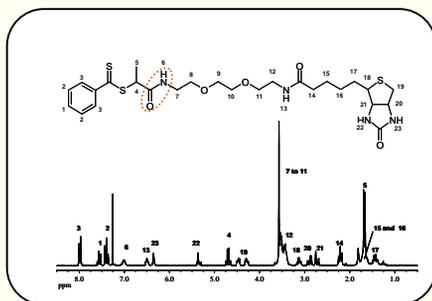
Q1: Is there a versatile way to synthesize stable bio-functionalized dithioesters (bio-DT) ?

The activated succinimidyl ester group readily reacts with primary amine.

RAFT agent synthesis



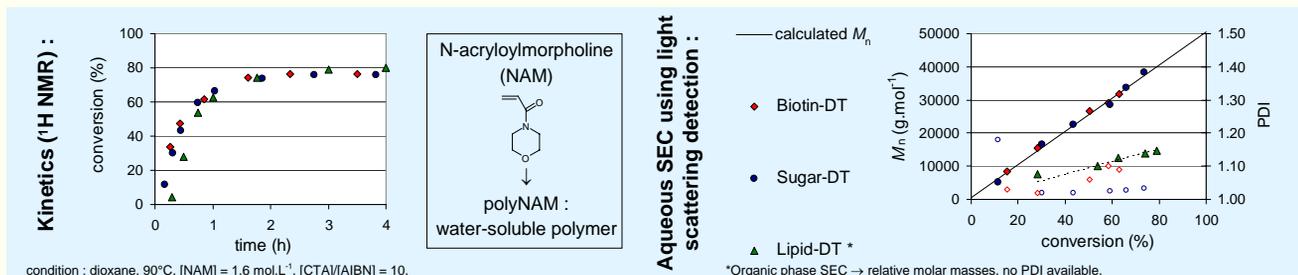
¹H NMR (CDCl₃)



Bio-DT obtained with high yield (>65%) and purity (>95%), and characterized by ¹³C NMR, elementary analyses and mass spectrometry.

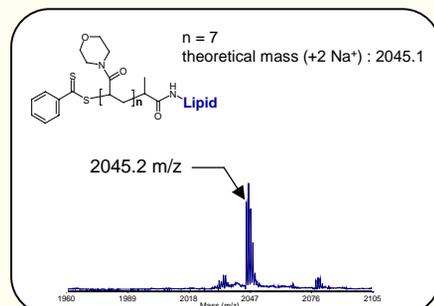
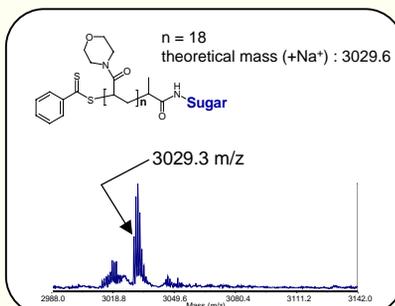
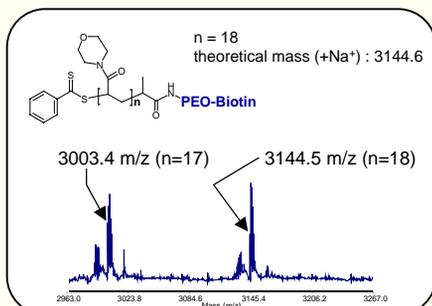
Q2: Do these bio-DT efficiently control N-acryloylmorpholine polymerization ?

Polymerization



Q3: Bio-functionality : still present at the α -end of the polymer chains ?

MALDI-TOF MS



⇒ Living behavior (dormant chains) and no degradation of the bio-functionality during the RAFT polymerization.

Q1 : Yes !
Q2 : Yes !
Q3 : Yes !

New, straightforward approach to prepare bio-functionalized efficient RAFT agents. Application in bio-related fields and others...

Maël Bathfield^{1,2}, Frédéric Delolme³, Catherine Ladavière¹, Franck D'Agosto², Marie-Thérèse Charreyre¹, Thierry Delair¹

franck.dagosto@lcpp.cpe.fr, marie-therese.charreyre@ens-lyon.fr

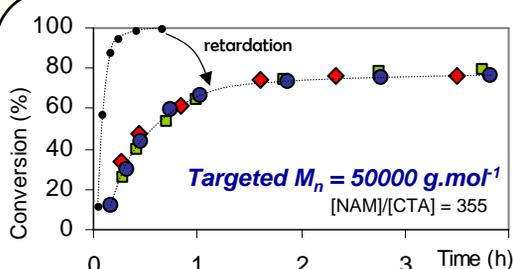
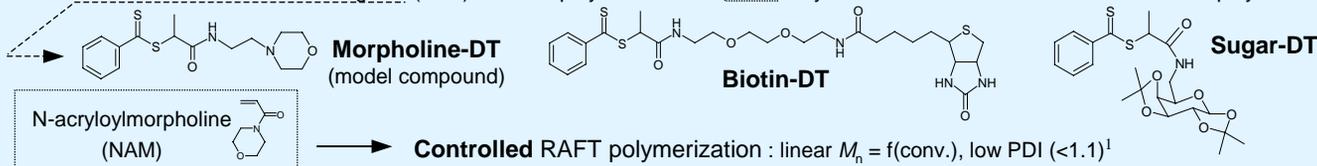
¹ SMPH - CNRS/bioMérieux - UMR 2714 - ENS-Lyon - 46, Allée d'Italie - 69364 Lyon cedex 07 - FRANCE

² LCPP - CNRS/ESCEP - UMR 140 - Bât. 308F - 43, Bd du 11 Novembre 1918 - B.P. 2077 - 69616 Villeurbanne cedex - FRANCE (www.lcpp-cpe.com)

³ Service Central d'Analyses du CNRS - BP22, 69390 Vernaison cedex - FRANCE

Experimental context

Use of bio-functional chain transfer agents (CTA) in RAFT polymerization of [NAM] to synthesize bio-related α -end-functionalized polymers¹.

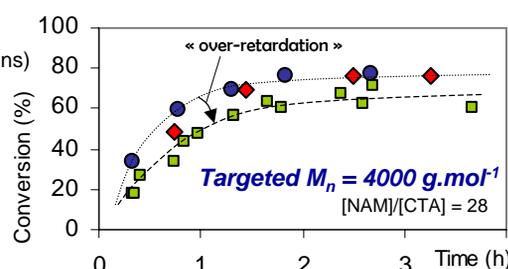


exp. conditions² : dioxane, 90°C, [NAM] = 1.6 mol.L⁻¹, [CTA]/[AIBN] = 10

Main kinetics results

(Retarded³ RAFT polymerizations)

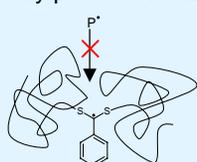
- Morpholine-DT
- ◆ Biotin-DT
- Sugar-DT
- without CTA



Low targeted M_n : why only the polymerization mediated by Morpholine-DT shows additional retardation ?

Hypothesis : possibility (or not) of termination onto intermediate radicals⁴

High targeted M_n
Sterically protected radical⁵



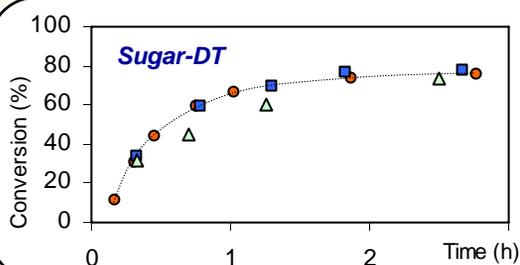
Low targeted M_n (two cases)

Protected radical
(cases of Biotin-DT and Sugar-DT)

Chain-ends are more « hydrophobic » than monomer
 \Rightarrow Preferential conformation

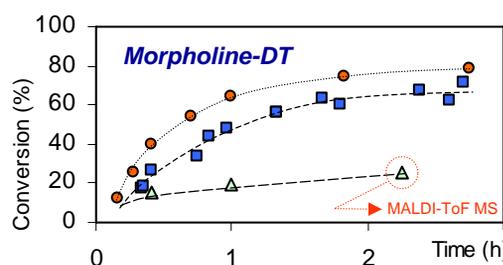
Accessible radical
(case of Morpholine-DT)

Chain-ends are of similar nature than monomer
 \Rightarrow No preferential conformation



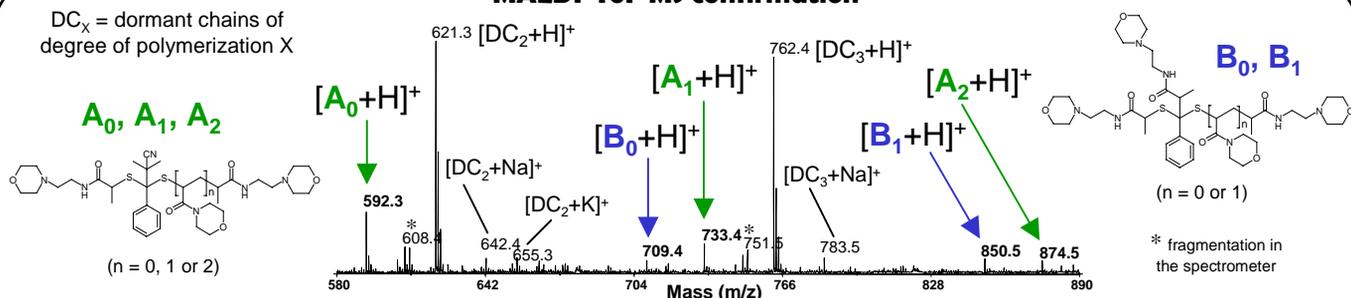
Kinetics confirmation

- Targeted M_n
- 50000 g.mol⁻¹ [NAM]/[CTA] = 355
 - 4000 g.mol⁻¹ [NAM]/[CTA] = 28
 - △ 2000 g.mol⁻¹ [NAM]/[CTA] = 14



MALDI-ToF MS confirmation

DC_x = dormant chains of degree of polymerization X



Exact mass determination for A₀ and A₁ (internal calibration using DC peaks) : relative error < 3 ppm

Termination onto intermediate radicals (cross-termination) seems to be the cause of the « over-retardation » epiphenomenon... ..but does not explain the main retardation phenomenon⁶.

(1) Bathfield, M.; D'Agosto, F.; Spitz, R.; Charreyre, M.-T.; Delair, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2546. (2) Favier, A.; Charreyre, M.-T.; Pichot, C. *Polymer* **2004**, *45*, 8661-8674.
(3) Moad, G.; Chiefari, J.; Chong, Y. K.; Krstina, J.; Mayadunne, R. T. A.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Polym. Int.* **2000**, *49*, 993.
(4a) Monteiro, M. J. *et al. Macromolecules* **2001**, *34*, 349. ; (4b) Fukuda, T. *et al. Macromolecules* **2004**, *37*, 1219. ; (4c) Barner-Kowollik, C. *et al. J Polym Sci Part A: Polym Chem* **2002**, *40*, 1058
(5) Wang, R.; McCormick, C. L.; Lowe, A. B. *Macromolecules* **2005**, *38*, 9518. (6) Come and see me (M. Bathfield)...

VI. Partie expérimentale

VI-1. Réactifs

Le N-Acryloylmorpholine (NAM, vendu par POLYSCIENCES, INC, référence 21192) est distillé avant utilisation en polymérisation.

Le dioxane (solvant) (vendu par SDS, référence 27,053-9) est distillé sur LiAlH_4 avant utilisation.

Le 2,2'-azobis-isobutyronitrile AIBN (amorceur de polymérisation) (Fluka, référence 11630) est recristallisé dans l'éthanol.

Le trioxane (référence interne pour le suivi R.M.N. ^1H) (JANSSEN-CHIMICA, référence 14.029.61) est utilisé tel quel.

La synthèse des agents RAFT est détaillée dans le chapitre 2.

VI-2. Mode opératoire général des polymérisations RAFT

Les différents réactifs sont introduits dans un réacteur de type Schlenk à température ambiante, et le mélange est dégazé par une succession de 5 cycles de congélation/vide/décongélation, puis mis sous azote. Le mélange réactionnel est porté à 90°C et laissé sous agitation pendant 3 à 5h. Le polymère est précipité au moins une fois dans l'éther diéthylique puis séché sous un flux d'air comprimé avant d'être analysé par CES/DDL.

- Suivi cinétique :

Le suivi cinétique de la consommation du monomère est réalisé par R.M.N. ^1H (Résonance Magnétique Nucléaire du proton) sur un spectromètre Bruker AC 200 MHz.

Les échantillons à analyser sont préparés en mélangeant $200\mu\text{L}$ de chaque prélèvement à $400\mu\text{L}$ de solvant deutéré (CDCl_3). Cette méthode présente l'avantage d'analyser le milieu réactionnel sans évaporer le solvant de synthèse et permet donc d'éviter d'éventuelles transformations des produits.

La diminution des pics relatifs aux protons vinyliques du monomère est suivie en fonction du temps par rapport à une référence interne, le trioxane. Le trioxane a la particularité de présenter une résonance sous la forme d'un singulet fin, intense, et isolé des protons vinyliques du monomère NAM.

$$\text{La conversion du monomère est obtenue par : } C_{\text{NAM}} = 1 - \frac{\left(\frac{H_{\text{NAM}}}{H_{\text{trioxane}}} \right)_t}{\left(\frac{H_{\text{NAM}}}{H_{\text{trioxane}}} \right)_0}$$

avec C_{NAM} : conversion en NAM,

H_{NAM} : intégrale relative à un proton du NAM,

H_{trioxane} : intégrale relative aux six protons du trioxane.

Un calcul basé sur l'apparition de la résonance des protons de la chaîne polymère au-delà d'environ 10% de conversion est également possible. Cette méthode a tendance à donner des valeurs légèrement inférieures (de quelques pourcents) à la première méthode mais l'allure cinétique est conservée.

$$C_{NAM} = \frac{1}{1 + \left(\frac{2.H_{NAM}}{H_{polymère}} \right)}$$

avec C_{NAM} : conversion en NAM,
 H_{NAM} : intégrale relative à un proton du NAM,
 $H_{trioxane}$: intégrale relative à deux protons de la chaîne polymère (zone 0,75-2,1 ppm)

VI-3. Techniques de caractérisation des échantillons polymère

a) CES/DDL en phase aqueuse

- Conditions d'analyses par Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES) couplé à un détecteur de diffusion dynamique de la lumière (DDL) :
 - Colonnes : Ultra Hydrogel 500 et 2000 (Waters), température réglée à 35°C.
 - Pompe : Waters 510
 - Détecteur réfractométrique différentiel : Waters 410 [dn/dc (polyNAM) = 0,163]
 - Détecteur Diffusion Dynamique de la Lumière : Trois angles, miniDawn, Wyatt Technology
 - Détecteur UV : Waters 2487, réglé au maximum d'absorption des dithiobenzoate (309 nm).
 - Eluant : tampon borate 0,05 M pH = 9,3 (mélange tampon borate 0,05M/éthanol, 80/20, v/v pour les essais de caractérisation des échantillons polyNAM-lipide)
 - Débit : 0,5 mL.min⁻¹
 - Passage d'un étalon PEG de très faible I_p ($M_{pic} = 22450$ g/mol, $I_p = 1,03$) pour la détermination des volumes inter-détecteurs [dn/dc (PEG) = 0,133 ; détecteur UV réglé à 250 nm]
 - Filtration des échantillons dissous dans l'éluant à environ 5mg/mL sur filtre millipore (PVDF) de 0,22µm.
 - Injection de 200 µL (volume de la boucle d'injection) de solution de polymère.
 - Logiciel d'exploitation des données brutes : ASTRA (Wyatt Technology).

Ces analyses permettent d'accéder aux masses molaires absolues.

- Traitement des données brutes :
 - Les « slice results » du pic sélectionné, calculés par le logiciel ASTRA, sont exportés vers Excel : pour chaque intervalle d'acquisition, on a donc la concentration de polymère C_i en g/mL et la masse M_i correspondante calculée grâce à la DDL.
 - Pour chaque intervalle, on calcule la concentration molaire en chaînes $c_i = C_i/M_i$ (en moles/mL)
 - On calcule également pour chaque intervalle, le nombre de mole de chaînes $n_i = c_i * V_{intervalle}$ ($V_{intervalle} = 0,00417$ mL)
 - La somme des n_i donne le nombre total N_c de moles de chaînes polymère présent dans le pic sélectionné.
 - $c_{i,norm} = c_i/N_c$ donne, pour chaque intervalle, la concentration molaire normalisée à 1 mole totale de chaînes [$\text{Somme}(c_{i,norm}) = 1$]
 - $n_{i,norm} = n_i/N_c$ donne, pour chaque intervalle de masse M_i , la fraction molaire. Ainsi la somme des $n_{i,norm}$ est égale à 1 et permet donc de calculer la fraction molaire cumulée.

b) CES en phase solvant (THF)

La CES en phase solvant a uniquement été utilisée pour tenter de caractériser les échantillons de polyNAM-lipide.

- Conditions d'analyses :

- Colonne : Ultra Styragel HR4E (Waters ; polystyrène réticulé)
- Détecteur réfractométrique différentiel : Waters 410
- Eluant : THF
- Débit : 1 mL.min⁻¹
- Echantillons dissous dans l'éluant à environ 10mg/mL.
- Injection de 20 μ L (volume de la boucle d'injection) de solution de polymère.
- Logiciel d'exploitation des données brutes : Breeze (Waters).
- Calcul basé sur une courbe de calibration réalisée à l'aide d'échantillons polyNAM de faible I_p (synthétisés par polymérisation RAFT en présence de dithiobenzoate de *tert*-butyle (DBtB) et préalablement analysés par CES/DDL).¹

c) Spectrométrie de masse MALDI-ToF

Les spectres de masse – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight (MALDI-ToF) ont été obtenus avec un appareil Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilisant un laser à azote (337 nm) et un potentiel d'accélération de 20kV. 200 acquisitions en mode positif (détection des cations) sont réalisées pour chaque spectre. Les masses mono-isotopiques des espèces sont mesurées en mode réflectron à l'aide d'une calibration externe (mélange de peptides de masse connue, kit Sequazyme). Les échantillons sont déposés sur la plaque d'analyse puis séchés.

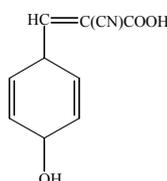
Les masses molaires moyennes sont déterminées par l'exploitation des spectres en mode linéaire :

$$M_n = \text{Somme}(N_i \cdot M_i) / \text{Somme}(N_i) = \text{Somme}(h_i \cdot M_i) / \text{Somme}(h_i)$$

avec N_i le nombre d'espèce de masse M_i , donc proportionnel à h_i , les hauteurs des différents pics.

- Préparation usuelle des dépôts (spectres de la Figure 9, p.136):

- Solution de l'échantillon polymère à 10g/L dans THF fraîchement distillé (distillé la veille des analyses).
- Solution de matrice CHCA (acide α -Cyano-4-Hydroxycinnamique)^{*} à 10g/L dans du THF fraîchement distillé.



Acide α -Cyano-4-Hydroxycinnamique (189,04g/mol)

- Mélange de 45 μ L de la solution de matrice + 5 μ L de la solution de polymère.
- Ajout de 5 μ L de NaI (10g/l dans acétone) dans le mélange.
- Dépôt de 1 μ L de mélange sur la plaque d'analyse, séchage à température ambiante.

^{*} Matrice qui offre la meilleure sensibilité (moins de bruit de fond) et induit moins de fragmentation en comparaison avec la matrice IAA (acide 3- β -indoleacrylique) utilisée précédemment (Thèse A. Favier).

- Echantillon contenant des RI terminés (spectre de la Figure 20, p.156) :
 - Solution de l'échantillon polymère à 10g/L dans du THF fraîchement distillé (la veille des analyses).
 - Solution de matrice dithranol (1,8,9- trihydroxyanthracene) à 10g/L dans du THF fraîchement distillé.
Cette matrice est préférée à la matrice CHCA car elle engendre moins de pics dans la gamme des très faibles masses molaires correspondant à l'échantillon analysé.
 - Mélange de 45 μ L de la solution de matrice + 5 μ L de la solution de polymère.
 - Pas d'ajout de NaI \Rightarrow cationisation prédominante H⁺.
L'ajout de NaI rend moins visibles les pics des RI terminés.
 - Dépôt de 1 μ L de mélange, séchage à température ambiante.

d) Diffusion quasi-élastique de la lumière

Dans le cas des échantillons de polyNAM-lipide, le diamètre hydrodynamique moyen (D_h) des assemblages en milieu aqueux a été déterminé à 25°C par diffusion quasi-élastique de la lumière (Zetasizer 3000 HS, Malvern Instrument, U.K.). L'angle de mesure était de 90°C avec un laser à hélium (633 nm). Les valeurs d'indice de réfraction et de la viscosité du solvant utilisées étaient respectivement 1,33 et 0,8904 cP. Les échantillons ont été dissous dans un tampon NaCl 1M à 5mg/mL. Cinq mesures indépendantes ont été réalisées pour calculer une valeur moyenne de D_h .

Tableau 9 : Correspondance Figures/Tableaux \leftrightarrow Essais/Echantillons

N° de figure ou tableau (T)	Réf. essai(s) ou échantillon(s) correspondant
1	MB10, AF82, MB64
2	MB40, MB53, MB41, MB42
3	MB40-T2 à T6
4	MB40, MB53, MB41, MB42
5	MB40, MB41
T1	MB64-T1 à T7
6	MB40-T2 à T6 et T10, T11
7	MB67, MB63, (---- MB40)
8	MB45-T2
T2	MB43-T3 ; MB51-T2 ; MB45-T1 à T4 ; DD5-T2, T3
9-A et T3, 9-B et T4, 9-C et T5, 9-D et T6	MB43-T3, MB45-T3, MB51-T2, DD5-T2
10	DD5-T2
11	MB40-T7, MB42-T6
12	MB40-T2, T4, T6 ; MB42-T3, T4, T6
13	MB42-T3 à T7
14 et T7	MB42-T3, T4, T6
15-a	MB40-T2, MB39-T5
15-b	MB39-T5, T6 ; MB41-T2, T4
15-c	MB40-T1, T2, T3 ; MB41-T1, T2, T3
16	MB40-T3
17	MB43-T4
18	MB43, MB43-bis, MB52; MB5; MB45; (---- MB40)
19-a	MB40; MB43, MB43-bis, MB52; MB55
19-b	MB41, MB45, MB63
20, 21 et T8	MB55-T3 précipité dans l'éther

Références du chapitre 3

- (1) Favier, A. *Thèse, Université Lyon 1* **2002**.
- (2) Favier, A.; Charreyre, M.-T.; Pichot, C. *Polymer* **2004**, *45*, 8661-8674.
- (3) Favier, A.; Charreyre, M.-T. *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 653–692.
- (4) Drache, M.; Schmidt-Naake, G.; Buback, M.; Vana, P. *Polymer* **2005**, *46*, 8483-8493.
- (5) Perrier, S.; Barner-Kowollik, C.; Quinn, J. F.; Vana, P.; Davis, T. P. *Macromolecules* **2002**, *35*, 8300-8306.
- (6) Lecolley, F.; Tao, L.; Mantovani, G.; Durkin, I.; Lautru, S.; Haddleton, D. M. *Chem. Commun.* **2004**, 2026-2027.
- (7) Sait, D.; Bon, S.; Haddleton, D. *Polymer Preprints* **2005**, *46(2)*, 146-147.
- (8) Chiefari, J.; Jeffery, J.; Mayadunne, R. T. A.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Macromolecules* **1999**, *32*, 7700.
- (9) Sato, E.; Emoto, T.; Zetterlund, P. B.; Yamada, B. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2004**, *205*, 1829-1839.
- (10) Favier, A.; Ladavière, C.; Charreyre, M.-T.; Pichot, C. *Macromolecules* **2004**, *37*, 2026-2034.
- (11) Kato, S.; Ishida, M. *Sulfur Reports* **1988**, *8(4)*, 155-323.
- (12) Destarac, M.; Charmot, D.; Franck, X.; Zard, Z. *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21*, 1035-1039.
- (13) Schilli, C.; Lanzerdörfer, M. G.; Müller, A. H. E. *Macromolecules* **2002**, *35*, 6819-6827.
- (14) Troutier, A.-L.; Delair, T.; Pichot, C.; Ladavière, C. *Langmuir* **2005**, *21*, 1305-1313.
- (15) Thomas, D. B.; Convertine, A. J.; Hester, R. D.; Lowe, A. B.; McCormick, C. L. *Macromolecules* **2003**, *37(5)*, 1735-1741.
- (16) Moad, G.; Chiefari, J.; Chong, Y. K.; Krstina, J.; Mayadunne, R. T. A.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Polym. Int.* **2000**, *49*, 993.
- (17) Barner-Kowollik, C.; Quinn, J. F.; Morsley, D. R.; Davis, T. P. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* **2001**, *39*, 1353.
- (18) Ganachaud, F.; Monteiro, M. J.; Gilbert, R. G.; Dourges, M.-A.; Thang, S. H.; Rizzardo, E. *Macromolecules* **2000**, *33*, 6738.
- (19) Barner-Kowollik, C.; Quinn, J. F.; Nguyen, T. L. U.; Heuts, J. P. A.; Davis, T. P. *Macromolecules* **2001**, *34*, 7849.
- (20) Barner-Kowollik, C.; Coote, M. L.; Davis, T. P.; Radom, L.; Vana, P. *J. Polym. Sci., Part A: Polym.* **2003**, *41*, 2828.
- (21) Coote, M. L.; Radom, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1490-1491.
- (22) Coote, M. L. *Macromolecules* **2004**, *37*, 5023-5031.
- (23) de Brouwer, H.; Schellekens, M. A. J.; Klumperman, B.; Monteiro, M. J.; German, A. L. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2000**, *38*, 3596.

- (24) Monteiro, M. J.; de Brouwer, H. *Macromolecules* **2001**, *34*, 349-352.
- (25) Wang, A. R.; Zhu, S.; Kwak, Y.; Goto, A.; Fukuda, T.; Monteiro, M. J. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2003**, *41*, 2833.
- (26) Kwak, Y.; Goto, A.; Tsujii, Y.; Murata, Y.; Komatsu, K.; Fukuda, T. *Macromolecules* **2002**, *35*, 3026-3029.
- (27) Kwak, Y.; Goto, A.; Fukuda, T. *Macromolecules* **2004**, *37*, 1219-1225.
- (28) Kwak, Y.; Goto, A.; Komatsu, K.; Sugiura, Y.; Fukuda, T. *Macromolecules* **2004**, *37*(12), 4434-4440.
- (29) Venkatesh, R.; Staal, B. B. P.; Klumperman, B.; Monteiro, M. J. *Macromolecules* **2004**, *37*, 7906-7917.
- (30) de Lambert, B.; Charreyre, M.-T.; Chaix, C.; Pichot, C. *Polymer* **2005**, *46*, 623-637.
- (31) Favier, A.; Charreyre, M.-T.; Chaumont, P.; Pichot, C. *Macromolecules* **2002**, *35*, 8271-8280.
- (32) Barner-Kowollik, C.; Vana, P.; Quinn, J. F.; Davis, T. P. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* **2002**, *40*, 1058-1063.
- (33) Buback, M.; Hesse, P.; Junkers, T.; Vana, P. *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 182-187.
- (34) Wang, R.; McCormick, C. L.; Lowe, A. B. *Macromolecules* **2005**, *38*, 9518-9525.

Chapitre 4

Elaboration de structures à base de
(co)polymères α -fonctionnels en vue d'applications
dans le diagnostic biologique et la vectorisation.

Sommaire du chapitre 4

Introduction	168
I. Stabilisation de LipoParticules.	169
I-1. Contexte.....	169
I-2. Synthèse de conjugués polyNAM-lipide de longueur appropriée.....	170
I-3. Stabilisation des LipoParticules	171
I-4. Conclusion.....	172
II. Bio-conjugués précurseurs de sondes de détection super-fluorescentes.	174
II-1. Contexte et structure du bio-conjugué envisagé	174
II-2. Essais de polymérisation préliminaires.....	176
a) <i>Problème de stagnation des masses molaires</i>	176
b) <i>Essais en présence du dithioester-morpholine (MEDBA)</i>	177
II-3. Synthèse de la structure envisagée.....	182
a) <i>Copolymérisation NAM/NAS en présence de BEDBA</i>	182
b) <i>Estimation du taux de fonctionnalisation</i>	184
II-4. Vers la compréhension des polymérisations de type RAFT visant des masses molaires élevées.....	185
II-5. Conclusion.....	188
III. Particules fonctionnalisées à chevelure contrôlée	189
III-1. Introduction.....	189
a) <i>Contexte</i>	189
b) <i>Stratégies envisageables</i>	190
III-2. Stratégie adoptée : la polymérisation en dispersion.....	191
a) <i>Principe de la polymérisation en dispersion</i>	191
b) <i>Stabilisants stériques utilisés dans la littérature</i>	192
III-3. Polymérisation en dispersion en présence de chaînes dormantes.....	193
a) <i>Préliminaires</i>	193
b) <i>Choix des conditions de polymérisation</i>	195
c) <i>Premiers résultats</i>	197
d) <i>Remarques complémentaires</i>	199
e) <i>Influence de la longueur de chaîne polyNAM et hydrolyse compétitive</i>	203
f) <i>Synthèse de particules à chevelure contrôlée et fonctionnalisée en extrémité par un sucre</i>	205
g) <i>Nucléation tardive \Rightarrow Particules monodisperses ?</i>	207
h) <i>Discussion sur une cause possible de la nucléation précoce</i>	210
III-4. Conclusion	213
IV. Conclusion du chapitre 4	214
V. Partie expérimentale	216
V-1. Stabilisation de LipoParticules à l'aide de chaînes polyNAM-lipide.....	216
V-2. Copolymères NAM/NAS de masses molaires élevées.....	216
V-3. Polymérisation en dispersion en présence de chaînes dormantes.....	217
a) <i>Synthèse des chaînes dormantes</i>	217
b) <i>Polymérisations en dispersion</i>	217
Références du chapitre 4	219

Introduction

Le chapitre 3 a montré que la technique de polymérisation RAFT en présence de dithioesters préalablement fonctionnalisés par un ligand biologique permettait d'obtenir directement et de manière quantitative des conjugués ayant une structure parfaitement définie. Ainsi trois types de polymères α -bio-fonctionnels ont été synthétisés : 1- polyNAM-lipide ; 2- polyNAM-biotine ; 3- polyNAM-sucre. Le choix de ces ligands a été directement lié à des applications potentielles.

1- En tant que constituants essentiels des membranes cellulaires, un champ d'application des conjugués lipidiques concerne directement la vectorisation de principes actifs et/ou le transfert de gènes. Dans ce dernier cas, une fusion du vecteur avec la membrane cellulaire est nécessaire à l'entrée du gène dans le cytoplasme de la cellule. Le caractère bio-mimétique des assemblages de lipides nommés liposomes en fait des candidats de choix en tant que vecteurs. Cependant, les propriétés mécaniques et la stabilité colloïdale des liposomes sont faibles. Une solution originale développée dans l'Unité Mixte de Recherche CNRS-bioMérieux pour tenter de pallier ces inconvénients est basée sur l'adsorption de lipides sur des particules de polymère. Les structures ainsi créées, nommées LipoParticules, présentent les caractéristiques mécaniques des particules initiales mais leur stabilité colloïdale reste relativement faible dans des milieux à force ionique élevée tels que les milieux biologiques.

2- La biotine présente des propriétés de reconnaissance spécifique vis-à-vis de la streptavidine et est très largement utilisée dans les tests de diagnostic biologique. Ces derniers comprennent souvent deux étapes : une étape de capture sur support de l'analyte à doser, puis une étape de détection qui permet sa quantification. La première étape permet d'extraire l'analyte de l'échantillon biologique, milieu complexe chargé de sels, de protéines et d'autres contaminants. La sensibilité des tests peut ainsi être améliorée par des perfectionnements apportés à la fois à l'étape de capture et à celle de détection. L'exceptionnelle affinité spécifique entre la biotine et la streptavidine est souvent mise à profit au cours de l'étape de détection afin de fixer, par exemple, une sonde de détection sur l'analyte à doser. La conception de nouvelles sondes de détection biotinylées est donc une voie d'amélioration des tests de diagnostic biologique.

3- Les carbohydrates (sucres) présentent également des propriétés de reconnaissance spécifique envers certaines protéines (par exemple, les lectines). Or, certaines lectines sont présentes à la surface de bactéries pathogènes. L'interaction sucres/lectines peut alors être utilisée dans l'étape de capture de dispositifs de dosage de bactéries. L'efficacité de cette étape de capture est directement liée au nombre et à la disponibilité des sucres exposés sur le support de capture. Ainsi, l'amélioration de l'efficacité des techniques de dosage de bactéries peut passer par la conception de nouvelles structures macromoléculaires présentant de nombreux dérivés carbohydrates disponibles.

Dans ces contextes variés, trois applications de notre stratégie de synthèse de polymères α -bio-fonctionnels sont exposées dans ce chapitre. Elles sont présentées dans l'ordre suivant :

- Application *directe* des conjugués polyNAM-lipide pour la stabilisation stérique de LipoParticules.
- Application du procédé RAFT en présence de dithioester-biotine pour la synthèse de bio-conjugués précurseurs de sondes de détection super-fluorescentes, *via* une *copolymérisation* de type RAFT.
- Mise à profit du caractère vivant des conjugués polyNAM-sucre synthétisés par la technique RAFT pour l'élaboration de particules à chevelure contrôlée et fonctionnalisée, *via* un procédé de *polymérisation en dispersion*.

I. Stabilisation de LipoParticules.

Cette partie a été réalisée en collaboration avec Catherine Ladavière (UMR CNRS-bioMérieux) dans le cadre d'un stage de Master effectué par Delphine Daviot.¹

I-1. Contexte

Dans le cadre de la vectorisation d'une biomolécule d'intérêt (principes actifs, protéines, antigènes, fragments d'ADN, plasmides...) vers une cellule cible, le rôle du vecteur est de protéger la biomolécule pendant son transport, de pénétrer (éventuellement) à l'intérieur de la cellule, puis de libérer la molécule d'intérêt de manière plus ou moins progressive. Les LipoParticules apparaissent comme de bons candidats. Celles-ci sont constituées de particules polymère sur lesquelles sont adsorbés des lipides idéalement organisés sous forme de bi-couches (Schéma 1-a). Les lipides apportent un caractère biomimétique à l'assemblage tandis que l'utilisation de particules appropriées (par ex., biodégradables) pourrait permettre une libération contrôlée de la biomolécule transportée. Cependant, comme les propriétés de ces nouvelles structures sont encore peu connues, une étude fondamentale concernant les interactions lipides/particules a été précédemment effectuée en utilisant des particules de polystyrène comme particules modèles²⁻⁴. A terme, l'utilisation de particules biodégradables^{5,6}, voire de particules biocompatibles conçues pour l'encapsulation de principes actifs^{7,8} peut être envisagée.

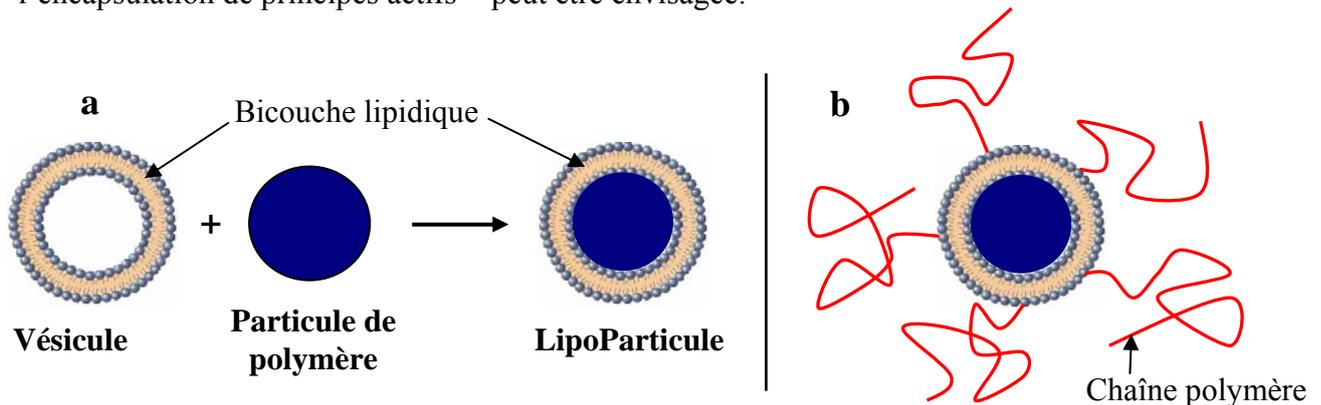


Schéma 1 : Principe d'élaboration d'une LipoParticule (a) et schéma d'une LipoParticule stabilisée stériquement par un polymère amphiphile (b).

En comparaison avec les vésicules initiales (liposomes), les particules apportent une stabilité mécanique accrue, permettent un contrôle de la morphologie et de la distribution des tailles (identique à celle des particules), et facilitent la purification de l'assemblage final.³ Cependant, une problématique, déjà présente avec les liposomes, est la faible stabilité colloïdale des LipoParticules à force ionique élevée. Une stratégie pour pallier cet inconvénient consiste à incorporer dans la formulation lipidique, un lipide modifié par un polymère afin d'améliorer la stabilisation stérique (Schéma 1-b).

Cette stratégie a d'abord été appliquée à la stabilisation de liposomes, *via* l'utilisation, par exemple, de poly(vinylpyrrolidone), de poly(acrylamide)s ou encore de poly(éthylène glycol) (PEG).⁹ Ce dernier se révèle le plus efficace *in vitro* et permet également de prolonger la durée de vie des liposomes *in vivo*.¹⁰ D'autre part, l'influence de la longueur de la chaîne PEG (720, 2000 ou 5000 g/mol) et de sa proportion dans la formulation lipidique (2, 5 ou

10% molaire) a été étudiée¹¹ : la stabilisation des liposomes semble la plus efficace avec les conjugués PEG-lipide de plus fortes masses molaires à partir d'une proportion de 5 % molaire. Très peu d'études n'ont été réalisées à ce jour sur la stabilisation de LipoParticules par des conjugués polymères-lipides.

Une étude comparative de l'efficacité de stabilisation de LipoParticules par des conjugués PEG-lipide (commercial) et polyNAM-lipide semblait intéressante. En lien avec un autre sujet de recherche du laboratoire⁶, cela a constitué le sujet de stage d'une étudiante en Master.¹ Les principaux résultats de ce travail sont résumés ci-dessous.

I-2. Synthèse de conjugués polyNAM-lipide de longueur appropriée

La synthèse de conjugués polyNAM-lipide, utilisés ultérieurement pour les essais de stabilisation de LipoParticules, consiste en l'application directe et sans modification de la stratégie développée au cours de cette thèse :

- synthèse du dithioester-lipide (LEDBA) à partir du précurseur SEDB.
- polymérisation RAFT de la NAM en présence de LEDBA en visant des masses molaires appropriées (selon la longueur des conjugués souhaitée).

A l'occasion de cette nouvelle synthèse de LEDBA, une tentative d'optimisation de l'étape d'extraction a été effectuée à l'aide de solutions salines (NaCl) à la place de l'eau distillée : la tendance de la LEDBA à former une phase émulsion (eau dans chloroforme, cf. chapitre 2, p.92) est effectivement réduite mais n'est pas totalement écartée. De plus, une étape d'ajout d'acétone dans la phase organique, puis de filtration, est alors nécessaire pour éviter la présence de sel en quantité relativement importante dans le produit final. Après purification par chromatographie sur silice, le rendement final de synthèse de la LEDBA a été de 71%, soit 2% de plus que la synthèse précédemment décrite.

Le conjugué commercial PEG-lipide présente un degré de polymérisation moyen (DP_n) de 113. Pour l'étude comparative, un conjugué polyNAM-lipide de longueur similaire a été envisagé. De plus, pour apprécier l'effet de la longueur de chaîne sur la stabilisation des LipoParticules, un conjugué de DP_n égal à 48 a également été visé. D'après l'allure cinétique de la polymérisation de référence (cf. chapitre 3, Figure 2, p.122), l'arrêt de la polymérisation de la NAM après 2h (75% de conversion) dans des essais visant respectivement les masses molaires de 21250 g/mol et 8450 g/mol devait permettre d'obtenir les conjugués souhaités.

La première polymérisation a effectivement permis l'obtention d'un conjugué de DP_n théorique égal à 109. De manière inattendue, la seconde polymérisation a présenté une période d'induction légèrement plus longue que la polymérisation de référence (environ 10 min de plus) : le prélèvement principal effectué à 47% de conversion correspond à un DP_n théorique égal à 28.

Les tentatives d'amélioration de la caractérisation des polyNAM-lipide par CES/DDI en phase aqueuse (cf. chapitre 3, p.142) se sont révélées infructueuses. Le caractère contrôlé des conjugués de plus faibles masses molaires a été vérifié par spectrométrie de masse MALDI-ToF (cf. résultats au chapitre 3, tableau 2, p.134). Ainsi, les valeurs des degrés de polymérisation moyens théoriques ont été jugées représentatives des échantillons.

I-3. Stabilisation des LipoParticules

Les LipoParticules sont préparées dans de l'eau distillée avant d'être mises dans une solution saline de **0,15 mol/L** en NaCl. Cette concentration correspond à une force ionique équivalente à celle des liquides physiologiques.

La stabilité des LipoParticules a été étudiée en suivant, entre autres, l'évolution au cours du temps du diamètre hydrodynamique moyen (D_z) mesuré par diffusion quasi-élastique de la lumière. Le diamètre moyen initial est d'environ 340 nm, soit 30 nm de plus que celui des particules commerciales de polystyrène constituant le cœur des LipoParticules³.

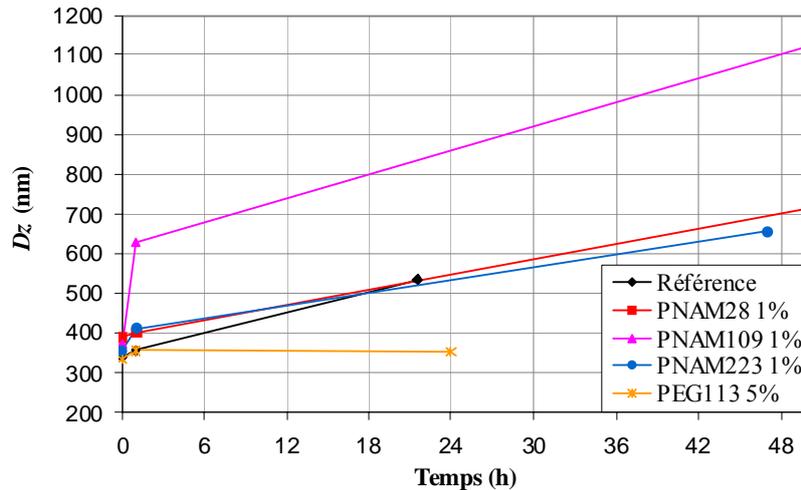


Figure 1 : Evolution du diamètre hydrodynamique moyen (D_z) des LipoParticules au cours du temps selon la longueur de la chaîne polymère-lipide (en solution saline de **0,15 mol/L** en NaCl). [Référence = LipoParticules sans polymère-lipide ; légende : X-Nbr x% = nature du polymère- DP_n Pourcentage molaire dans la formulation lipidique]

Quelle que soit leur longueur, les conjugués polyNAM-lipide utilisés ne semblent pas apporter de stabilisation stérique aux LipoParticules (Figure 1). De plus, leur utilisation en proportion de plus en plus importante dans la formulation lipidique semble favoriser l'agrégation des LipoParticules (Figure 2). L'efficacité connue des PEG-lipide pour la stabilisation des liposomes se confirme également ici pour les LipoParticules.

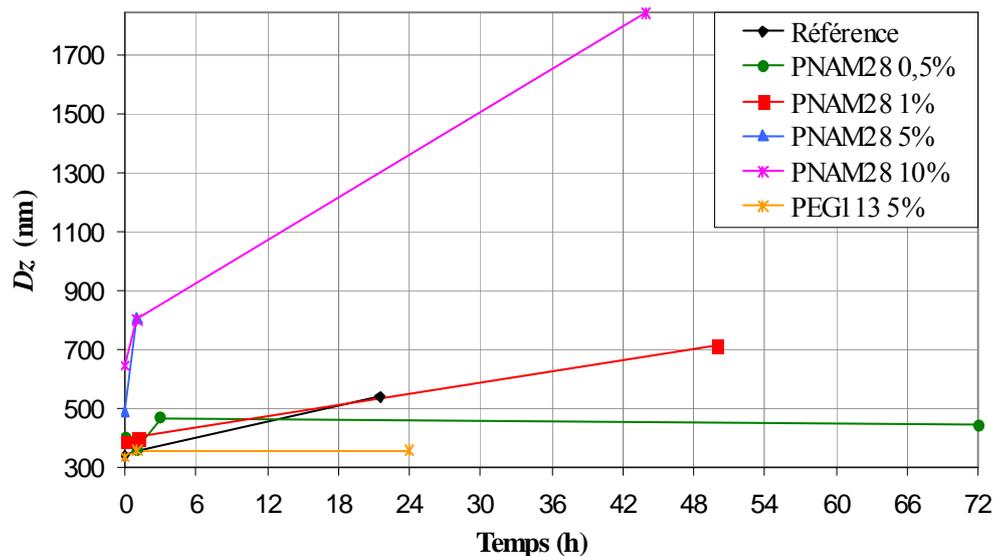


Figure 2 : Evolution du diamètre hydrodynamique moyen (D_z) des LipoParticules au cours du temps selon la proportion de lipides-polymères dans la formulation lipidique (en solution saline de **0,15 mol/L** en NaCl).

A l'inverse de ces résultats ci-dessus, le comportement des chaînes polyNAM est bien différent lorsque la force ionique est plus élevée (**0,30 mol/L** en NaCl). En effet, dans ce cas, presque toutes les formulations lipidiques testées (de 0,5% à 10% de polyNAM-lipide de DP 28 ou 109) limitent l'agrégation des Lipoparticules en comparaison avec l'essai de référence (sans polyNAM-lipide) (Figure 3). **En particulier, la formulation contenant 1% de polyNAM-lipide de DP 109 semble apporter une stabilisation similaire à celle des chaînes PEG (DP 113 ; 5%).**

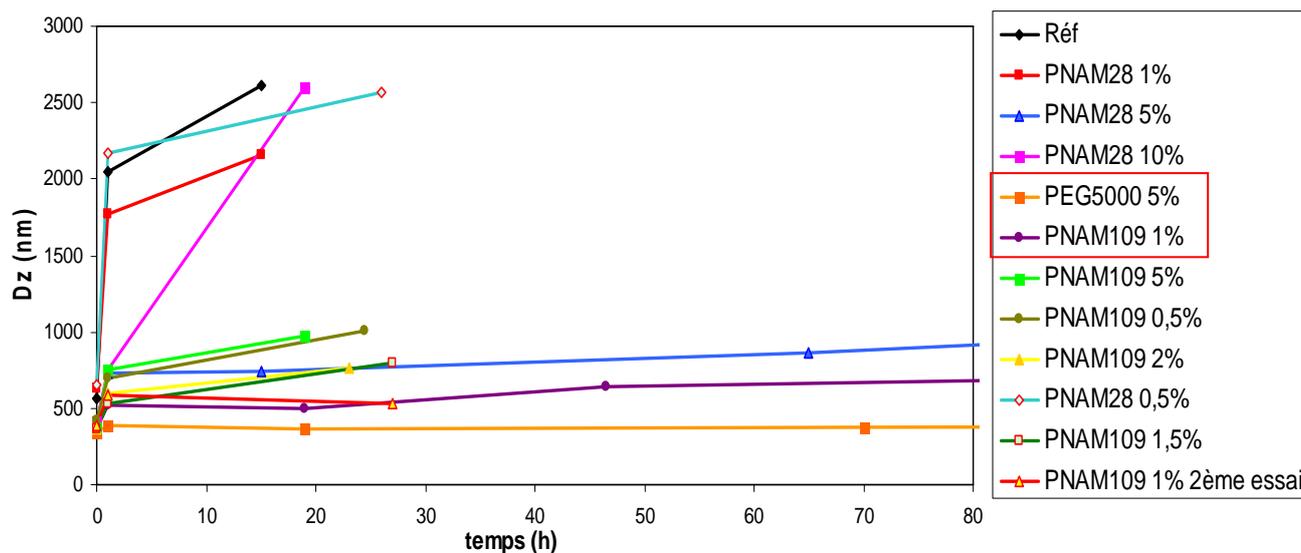


Figure 3 : Evolution du diamètre hydrodynamique moyen (D_z) des Lipoparticules au cours du temps pour diverses formulations lipidiques (en solution saline de **0,30 mol/L** en NaCl).

I-4. Conclusion

L'application directe de la stratégie de synthèse de bio-conjugués développée dans les chapitres précédents a permis de synthétiser aisément des conjugués polyNAM-lipide *a priori* capables d'apporter une stabilisation stérique à des Lipoparticules.

En forte concentration en sel (0,30 mol/L en NaCl), ces conjugués polyNAM-lipide apportent effectivement une stabilisation stérique aux Lipoparticules (similaire à celle présentée par un PEG-lipide).

Cependant, à 0,15 mol/L en NaCl, contrairement au comportement souhaité, les conjugués polyNAM-lipide semblent favoriser l'agrégation des Lipoparticules. Il faut toutefois noter que des problèmes de reproductibilité ne rendent pas très fiable les tendances observées pour l'influence de la longueur de la chaîne polyNAM et de la proportion en polyNAM-lipide. Un nombre plus conséquent d'essais serait à réaliser pour s'affranchir de ces problèmes.

La présence d'un groupe dithiobenzoate en extrémité ω des conjugués polyNAM-lipide est peut-être la cause de leur comportement inattendu (à 0,15 mol/L en NaCl):

- a) L'extrémité dithiobenzoate hydrophobe peut éventuellement interagir avec la bicouche lipidique, ce qui réduirait le déploiement de la chaîne polyNAM par formation de boucle (Schéma 2-a). Cependant, cela diminuerait au pire la capacité de stabilisation stérique mais sans pour autant favoriser l'agrégation.
- b) Un phénomène de pontage interparticulaire (*via* une liaison entre les chaînes) pourrait par contre expliquer une agrégation plus rapide des LipoParticules présentant une chevelure polyNAM par comparaison aux LipoParticules nues (référence). L'hydrolyse des fonctions dithioester étant très probable en milieu aqueux, de nombreuses chaînes polyNAM porteraient une fonction thiol (-SH) terminale. Or, de telles chaînes pourraient créer des ponts disulfure (S-S) (Schéma 2-b). Cette hypothèse est confortée par l'agrégation plus rapide avec l'augmentation de la proportion de polymère-lipide dans la formulation lipidique (Figure 2). L'augmentation de la force ionique pourrait peut-être défavoriser la formation de pont disulfure, ce qui expliquerait le comportement différent des chaînes polyNAM-lipide dans la solution saline à 0,30 mol/L en NaCl.

L'élimination de la fonction dithioester avant utilisation des conjugués pourrait être envisagée. De nombreuses méthodes permettent cela,¹² mais seul la thermolyse, ou bien un procédé radicalaire développé par Perrier *et al.*¹³, ne conduisent pas à la formation de fonction thiol. Il serait très intéressant d'appliquer une de ces méthodes et de refaire la même étude de stabilisation des LipoParticules.

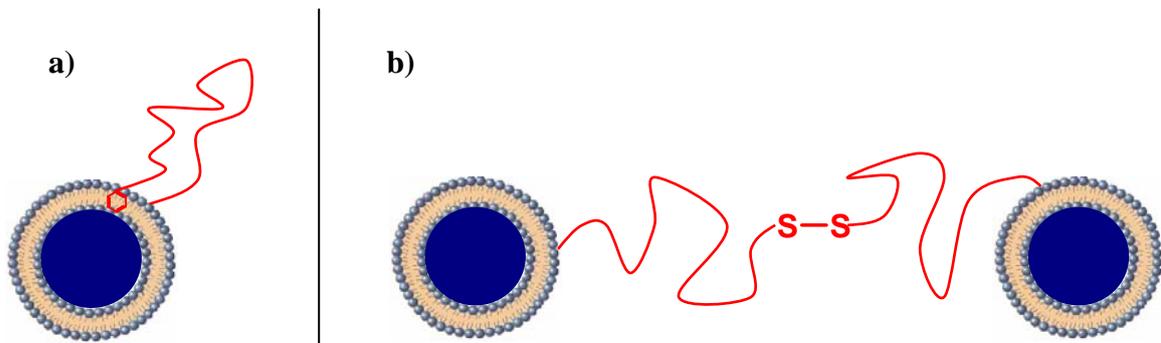


Schéma 2 : Représentation schématique de la formation de boucle (a) et de la formation de pont disulfure interparticulaire (b).

II. Bio-conjugués précurseurs de sondes de détection super-fluorescentes.

II-1. Contexte et structure du bio-conjugué envisagé

Parmi les différentes biomolécules qui peuvent être dosées de façon spécifique (protéines, anticorps, ADN, ARN...), la détection du matériel génétique (ADN) de l'agent pathogène est une voie couramment utilisée dans les tests diagnostiques.

La détection de fragments d'ADN simples brins (acides nucléiques) présents dans un échantillon à analyser repose sur les propriétés d'appariement spécifique des bases nucléiques. Les tests diagnostiques sont donc basés sur la reconnaissance moléculaire d'une cible d'ADN (fragment mono-brin de l'ADN du virus ou de la bactérie à détecter) par une sonde (séquence nucléique complémentaire oligodésoxyribonucléique ou oligonucléotide (ODN, fragment court d'une vingtaine de bases nucléiques)).

Ceci constitue la base du test ELOSA (Enzyme Linked OligoSorbent Assay) qui se déroule en deux étapes (Schéma 3) :

- Une étape de capture de la cible d'ADN par hybridation avec un ODN de capture (ou sonde), immobilisé au préalable sur un support solide.
- Une étape de détection de la cible d'ADN capturée, par hybridation avec un ODN de détection (ou sonde), marqué par une enzyme ou un fluorophore, permet une quantification de la cible d'ADN dans l'échantillon.

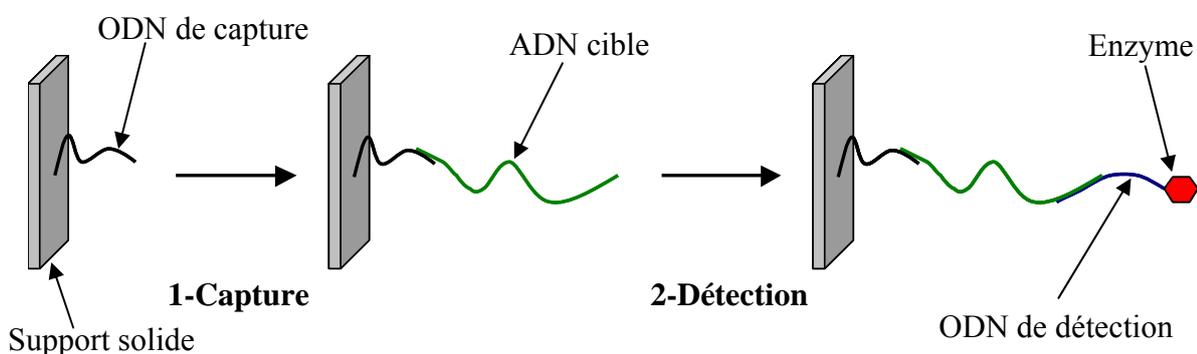


Schéma 3 : Principe d'un test de diagnostic de type ELOSA.

La sensibilité de ces tests est un paramètre clé ; son amélioration pourrait permettre un diagnostic plus précoce, à partir d'un échantillon moins concentré. Elle dépend à la fois des caractéristiques du support de capture (sensibilité, spécificité) et de la sensibilité de l'étape de détection.

- L'optimisation de l'étape de capture *via* la synthèse de nouveaux supports présentant une architecture macromoléculaire optimisée a été le sujet d'une thèse précédente.¹⁴
- L'optimisation de l'étape de détection envisagée ici, se place dans le cadre de l'utilisation d'un ODN de détection biotinylé sur lequel une streptavidine est ensuite fixée (Schéma 4). A partir de cette streptavidine (qui présente quatre sites de reconnaissance), diverses techniques de détection sont possibles. Par exemple, une enzyme biotinylée ou un fluorophore biotinylé sont classiquement utilisés.

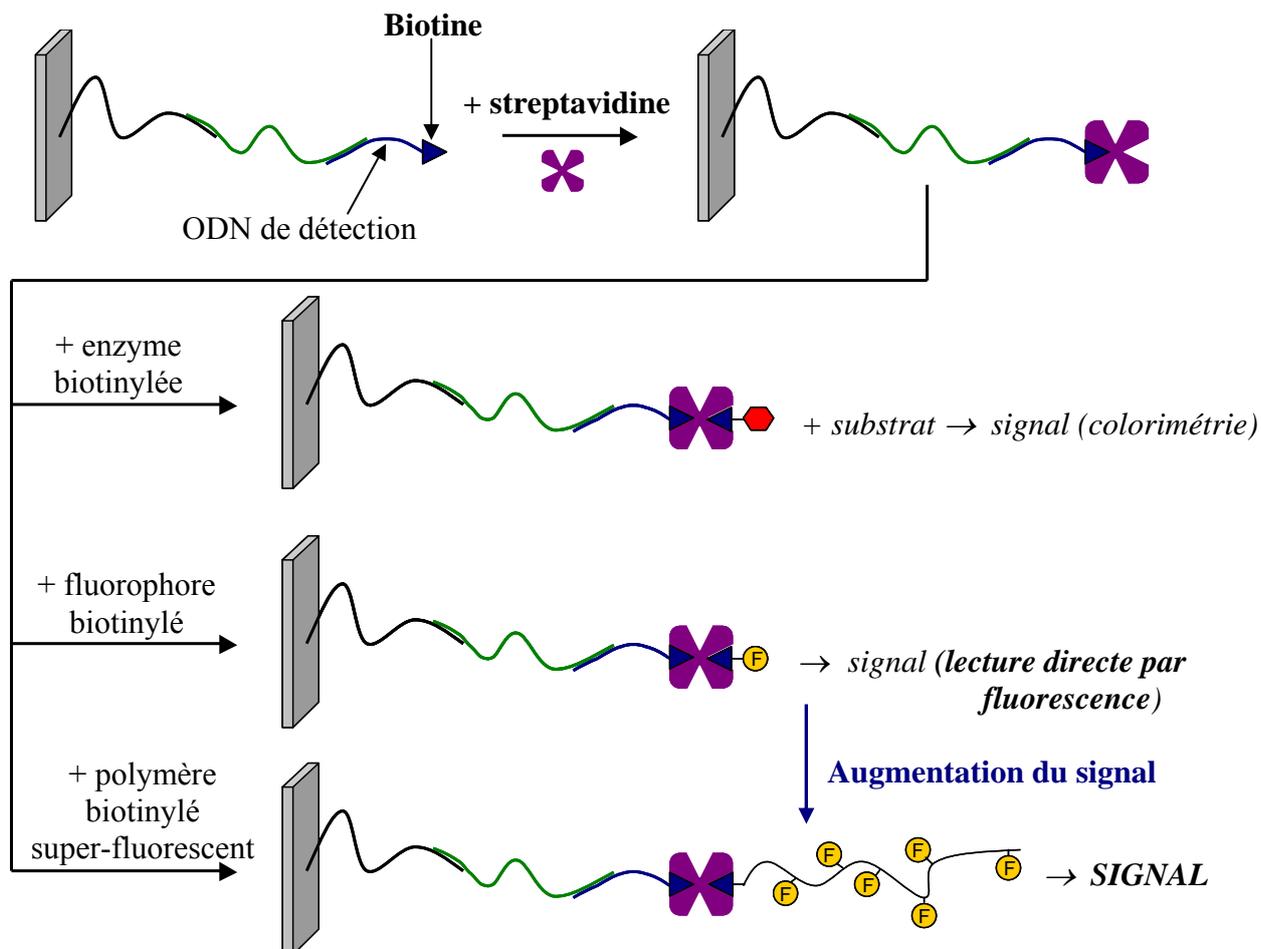


Schéma 4 : Différents types de détection possibles lors d'un test ELOSA.

L'utilisation d'un polymère « super-fluorescent » c'est-à-dire constitué de chaînes portant un grand nombre de fluorophores appropriés* devrait permettre une augmentation significative du signal de détection et donc une amélioration de la sensibilité du test. Ce polymère doit être très hydrophile afin d'être soluble dans le milieu aqueux du test et doit présenter une biotine à l'une des ses extrémités.

La copolymérisation de type RAFT d'un dérivé de l'acrylamide (*N,N*-diméthylacrylamide) avec le *N*-acryloxysuccinimide (NAS) s'est déjà montrée efficace pour l'obtention d'un copolymère précurseur de longueur contrôlée.¹⁵ Dans notre cas, le couple NAM/NAS est utilisé ; il apporte à la fois l'hydrophilie demandée (motif NAM) et des fonctions très réactives (motifs NAS) requises pour la fixation de fluorophores aminés sur les chaînes poly(NAM-*co*-NAS). L'introduction de la biotine à l'extrémité de chaînes synthétisées par le procédé RAFT peut être réalisée par fonctionnalisation post-polymérisation : hydrolyse ou aminolyse des fonctions dithioester terminales, puis réaction des fonctions thiol (-SH) résultantes avec une biotine-maléimide. Cependant, cette voie de fonctionnalisation ne conduit à des taux de fonctionnalisation élevés qu'avec des chaînes de faibles masses molaires et/ou en présence d'un grand excès du dérivé maléimide (cf. chapitre 1). Or, pour la fixation d'un grand nombre de fluorophores par chaîne, des masses molaires élevées sont souhaitées ; quant à l'utilisation d'un excès de dérivé maléimide, cette solution n'est pas envisageable dans le cas de la biotine pour des raisons de coût.

* Fluorophore qui présente relativement peu d'auto-extinction de fluorescence (« self-quenching »).

Ainsi, des travaux ultérieurs ont montré que le rendement de couplage est limité à environ 15% lors de la réaction d'un équivalent de biotine-maléimide sur un copolymère poly(NAM-co-NAS)-SH de masse molaire moyenne en nombre de 56000 g/mol. Par ailleurs, après couplage de fluorophores aminés sur une partie des motifs NAS, l'augmentation de fluorescence (en comparaison à un fluorophore seul) était prometteuse.¹⁶

L'utilisation du dithioester-biotine préalablement synthétisé (cf. chapitre 2, p.89) permet de s'affranchir du problème d'un taux de fonctionnalisation faible (cf. chapitre 3) sans aucune limitation, *a priori*, sur la masse molaire du conjugué souhaité. Afin de fixer un très grand nombre de fluorophores, des chaînes de poly(NAM-co-NAS) portant une biotine en extrémité α et présentant une masse molaire moyenne en nombre d'au moins 150000 g/mol ont été envisagées (Schéma 5).

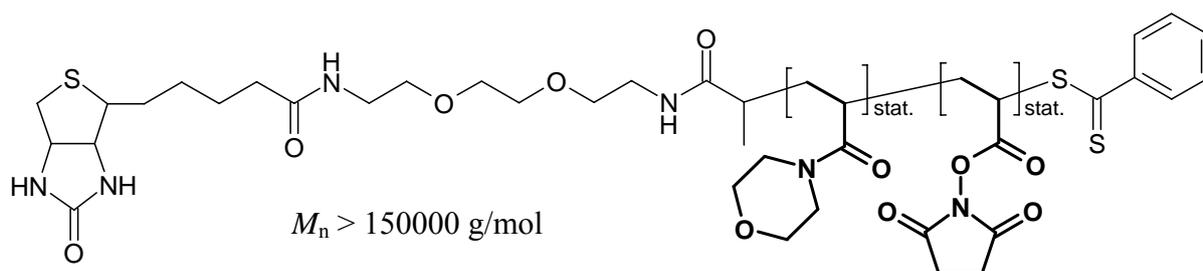


Schéma 5 : Structure des chaînes du copolymère précurseur envisagées.

La synthèse d'une telle structure constitue l'objectif final de cette partie de ce chapitre 4. Pour l'atteindre, la démarche suivie s'est appuyée sur l'expérience acquise au laboratoire concernant la polymérisation de type RAFT dans le cas de masses molaires élevées.

II-2. Essais de polymérisation préliminaires

a) Problème de stagnation des masses molaires

Aux cours de travaux précédents, un phénomène de stagnation des M_n a clairement été mis en évidence lors des polymérisations RAFT de la NAM visant des masses molaires supérieures à 100.000 g/mol^{16,17}. Il se traduit par une déviation des valeurs des M_n par rapport à la droite théorique à partir d'une certaine conversion (~40-50%). Parallèlement, les valeurs des indices de polymolécularité I_p augmentent considérablement (cf. exemple Figure 4). Cela indique clairement l'apparition de nouvelles chaînes dans le milieu de polymérisation.

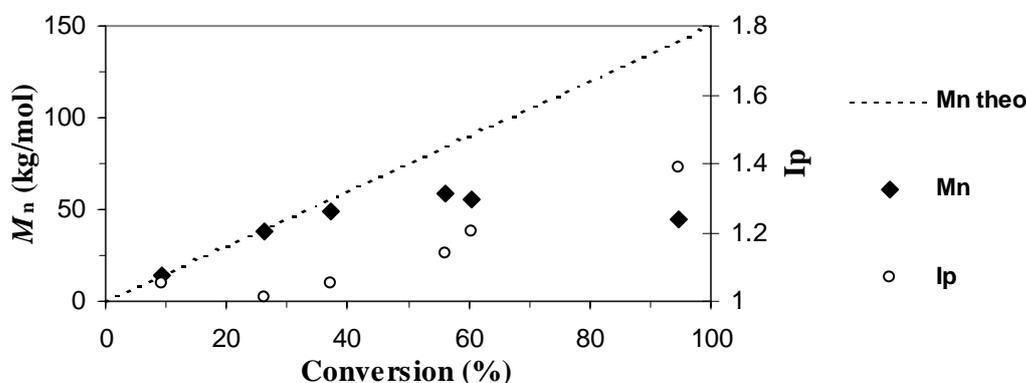
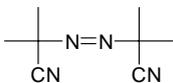
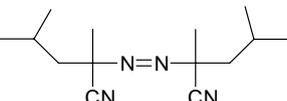


Figure 4 : Evolution des masses molaires moyennes en nombre et de l'indice de polymolécularité en fonction de la conversion pour l'essai **PR7**.

($T^\circ = 90^\circ\text{C}$; $[\text{NAM}] = 1,6 \text{ mol/L}$; $\text{ATC} = \text{DBtB}$; $[\text{ATC}]/[\text{AIBN}] = 10$; $M_n \text{ visée} = 150000 \text{ g/mol}$)¹⁶

Ce phénomène semble similaire à celui déjà décrit dans le chapitre 3 (cas de polymérisations visant une valeur de M_n égale à 50000 g/mol) : formation de chaînes de faibles masses molaires en fin de polymérisation (conversion > 75%). Il a été proposé que ce phénomène ait pour origine une fragmentation des chaînes (*via* réaction de transfert au polymère suivie d'une β -scission) qui se produit lorsque le milieu est appauvri en monomère. Cependant, dans le cas des polymérisations visant des masses molaires élevées, il est beaucoup plus précoce (en conversion) et perturbe considérablement le contrôle de la polymérisation. Toujours dans ce cas, l'hypothèse de fragmentation des chaînes avait déjà été proposée par Arnaud Favier.¹⁷ Au vue des résultats du chapitre 3, il est logique d'attribuer la même origine à des phénomènes apparemment identiques. De plus, les conditions expérimentales qui limitent le phénomène de stagnation des M_n ¹⁷ sont en parfait accord avec cette hypothèse : augmentation de la concentration en monomère (1,6 \rightarrow 3,75 mol/L, d'où un appauvrissement du milieu en monomère seulement à plus forte conversion), diminution de la température de polymérisation (90 \rightarrow 60°C, d'où une diminution de la probabilité de fragmentation des chaînes). Pour compenser, en partie, cette diminution de la température vis-à-vis du flux (initial) de radicaux primaires, l'utilisation d'un amorceur présentant un temps de demie-vie plus court que l'AIBN a été utilisé¹⁷ : V65 (2,2'-Azobis(2,4-diméthylvaléronitrile)) (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des amorceurs utilisés (décomposition dans le toluène)

amorceur	structure	Temp. de demie vie égale à 10h*	A $\times 10^{-14}$ (s ⁻¹) ¹⁸	E _A ¹⁸ (kJ/mol)	k _d à 60°C $\times 10^5$ (s ⁻¹)	k _d à 90°C $\times 10^5$ (s ⁻¹)
AIBN		65°C	15,8	128,9	0,95	44,6
V65		51°C	6,98	121	7,3	270

* : données commerciales WAKO ; $k_d = A \cdot \exp(-E_A/RT)$

Remarque : ce phénomène de stagnation des M_n a également été observé lors de la polymérisation RAFT de l'acrylamide de *N*-tertiobutyle (TBAm, dérivé hydrophobe de l'acrylamide) et cela même pour des polymérisations visant une valeur de M_n égale à 50000 g/mol à 100% de conversion. Il est encore plus marqué (début de la stagnation à une conversion plus faible, ~40%) pour les polymérisations visant une masse deux fois plus élevée.¹⁹

***b*) Essais en présence du dithioester-morpholine (MEDBA)**

Etant donnée l'augmentation des valeurs des I_p concomitante à la stagnation des M_n , la synthèse d'un polymère de haute masse molaire (tel que celui envisagé) et présentant une distribution des masses molaires étroite (I_p le plus faible possible) ne semble possible qu'en stoppant la polymérisation à conversion modérée. Ainsi, il a été décidé de viser une masse molaire de 500000 g/mol à 100% de conversion afin de pouvoir obtenir le polymère recherché ($M_n > 150000$ g/mol) dès 30% de conversion.

Parmi l'ensemble des essais réalisés par A. Favier¹⁷, un essai d'homopolymérisation de la NAM visant une telle masse et réalisé dans les conditions qui limitent le phénomène de stagnation des M_n avait été réalisé (essai AF137, Figure 5) : la croissance des M_n est linéaire jusqu'à environ 80% de conversion et semble rester proche de la droite théorique jusqu'à

environ 50% de conversion avec des valeurs de I_p faibles (<1,3). Cet essai a servi d'essai de référence à partir duquel trois paramètres ont été modifiés afin d'obtenir la structure envisagée :

- nature de l'ATC (DBtB → BEDBA).
- rapport [ATC]/[V65] (3,3 → 10). Ce changement permet d'augmenter le pourcentage (théorique) de chaînes amorcées par le fragment radical issu du dithioester (77% → 91% min.) et ainsi d'optimiser le taux de fonctionnalisation (biotine) des chaînes.
- nature du monomère (NAM → NAM/NAS).

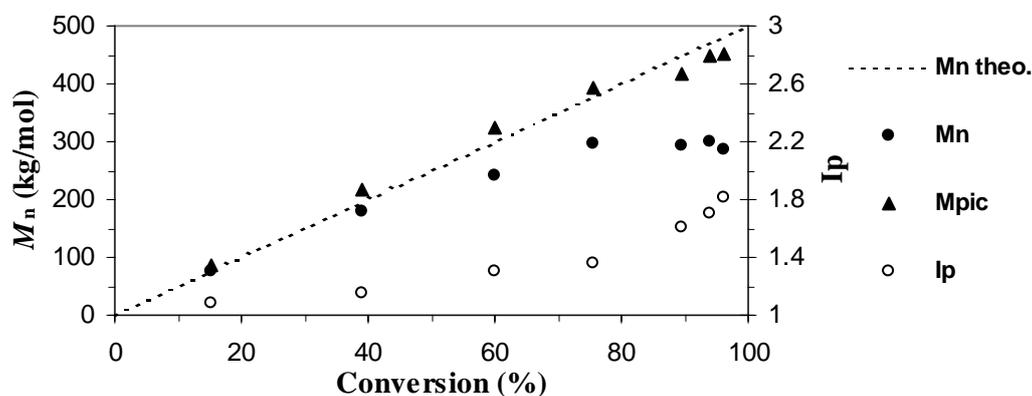


Figure 5 : Evolution des masses molaires moyennes en nombre, des masses au pic et de l'indice de polymolécularité en fonction de la conversion pour l'essai de référence (AF137) [cond. cf. Tableau 2].

Remarque : masse au pic, M_{pic} = masse molaire de la population majoritaire en poids = masse molaire correspondant au sommet des chromatogrammes (Signal réfractométrique en fonction du volume d'élution). Lorsque le phénomène de stagnation (diminution) des M_n n'est pas trop marqué, la masse au pic continue sa croissance linéaire avec la conversion. Cela indique que les nouvelles chaînes formées ont une masse molaire inférieure à cette masse au pic.

La démarche empirique a consisté à modifier ces trois paramètres un par un et à contrôler l'évolution des M_n et I_p avec la conversion après chaque changement (Tableau 2). Etant donné que le dithioester-biotine (BEDBA) se comporte de la même manière que le dithioester-morpholine (MEDBA) en polymérisation RAFT de la NAM (cf. chap.3, p.122), ce dernier a été utilisé dans un premier temps pour des raisons de coût.

Tableau 2 : Conditions des polymérisations RAFT dans le cas de masses molaires élevées.

Conditions de polymérisation				Résultats	
essai	ATC	[ATC]/[V65]	Monomère	cinétique [§]	« contrôle » [£]
AF137	DBtB	3,3	NAM	Référence	Référence
M1	MEDBA			Identique	Identique
M2		Plus lent	Identique		
M3		10	NAM/NAS 60/40	Plus rapide !	Catastrophique
B1 B2	BEDBA		NAM/NAS 80/20	Plus lent	~ Identique

[§] : vitesse de polymérisation par rapport à celle de l'essai de référence AF137

[£] : « contrôle » = évolution des M_n avec la conversion et valeur des I_p , par comparaison avec l'essai de référence.

Conditions communes : [Monomère] = 3,75 mol.L⁻¹ ; température = 60°C ;
 Amorceur = V65 (2,2'-Azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) ;
 Masse visée à 100% de conversion = 500.000 g.mol⁻¹.

Ni le changement d'agent RAFT (AF137 \rightarrow M1), ni l'augmentation du rapport [ATC]/[V65] (M1 \rightarrow M2) ne provoque de surprise, que ce soit au niveau des cinétiques de polymérisation ou de l'évolution de la distribution des masses molaires : cette dernière est quasiment identique pour les trois essais (Figure 7 et Figure 8) ; les cinétiques de AF137 et M1 sont similaires et logiquement, en utilisant trois fois moins d'amorceur pour une quantité d'ATC constante (essai M2), la vitesse de polymérisation est plus lente (Figure 6).

En revanche, les résultats de l'essai M3 ont été surprenants. Il s'agit d'un essai de copolymérisation RAFT de la NAM avec le NAS dans un rapport molaire 60/40. Ce rapport correspond à la composition azéotrope en copolymérisation conventionnelle²⁰ et en copolymérisation de type RAFT²¹. En effet, les conversions partielles en chacun des monomères sont bien systématiquement égales (pas de dérive de composition : le copolymère formé est donc un copolymère parfaitement statistique). Cependant, la vitesse de copolymérisation (M3) est bien plus rapide que la vitesse d'homopolymérisation de la NAM (M2) dans des conditions expérimentales équivalentes (et même plus rapide que l'homopolymérisation amorcée à l'aide de trois fois plus d'amorceur (M1)) (Figure 6).

A partir des pentes des graphes $\ln([M]_0/[M]) = f(\text{temps})$ de chacun des deux comonomères, une estimation de la concentration en radicaux propageants (cf. annexe 7, p.243) semble indiquer que les radicaux propageants sont plus nombreux au cours de la copolymérisation qu'au cours de l'homopolymérisation. Les conditions d'amorçage étant identiques (mêmes flux de radicaux primaires), cela impliquerait une réduction du nombre d'événements de terminaison dans le cas de la copolymérisation. Cela semble cohérent avec l'augmentation de la viscosité du milieu induite par la présence du NAS*. Cependant, une telle accélération de la copolymérisation RAFT n'avait encore jamais été observée au laboratoire.

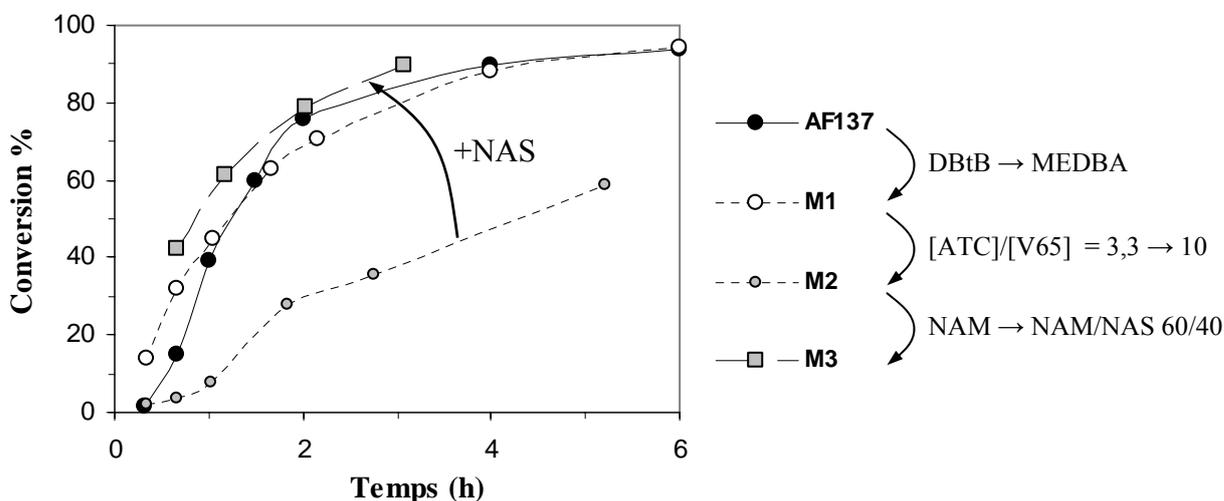


Figure 6 : Cinétiques comparées des essais AF137, M1, M2 et M3

* Non seulement le NAS est un monomère solide tandis que la NAM est liquide, mais le copolymère poly(NAM-co-NAS) est sans doute moins soluble dans le mélange (dioxane+comonomères) que ne l'est le polyNAM dans le mélange (dioxane+NAM).

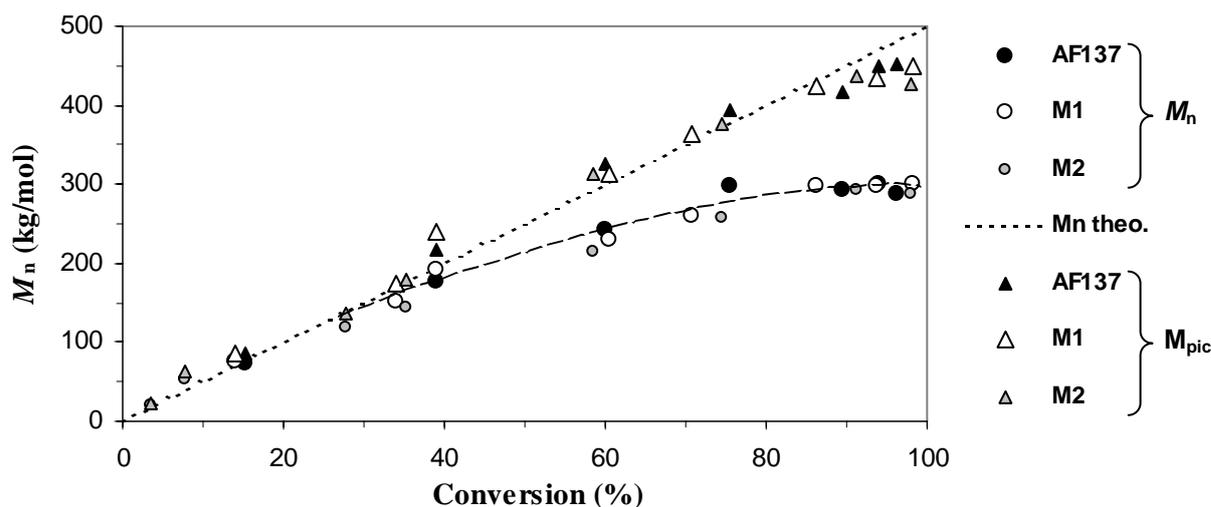


Figure 7 : Evolution des masses molaires moyennes en nombre et des masses au pic en fonction de la conversion pour les essais AF137, M1 et M2.

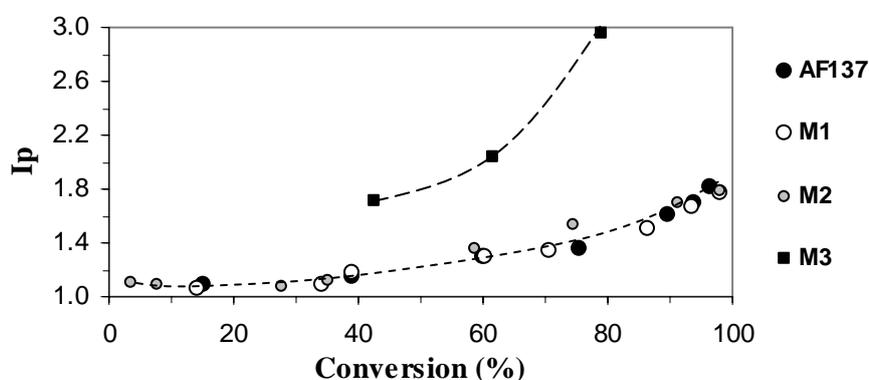


Figure 8 : Evolution des indices de polymolécularité en fonction de la conversion pour les essais AF137, M1, M2 et M3.

Malgré la réduction apparente des événements de terminaison, le contrôle de la copolymérisation M3 est catastrophique (Figure 8 et Figure 9) : même si les valeurs de M_n des deux premiers prélèvements (42 et 62% de conversion) sont proches des valeurs théoriques, les I_p correspondants sont déjà excessivement élevés (1,7 et 2) ! Pire encore, à 80%, la valeur de M_n s'effondre tandis que la valeur de l' I_p continue sa progression exponentielle (3)!

Le phénomène de stagnation des masses molaires semble donc être visible un peu plus tardivement (en conversion, par rapport à M2) mais il est ensuite beaucoup plus prononcé, à tel point que non seulement la valeur de M_n diminue très fortement mais la valeur de M_{pic} stagne. Cette importante formation de chaînes de faibles masses molaires (*via* le phénomène de fragmentation des chaînes) peut être attribué à la nature du NAS. En effet, il s'agit d'un dérivé acrylate, famille de monomères pour laquelle le phénomène de transfert au polymère suivi d'une fragmentation des chaînes est connu²². En fait, le NAS apparaît plus sensible à ce phénomène que les dérivés d'acrylamide. Cependant, même si les réactions de transfert au polymère peuvent être fréquentes dès 60°C²², le phénomène de fragmentation des chaînes consécutif à ce transfert est généralement observé pour des températures de polymérisation supérieures à 80°C. Ainsi, dans notre cas, la probabilité de fragmentation après transfert serait plutôt faible. Seule une très forte activité de transfert pourrait alors compenser cette faible probabilité de fragmentation et expliquer la formation importante de nouvelles chaînes (cf. §II-4, p.185).

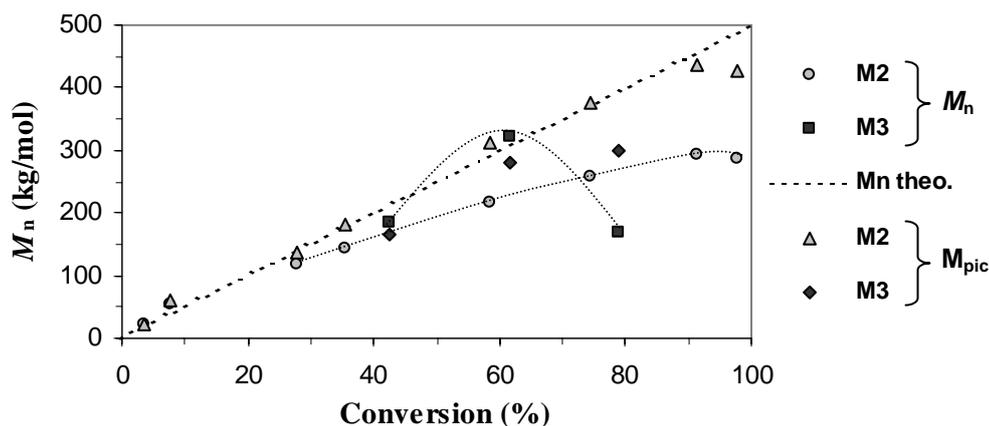


Figure 9 : Evolution des masses molaires moyennes en nombre et des masses au pic en fonction de la conversion pour les essais M2 et M3.

Remarque : le quatrième point de la cinétique de l'essai M3 ne figure pas sur la Figure 9 (ni sur la Figure 8) car l'échantillon correspondant n'a pu être analysé par CES/DDL (impossibilité de le filtrer).

Tout comme dans le chapitre 3, l'hypothèse de formation de nouvelles chaînes à partir d'une espèce moléculaire (suite à du transfert au solvant par exemple) ne paraît pas réaliste : pour expliquer la diminution de M_n entre 62% et 79% de conversion lors de l'essai M3, la masse molaire des nouvelles chaînes formées serait d'environ 100000 g/mol (calcul similaire à celui présenté dans le chapitre 3, cf. § I-3-a, p.126)*. Etant donné que les réactions de transfert au solvant ne s'effectueraient de manière importante qu'à partir du moment où le milieu est moins riche en monomère, la croissance d'une chaîne jusqu'à une telle masse molaire (sans qu'elle ne transfère à son tour) est difficilement concevable. A la limite, si un transfert au solvant se produisait, cela ne pourrait conduire qu'à des chaînes de « faibles » masses molaires (<50000 g/mol) qui ne seraient alors pas incluses dans la distribution de masse considérée (limite inférieure de cette distribution ~ 60000 g/mol).

Ainsi, même si le phénomène de fragmentation des chaînes peut sembler relativement improbable à 60°C, il est tout de même plus réaliste que le phénomène de transfert au solvant (ou à une autre espèce moléculaire).

D'autre part, quelle que soit l'origine du phénomène considérée, celui-ci ne conduit à des valeurs de I_p élevées qu'en diminuant simultanément les valeurs de M_n . Ici, les valeurs de I_p très élevées alors que les valeurs de M_n sont proches des valeurs théoriques (à 43 et 62% de conversion) semblent indiquer la présence d'un autre phénomène (cf. II-4, p.185).

Remarque : pour les essais M1, M2 et M3, le milieu de polymérisation devient très rapidement visqueux : dès 50 à 60% de conversion, le barreau magnétique est bloqué et en fin de polymérisation, le milieu est totalement figé.

* dans ce cas, ces nouvelles chaînes présentant un M_n d'environ 100000 g/mol seraient bien incluses dans la distribution de masse considérée (limite inférieure de cette distribution ~ 60000 g/mol).

II-3. Synthèse de la structure envisagée

a) Copolymérisation NAM/NAS en présence de BEDBA

Suite à la perte importante du contrôle de la copolymérisation en présence de 40% de NAS, les essais avec le dithioester-biotine (B1 et B2) ont été réalisés avec un mélange de comonomères **NAM/NAS** dans un rapport molaire **80/20**. L'essai B2 est identique à B1, si ce n'est que le volume réactionnel est quadruplé et que la vitesse de rotation du barreau magnétique est progressivement diminuée en fonction de l'augmentation de viscosité du milieu (afin d'éviter un arrêt total de l'agitation).

Après la période d'induction, les vitesses de polymérisation globales des essais B1 et B2 sont identiques et sont intermédiaires entre les vitesses de polymérisation des essais M2 et M3* (Figure 10) : l'effet d'accélération de la cinétique semble donc dépendant de la proportion de NAS dans le mélange de comonomères. La différence de durée de la période d'induction entre B1 et B2 (25 min. d'écart) n'est pas expliquée.

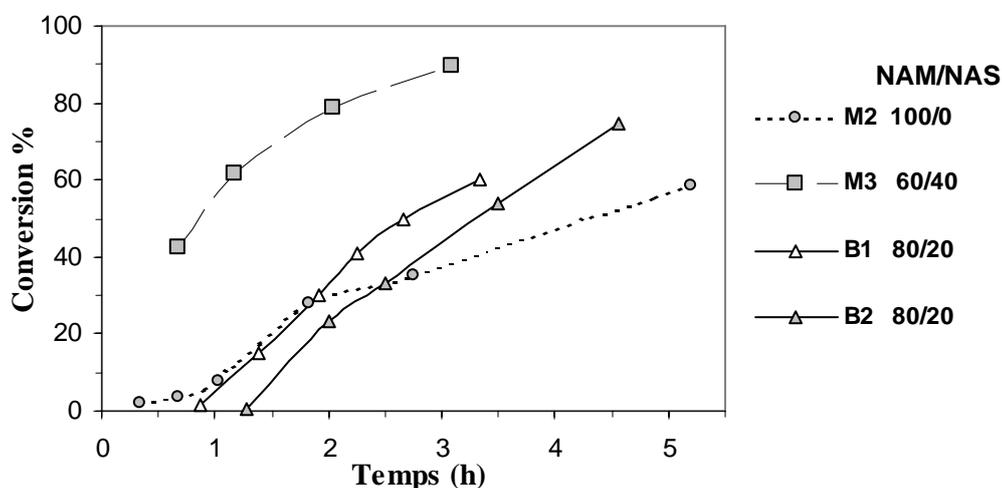


Figure 10 : Cinétiques comparées des essais M2, M3, B1 et B2

Comme espéré, la diminution de la proportion initiale de NAS permet de retrouver un contrôle « correct » de la copolymérisation : l'évolution des M_n en fonction de la conversion est identique à celle de l'essai d'homopolymérisation M2 (Figure 11).

De même, les valeurs des indices de polymolécularité de la copolymérisation sont du même ordre de grandeur que celles de l'homopolymérisation (Figure 12). Cependant, à faible conversion (<30%), elles sont significativement supérieures. Puis, leur augmentation est limitée (en comparaison notamment avec M3). De plus, l'optimisation de l'agitation magnétique semble bien avoir un effet bénéfique sur les valeurs de I_p . Cela semble indiquer que des problèmes d'hétérogénéité du milieu de polymérisation seraient peut-être responsables de l'obtention d'échantillons présentant une distribution des masses molaires relativement large, avant même l'apparition du phénomène de fragmentation des chaînes (cf. § II-4, p.185).

* pentes initiales des graphes $\ln([M]_0/[M])=f(\text{temps})$: $0,09 \text{ h}^{-1}$ (M2) < $0,17 \text{ h}^{-1}$ (B1) ~ $0,19 \text{ h}^{-1}$ (B2) < $0,30 \text{ h}^{-1}$ (M3)

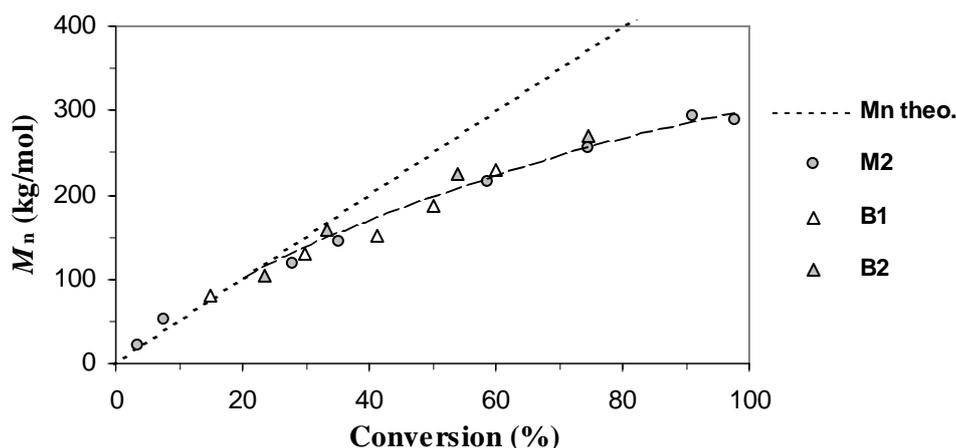


Figure 11 : Evolution des masses molaires moyennes en nombre en fonction de la conversion pour les essais M2, B1 et B2.

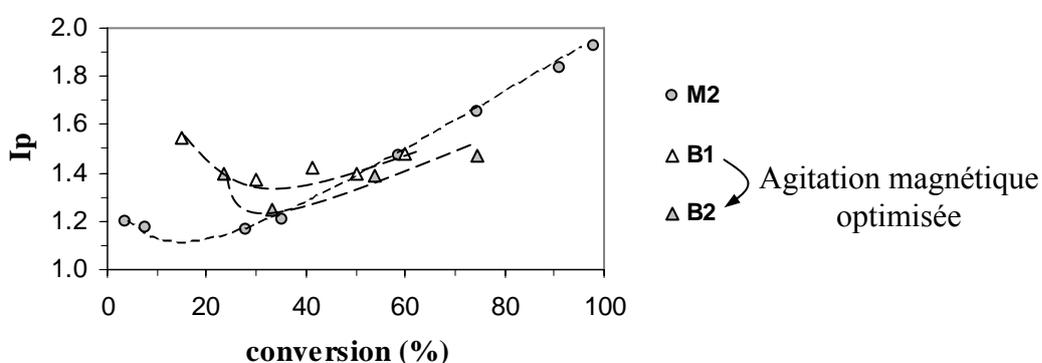


Figure 12 : Evolution des indices de polymolécularité en fonction de la conversion pour les essais M2, B1 et B2.

Ainsi, l'essai B2 a permis de répondre entièrement à l'objectif : un copolymère statistique comprenant 25% de NAS et de M_n égal à 159000 g/mol a été obtenu (Tableau 3). Cette masse molaire étant proche de la valeur théorique, le phénomène de fragmentation des chaînes est très limité pour cet échantillon. Par conséquent, l'indice de polymolécularité est relativement faible égal à 1,25 et le taux de fonctionnalisation des extrémités de chaînes par une biotine est élevé.

En revanche, pour l'échantillon de M_n égal à 271000 g/mol, l'indice de polymolécularité est plus élevé (mais tout de même inférieur à 1,5) et le taux de fonctionnalisation est plus modeste (cf. § suivant).

Tableau 3 : Caractéristiques des bio-conjugués copolymères obtenus.

Echantillon	Masse (g)	Conversion (%)	M_n théorique (g/mol)	Rapport molaire NAM/NAS*	M_n (g/mol)	Ip	Tf** (%)
B2-T5	1,9	33	169500	75/25	159000	1,25	~94
B2-T7	4,6	75	374500	79/21	271000	1,47	72

* la dérive de composition est relativement faible (mélange initial 80/20) comme en copolymérisation conventionnelle²⁰.

** Tf = pourcentage de chaînes présentant une biotine à leur extrémité α (cf. page suivante).

b) Estimation du taux de fonctionnalisation• Echantillon B2-T5 :

Le chapitre 3 a montré que le ligand biotine n'était pas dégradé au cours de la polymérisation RAFT et que la totalité de l'agent RAFT initial amorçait des chaînes. Ainsi, lorsque la masse molaire moyenne en nombre est très proche de la valeur théorique, la proportion de chaînes amorcées par le fragment ré-amorceur de l'agent RAFT (fragment biotinylé) est également proche de la valeur théorique. Avec un rapport initial $[ATC]/[V65]$ égal à 10 et en calculant la proportion d'amorceur décomposé au moment du prélèvement, le pourcentage de chaînes amorcées par le V65 n'est que de 5%*. Par conséquent, le taux de fonctionnalisation (Tf) théorique des chaînes par une biotine est d'environ 95%.

L'écart entre la valeur de M_n expérimentale et la valeur théorique peut également être exploité pour estimer le taux de fonctionnalisation Tf :

$$Tf = \frac{\text{nb chaînes amorcées par l'ATC}}{\text{nb total de chaînes}} = \frac{[ATC]_0}{[ATC]_0 + [N]}$$

où $[N]$ est la concentration en chaînes non-fonctionnalisées (amorcées par l'amorceur ou formées par tout autre phénomène).

$$M_n \text{ théorique} = Mn_{\text{théo}} = \frac{A}{[ATC]_0}$$

$$\text{avec } A = [NAM]_0 \times M_{NAM} \times \text{Conv.}_{NAM} + [NAS]_0 \times M_{NAS} \times \text{Conv.}_{NAS}$$

$$\text{et } M_n \text{ expérimental} = Mn_e \approx \frac{A}{[ATC]_0 + [N]}; \quad \text{donc} \quad Tf = \frac{[ATC]_0}{[ATC]_0 + [N]} = \frac{Mn_e}{Mn_{\text{théo}}} \quad (4)$$

$$\text{Pour l'échantillon B2-T5, } Tf = \frac{Mn_e}{Mn_{\text{théo}}} = \frac{159000 \pm 8000}{169500} \approx 0.94 \pm 0.05 \rightarrow \mathbf{94 \pm 5\%}$$

• Echantillon B2-T7 :

Pour cet échantillon, la masse molaire moyenne en nombre est significativement inférieure à la valeur théorique : le phénomène de fragmentation des chaînes conduit à la formation de nombreuses chaînes non fonctionnalisées.

$$(4) \rightarrow Tf = \frac{Mn_e}{Mn_{\text{théo}}} = \frac{271000 \pm 2000}{374500} \approx 0.724 \pm 0.005$$

Dans l'échantillon B2-T7, « seules » 72% des chaînes portent une biotine à leur extrémité α .

* Valeur calculée avec $k_d = 7,3 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ (cf. Tableau 1, p.177 ; 52% de l'amorceur est décomposé après 2,5 heures (B2-T5) de polymérisation à 60°C) et un facteur d'efficacité supposé égal à 0,5.

II-4. Vers la compréhension des polymérisations de type RAFT visant des masses molaires élevées.

L'analyse de la distribution des masses molaires *via* les valeurs de M_n et I_p ne fournit qu'une vision restreinte de la distribution. La stagnation (ou la diminution) des M_n à partir d'une certaine conversion indique la présence du phénomène de fragmentation des chaînes consécutif à des réactions de transfert au polymère (§ II-2.a). Cependant, celui-ci ne peut expliquer l'obtention de valeurs de I_p systématiquement supérieures à 1,15 (même à faible conversion) dans les cas où une masse molaire élevée est visée, alors que dans des conditions de contrôle parfait (cas pour lesquels M_n visé = 50000 g/mol), cette valeur de 1,15 est la valeur maximale obtenue (cf. chapitre 3, p.124).

Lorsqu'une masse molaire élevée est visée, la présence d'un autre phénomène est alors fortement suspectée. Le cas extrême est révélé par l'essai de copolymérisation M3 et plus particulièrement par le prélèvement à 62% de conversion : M_n très proche de la valeur théorique (donc *a priori* pas de phénomène de fragmentation de chaînes) mais I_p égal à 2,0 (Figure 8 et Figure 9) !

Une analyse plus fine de la distribution des masses molaires a alors été entreprise. Celle-ci est basée sur des graphes représentant la concentration molaire en chaînes en fonction de la masse molaire individuelle (M_i) (ex. Figure 13) ou bien la fraction molaire cumulée en fonction de la masse molaire individuelle (M_i) (ex. Figure 14). L'analyse complète et comparative de plusieurs essais est présentée en annexe 8 (p.245). Ici, seul le cas correspondant à l'essai M3 est développé mais les informations apportées par cette analyse sont transposables à l'ensemble des polymérisations RAFT visant des masses molaires élevées.

La Figure 13 permet de très bien visualiser l'important phénomène de fragmentation de chaînes qui se produit après 60% de conversion dans l'essai M3 : le phénomène est si important qu'il induit un recul de la masse molaire de la population de chaînes majoritaires en nombre (masse correspondant au sommet des pics). Mais cette figure met également en évidence un autre phénomène qui n'est pas visible sur les graphes classiques $M_n = f(\text{conv.})$: les distributions des masses molaires présentent toutes une traînée importante de chaînes de très haute masse molaire (quelques millions de g/mol) !

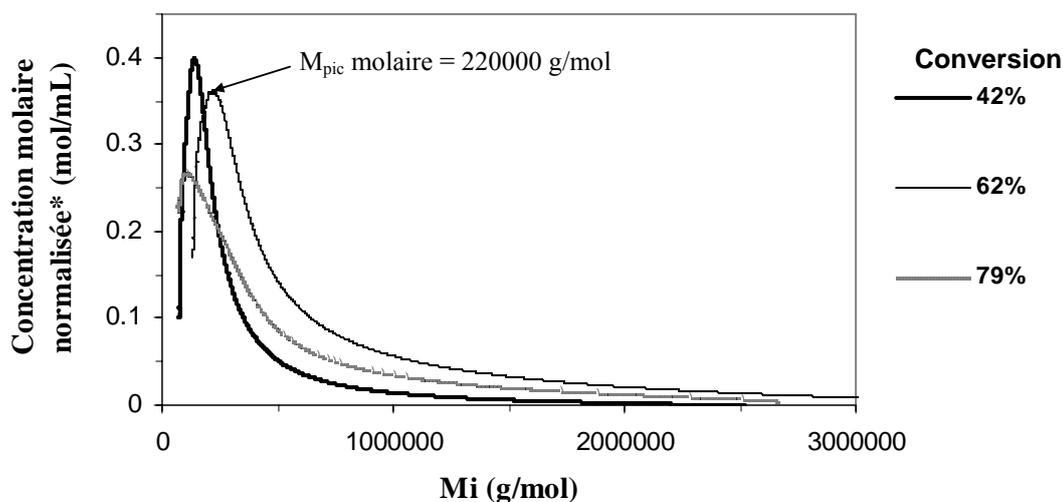


Figure 13 : Distribution des masses molaires des échantillons à différentes conversions dans l'essai M3 (copolymérisation NAM/NAS 60/40).

* Conc. normalisée → chaque courbe représente la distribution des masses molaires d'1 mole de chaînes.

Ces distributions peuvent être comparées à la distribution d'un échantillon bien contrôlé ($I_p = 1,03$) (Tableau 4) : dans ce dernier cas, la masse de la population de chaînes majoritaires en nombre $M_{pic,molaire}$ est très proche de la valeur de M_n et une infime partie des chaînes présente une masse molaire supérieure à deux fois la valeur de $M_{pic,molaire}$ (cf. Figure 6 du chapitre 3, p.128). En revanche, pour les échantillons de l'essai M3, la valeur de $M_{pic,molaire}$ est non seulement significativement inférieure au M_n , mais en plus la proportion de chaînes ayant une masse molaire supérieure à deux fois $M_{pic,molaire}$ est loin d'être négligeable : par exemple, pour le prélèvement à 62% de conversion, ces longues chaînes représentent 15% de l'ensemble des chaînes (valeur déterminée grâce à la Figure 14). Il faut aller jusqu'à 3.200.000 g/mol (10 fois la valeur de M_n !) pour que la proportion de chaînes ayant une masse molaire supérieure à cette valeur ne représente plus que 0,1% ! Avec de telles largeurs de distribution, les valeurs élevées de I_p ne sont plus étonnantes.

Tableau 4 : Valeurs caractéristiques de la distribution des masses molaires des échantillons de l'essai M3.

Essai	Conversion (%)	M_n théorique (g/mol)	M_n exp. (g/mol)	I_p	M_{pic} molaire (g/mol)	% chaînes $> 2 M_{pic}$ molaire	% chaînes $> 2,5 M_{pic}$ molaire
« chap.3 »*	75	37600	41300	1,03	42100	0,7	0,1
M3	42	212900	184200	1,7	135000	13	8
	62	308400	321000	2,0	220000	15	10
	79	395400	190000	3,0	95000	35	26

* Homopolymérisation de la NAM en présence de MEDBA présenté dans le chapitre 3 (p.122)

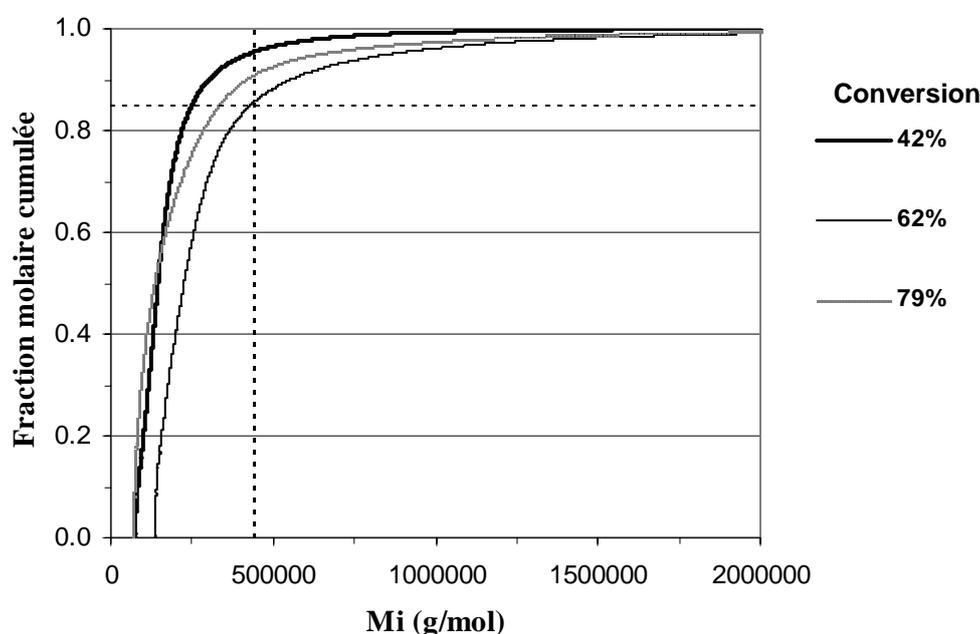


Figure 14 : Fraction molaire cumulée en fonction de la masse molaire des chaînes (M_i) pour les prélèvements issus de l'essai M3 (copolymérisation NAM/NAS 60/40)

Il est probable que cette perte importante de contrôle de la polymérisation soit la conséquence directe d'un « effet de gel » (forte augmentation de la viscosité \Rightarrow arrêt de l'agitation magnétique) : avec l'accroissement de la longueur des chaînes, la mobilité des espèces polymères (macro-radicaux et chaînes dormantes) diminuerait bien plus vite que celle du monomère. Dans le cas limite, les macro-radicaux et les chaînes dormantes seraient totalement figés et seul le monomère pourrait diffuser dans l'enchevêtrement des pelotes statistiques. La probabilité de rencontre d'un macro-radical avec une chaîne dormante ou avec un autre radical serait alors très réduite, et par conséquent sa croissance serait fortement favorisée: cela induirait une croissance extrêmement rapide des chaînes actives et par conséquent une forte hétérogénéité de la longueur des chaînes. De plus, l'« effet de gel » diminuerait également considérablement la probabilité des réactions de terminaison. L'accélération de la copolymérisation par rapport à l'homopolymérisation pourrait alors être expliquée par un « effet de gel » *plus important** (à cause de la présence du NAS) : non seulement la probabilité de terminaison est réduite mais l'effet de « retard » induit par l'équilibre entre chaînes actives et chaînes dormantes se trouverait également diminué.

Hypothèse proposée :

Dans un milieu de polymérisation totalement hétérogène et figé, on peut imaginer que les chaînes présentant les masses molaires les plus élevées seraient formées par des chaînes actives « isolées » qui ne rencontrent plus de chaînes dormantes : celles-ci ne peuvent que propager (d'où une croissance extrême)... ou transférer au polymère (sur les chaînes voisines ou sur elles-mêmes) surtout lorsque le milieu est appauvri en monomère et que sa diffusion entre des chaînes est de plus en plus lente. Il est donc possible qu'un « effet de gel » important puisse à la fois former des chaînes de très hautes masses molaires et favoriser en même temps le phénomène de fragmentation des chaînes (même à 60°C) à partir d'une certaine conversion. En effet, après qu'une chaîne active « isolée » ait consommé tout « son » monomère environnant, la croissance de cette chaîne est limitée par la diffusion du monomère. Si cette diffusion est très lente, la chaîne active ne peut que transférer au solvant ou au polymère (« en attendant » la diffusion de monomère). Après cette étape de transfert, le radical ne pourrait toujours pas additionner du monomère si celui-ci n'est toujours pas « arrivé », d'où une autre réaction de transfert et ainsi de suite... jusqu'à l'arrivée d'un peu de monomère, qui est très vite consommé avant de se retrouver à nouveau dans une situation où le radical doit attendre la diffusion du monomère. Dans cette situation, les réactions de transfert au polymère sont alors extrêmement fréquentes et étant donné qu'il n'y aurait pas souvent de monomère dans l'environnement proche, le radical en milieu de chaîne ne pourrait que re-transférer... ou fragmenter la chaîne. Ainsi, même si à 60°C cette fragmentation est peu probable (par exemple 1 fois sur 100 réactions de transfert au polymère), elle aurait quant même lieu relativement souvent car le radical serait fréquemment situé sur une chaîne (réactions de transfert au polymère extrêmement fréquentes).

Dans des conditions expérimentales pour lesquelles le phénomène de fragmentation des chaînes consécutif au transfert au polymère ne paraît pas possible, l'autre phénomène d'« effet de gel » serait alors une cause indirecte qui expliquerait malgré tout sa présence.

* « effet de gel » *plus important* dans la copolymérisation NAM/NAS que dans l'homopolymérisation du NAM. Mais cela n'empêche pas qu'un « effet de gel » soit également présent dans les essais d'homopolymérisation.

L'ensemble des polymérisations RAFT visant des masses molaires élevées présentent une traînée importante de chaînes de très hautes masses molaires (cf. annexe 9, p.262) ce qui reste cohérent avec un possible « effet de gel » qui réduirait considérablement la mobilité des espèces macromoléculaires. Une dilution du milieu de polymérisation pourrait être envisagée pour éviter cet « effet de gel » mais cela risque fort de faire apparaître le phénomène de transfert au polymère suivi d'une fragmentation des chaînes à plus faible conversion (ce qui remplacerait un problème par un autre !). De plus, la diminution de la concentration initiale en monomère risque également de ralentir la vitesse de polymérisation.

Le problème de mobilité de ces espèces pourrait peut-être être résolu par la réalisation de polymérisations RAFT à de très hautes pressions. En effet, la polymérisation RAFT du méthacrylate de méthyle sous une pression de 5 kbar conduit à des polymères de M_n compris entre 100.000 et 1.200.000 g/mol avec des indices de polymolécularité faibles ($<1,1$).²³ L'intérêt de la polymérisation sous haute pression est qu'elle permet d'éviter un « effet de gel » sans avoir à diminuer fortement la concentration initiale en monomère.

II-5. Conclusion

L'analyse approfondie de la distribution des masses molaires des échantillons obtenus lors des polymérisations RAFT visant des masses molaires élevées (supérieures à 100000 g/mol) révèle la présence d'un nombre non négligeable de chaînes de très hautes masses molaires (quelques millions de g/mol). Il est probable que la mobilité extrêmement réduite des espèces macromoléculaires (macro-radicaux et macro-chaînes dormantes) ainsi qu'une très forte viscosité (arrêt de l'agitation magnétique) puisse conduire à un milieu de polymérisation hétérogène, dans lequel ces chaînes de très hautes masses molaires pourraient se former. Cet « effet de gel » conduirait ainsi à une perte de contrôle de la polymérisation RAFT. Ce phénomène se rajoute au phénomène de fragmentation des chaînes (transfert au polymère puis β -scission) déjà observé dans les travaux antérieurs^{14,17}, et confirmé ici par l'analyse approfondie de l'évolution de la distribution des masses molaires en fonction de la conversion.

Malgré ces deux phénomènes perturbateurs du contrôle des polymérisations RAFT, une démarche empirique à partir d'un essai judicieusement choisi a permis d'atteindre la structure du bio-conjugué visé : un copolymère statistique NAM/NAS (rapport molaire 75/25) fonctionnalisé en extrémité de chaîne par une biotine (taux de fonctionnalisation d'environ 94%) et présentant un M_n égal à 159000 g/mol avec un indice de polymolécularité faible ($=1,25$) a été obtenu. Ce copolymère présente en moyenne 271 unités réactives NAS par chaîne. Même si l'accessibilité de toutes ces fonctions réactives est loin d'être assurée, la présence d'un tel nombre d'unités NAS par chaîne devrait permettre la fixation d'un nombre élevé de fluorophores.

Ainsi, en collaboration avec le Laboratoire « Centro de Química-Física Molecular » de l'Institut Supérieur Technique de Lisbonne (thèse de Mariana Beija), un polymère fluorescent présentant en moyenne 60 fluorophores par chaîne a pu être synthétisé²⁴. Sa caractérisation est actuellement en cours, mais compte tenu des résultats précédents¹⁶, une amplification du signal de fluorescence (par rapport à un fluorophore seul) encore plus importante peut être attendue.

III. Particules fonctionnalisées à chevelure contrôlée

III-1. Introduction

a) Contexte

Les particules de polymère (latex) fonctionnalisées sont déjà employées dans le cadre du diagnostic biologique.^{25,26} Leur importante surface développée et la possibilité de fonctionnalisation variable en font des supports de choix pour la capture d'entités biologiques. Cependant, des problèmes d'accessibilité du ligand biologique et/ou d'adsorption non spécifique sur la surface hydrophobe de la particule peuvent parfois gêner l'étape de capture spécifique de l'entité recherchée. Pour pallier ces inconvénients, une stratégie consiste à éloigner le ligand biologique de la surface de la particule à l'aide de « cheveux » constitués de chaînes polymères hydrophiles (Schéma 6). Non seulement ces chaînes permettraient de « masquer » la surface hydrophobe des particules mais elles pourraient également optimiser l'accessibilité du ligand biologique.

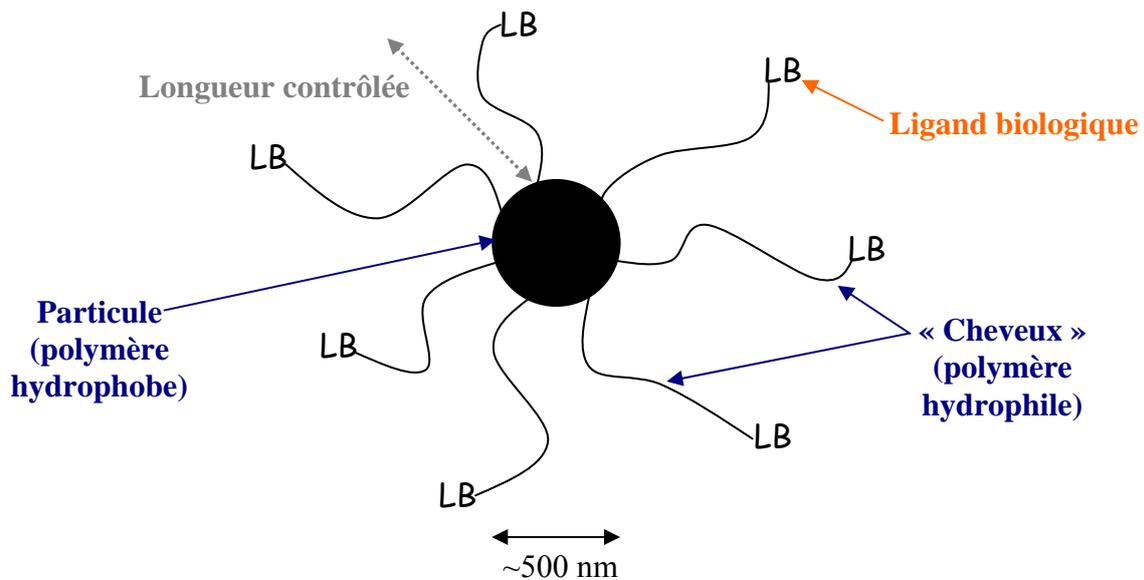


Schéma 6 : Schéma de la structure des particules chevelues envisagées.

La longueur et la densité de la « chevelure » sont également des paramètres critiques : une chevelure courte et peu dense pourrait ne pas assez « masquer » la surface de la particule, et à l'opposé une chevelure trop longue et dense pourrait limiter l'accessibilité du ligand biologique si celui-ci se trouve « emprisonné » à l'intérieur des pelotes statistiques. Un contrôle de la longueur des « cheveux » est donc souhaité. Le procédé de polymérisation RAFT a donc été retenu pour répondre à ces critères.

b) Stratégies envisageables

L'élaboration de particules à chevelure contrôlée peut s'envisager en premier lieu par les deux techniques principales de greffage sur supports, le « greffage sur » et le « greffage à partir de ». La stratégie de « greffage sur » a déjà été développée précédemment^{27,28} : il s'agit du greffage covalent de « cheveux » porteurs d'une fonction acide carboxylique terminale sur des particules aminées (Schéma 7). Les « cheveux » ont préalablement été synthétisés par polymérisation de type RAFT et la fonction acide carboxylique en extrémité α est apportée par un dithioester adéquat (possédant une fonction acide carboxylique sur le groupement R).

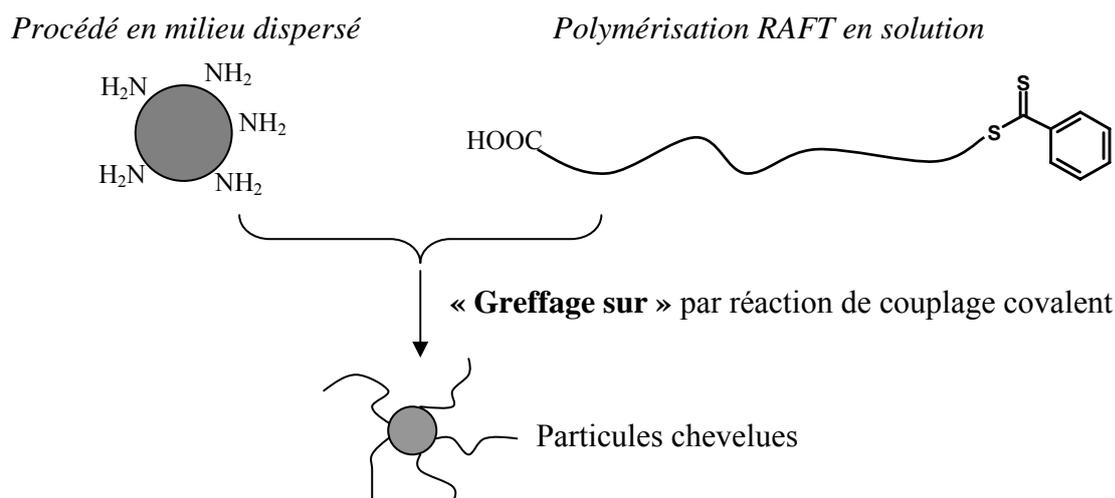


Schéma 7 : Principe de la synthèse de particules à chevelure contrôlée *via* polymérisation de type RAFT puis greffage sur la surface des particules (« greffage sur »).²⁷

A l'opposé, la stratégie de « greffage à partir de » consiste en l'introduction préalable d'agents RAFT à la surface des particules de latex par le biais de leur groupe R. Puis, la polymérisation d'un monomère hydrophile permet de conduire aux particules chevelues désirées. Cette deuxième voie explorée au LCPD est plus laborieuse puisqu'elle requiert la maîtrise de la chimie de greffage des agents RAFT et de la polymérisation contrôlée en milieux aqueux à partir d'un support. Le dithioester « tertiaire » SCBDB (synthèse décrite au chapitre 2, p.78) porteur d'une fonction ester activé a notamment été utilisé selon cette stratégie d'élaboration de particules chevelues.

Ces deux voies de synthèse permettent bien d'obtenir des particules à chevelure contrôlée mais ne conduisent pas aux particules souhaitées, à chevelure contrôlée et **fonctionnalisée** en extrémité par un ligand biologique. L'extrémité dithioester des « cheveux » reste néanmoins disponible pour une éventuelle modification chimique, mais cela implique une étape de fonctionnalisation post-polymérisation qui risque de se confronter à des rendements faibles (cf. chapitre 1, p.19).

A l'inverse, les bio-conjugués synthétisés dans ce travail de thèse présentent déjà un ligand biologique en extrémité α . Cependant, leur stratégie de synthèse (fonctionnalisation du groupe R d'un dithioester précurseur) rend impossible la transposition des voies « greffage sur » et « greffage à partir de » décrites ci-dessus. Dans notre cas, seule l'extrémité ω (dithioester) est disponible comme fonction réactive potentiellement exploitable comme site d'ancrage sur les particules. Après transformation en fonctions thiol, la voie du « greffage

sur » pourrait être envisagée. Cependant, elle nécessiterait la synthèse de particules portant des fonctions complémentaires en surface (maléimide, disulfure de pyridyle, thiol,...). De plus, selon la longueur de chaîne, l'accessibilité de la fonction thiol terminale ne serait pas optimale. Ainsi, cette voie du « greffage sur » risque à nouveau de se confronter à des rendements de couplage faibles.

Au-delà de la possibilité de transformation chimique, la principale particularité de l'extrémité ω (dithioester) est son caractère très transférant (utilisé en polymérisation RAFT). Notre stratégie a donc tenté de mettre à profit cette propriété de manière pertinente dans un procédé d'élaboration de particules de latex. Or, il se trouve que le principe d'élaboration de particules stables par le procédé de polymérisation en dispersion est justement basé sur des réactions de transfert. Ce procédé peut donc constituer une technique de choix pour notre approche.

III-2. Stratégie adoptée : la polymérisation en dispersion

a) Principe de la polymérisation en dispersion

La polymérisation en dispersion est généralement utilisée pour obtenir des latex dont la taille des particules est de l'ordre du micromètre. Contrairement aux autres procédés de polymérisation en milieu dispersé (suspension, émulsion, miniémulsion,...), le milieu est initialement homogène : le solvant est choisi tel que, le monomère est soluble et le polymère résultant insoluble ; les autres constituants (amorceur, polymère stabilisant,...) sont également solubles. Sous l'effet de la température, l'amorceur se décompose et la polymérisation commence en milieu homogène. Après avoir atteint une longueur de chaîne critique, les oligomères deviennent insolubles, précipitent et génèrent des nucléi. De manière concomitante, le polymère stabilisant subit des réactions de transfert vis-à-vis des oligoradicaux. Ces réactions conduisent à la formation de copolymère greffé qui vient s'adsorber sur les nucléi assurant ainsi leur stabilisation stérique. Le latex final est constitué de particules stabilisées stériquement par le polymère stabilisant initial, greffé de manière aléatoire sur leur surface (Schéma 8).

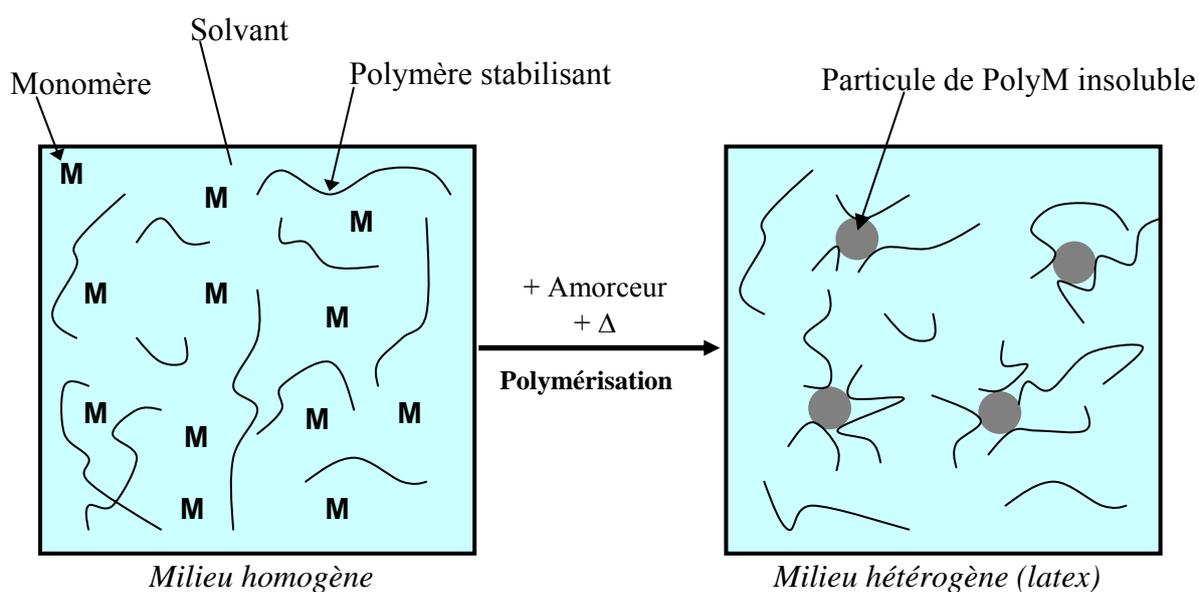


Schéma 8 : Principe général de la polymérisation en dispersion.

b) Stabilisants stériques utilisés dans la littérature

Les polymères classiquement utilisés comme stabilisants stériques sont des homopolymères. Citons les exemples typiques que constituent la poly(*N*-vinylpyrrolidone) (PVP) et l'hydroxypropylcellulose pour la polymérisation en dispersion en milieu polaire. Ces stabilisants sont généralement utilisés à des concentrations élevées, de l'ordre de 5 à 30% en masse (par rapport au monomère), mais en réalité seule une faible fraction du polymère participe effectivement à la stabilisation.²⁹ Par exemple, Wang *et al.*³⁰ ont montré que seuls 6% du PVP initialement introduit ($M_w = 360000$ g/mol) se retrouvent greffés aux particules formées lors de la polymérisation en dispersion de l'acrylate de *n*-butyle. Ces faibles taux de greffage sont principalement dus à la faible valeur de la constante de transfert au polymère, C_{tr}^* (de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3}).³¹ Par conséquent, très peu de copolymère greffé se forme durant la polymérisation.

Pour pallier cette faible formation de copolymère greffé, deux types de stratégie ont été développés :

- Une première solution consiste à utiliser des copolymères à blocs (préformés) ($M_n = 1000-20000$ g/mol)³². Ceux-ci sont conçus pour offrir à la fois une bonne stabilisation stérique (un bloc très soluble dans le solvant) et une bonne adhésion sur les particules (un bloc ayant une forte affinité avec la surface des particules relativement au solvant). Les copolymères à blocs sont effectivement de meilleurs stabilisants que les homopolymères à condition que leur caractère amphiphile ne soit pas trop marqué. En effet, leur forte tendance à s'organiser en agrégats micellaires (concentration critique d'agrégation généralement faible) peut fortement limiter leur efficacité : une chaîne de copolymère à blocs au sein d'une micelle n'est pas rapidement disponible pour aller stabiliser des particules qui se forment. Le cas extrême étant les micelles dites « gelées ».³² Ainsi, les quantités de copolymères à blocs utilisées restent relativement élevées (>5% en masse/monomère) afin d'éviter la formation de coagulum.²⁹
- Une autre solution alternative consiste à favoriser la formation *in situ* de copolymères :
 - soit par l'utilisation d'un macromonomère (polymère stabilisant comportant un groupe polymérisable). Les concentrations efficaces peuvent être relativement faibles (jusqu'à 0,2% en masse /monomère).²⁹ La copolymérisation conduit à des copolymères greffés dont la composition dépend des taux de réactivité.
 - soit par l'utilisation de chaînes polymères comportant une extrémité transférente de type thiol ! De tels polymères (poly(acétate de vinyle-*co*-alcool vinylique)³³ ou PEO³⁴) sont très efficaces pour la polymérisation en dispersion du styrène : seulement 3% en masse/monomère de stabilisant ($M_w = 5000$ g/mol³⁴) conduit à un latex stable avec une distribution étroite des tailles des particules. Dans les travaux correspondants^{33,34}, réalisés avant la découverte du procédé RAFT, l'extension vers d'autres polymères et vers des fonctions encore plus transférantes, telles que les dithioesters, n'a pas été envisagée. Et pourtant, cette solution qui met en jeu une formation *in situ* de copolymère à blocs pourrait très avantageusement être utilisée pour la synthèse des particules chevelues fonctionnelles envisagées dans ce chapitre.

* Constante de transfert $C_{tr} = k_{tr}/k_p$ (constante de vitesse de transfert/constante de vitesse de propagation).

Les travaux antérieurs confortent donc l'intérêt porté au procédé de polymérisation en dispersion et soutiennent l'idée que la localisation d'une fonction très transférante à l'extrémité des chaînes du polymère stabilisant devrait favoriser son greffage et ainsi conduire à des particules chevelues. Ainsi, la structure des particules chevelues envisagée semble directement accessible *via* l'utilisation des chaînes α -bio-fonctionnelles préalablement synthétisées par le procédé RAFT au chapitre 3 (Schéma 9). Une étude de faisabilité concernant la synthèse de particules chevelues suivant ce principe a alors été entreprise.

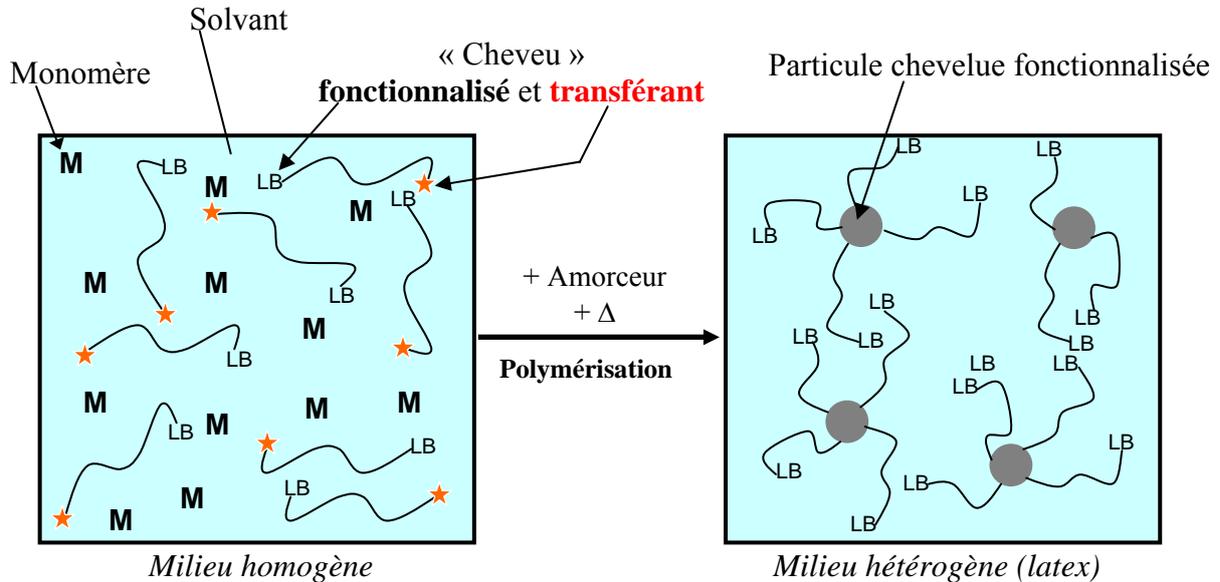


Schéma 9 : Principe d'une polymérisation en dispersion en présence de chaînes polymères présentant une fonction transférante à une extrémité. [LB = ligand biologique]

III-3. Polymérisation en dispersion en présence de chaînes dormantes.

a) Préliminaires

Afin de concevoir une formulation adéquate, une réflexion approfondie se basant à la fois sur certains résultats de la littérature traitant de polymérisation en dispersion et sur notre expérience en matière de polymérisation RAFT a préalablement été menée. Brièvement exposée ci-après, elle a permis d'imaginer une formulation de polymérisation en dispersion *a priori* optimisée, et capable de répondre à notre objectif : synthétiser, à partir de chaînes hydrophiles et fonctionnalisées, des particules isodisperses chevelues avec un taux élevé de greffage des chaînes.

Les résultats de la littérature concernant l'utilisation de chaînes terminées par des fonctions thiol laissent présager du bon potentiel de stabilisation des chaînes dormantes synthétisées par le procédé RAFT étant donnée leur constante « de transfert » très élevée (Tableau 5).

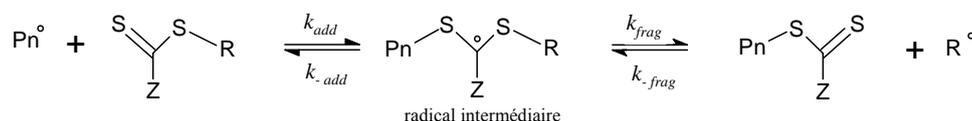
Cependant, une étude quantitative du taux de greffage indique que moins de 15 % des chaînes thiol sont greffées sur les particules de polystyrène.³⁴ Les auteurs supposent que ce faible taux de greffage est dû à une activité de transfert trop efficace en début de polymérisation : la consommation rapide des macro-agents de transfert limite fortement les

masses molaires des copolymère à blocs résultants qui restent solubles dans la phase continue (blocs polystyrène oligomères). Ainsi, une quantité importante de stabilisant est perdue en début de polymérisation.

Tableau 5 : Ordre de grandeur des constantes de transfert.

Composé	Ordre de grandeur de la constante de transfert ($C_{tr} = k_{tr}/k_p$) ³¹
Polymère quelconque	10^{-4} - 10^{-3}
Composé comportant une fonction thiol (-SH)	10^{-2} - 10^2
Composé comportant une fonction dithioester	10^2-10^4 (k_{add}/k_p)

Remarque : dans le Tableau 5, la constante de transfert C_{tr} des dithioesters est assimilée au rapport k_{add}/k_p (constante de vitesse d'addition/constante de vitesse de propagation) dans une approche simplifiée. En toute rigueur, la constante de vitesse de transfert k_{tr} dépend des deux constantes de vitesse de fragmentation du radical intermédiaire k_{frag} et k_{-add} :³⁵



$k_{tr} = k_{add} \times k_{frag} / (k_{-add} + k_{frag})$. Ainsi, si R° est un bon groupe partant, $k_{frag} \gg k_{-add}$ et donc $k_{tr} \sim k_{add}$.

Après l'optimisation du taux de fonctionnalisation lors de la synthèse des chaînes dormantes α -bio-fonctionnelles (cf. chapitre 2), une perte importante du composé d'intérêt à cette étape de synthèse des particules serait dommage. Cependant, dans une polymérisation de type RAFT, la limitation des événements de terminaison évite l'arrêt de la croissance des chaînes au stade oligomère. L'utilisation de chaînes dormantes ne devrait donc pas conduire à une perte de stabilisant en début de polymérisation... à condition de rester dans des conditions de polymérisation contrôlée. En effet, si la quantité d'amorceur utilisée est très importante par rapport à la quantité de fonctions dithioester présentes dans le milieu, la polymérisation ne sera pas contrôlée ce qui signifie, entre autres, que de nombreux événements de terminaison pourront se produire en début de polymérisation stoppant ainsi la croissance d'un nombre non négligeable de chaînes. Or, dans une formulation classique de polymérisation en milieu dispersé, la quantité d'amorceur est relativement importante (~1 à 2 % en masse/monomère). L'adaptation de la formulation (diminution de la quantité d'amorceur) pourrait alors s'avérer nécessaire pour s'approcher de conditions de polymérisation de type RAFT et espérer des taux de greffage élevés.

Ainsi, la conservation du caractère contrôlé en polymérisation en dispersion n'a pas pour but d'obtenir des copolymères à blocs de longueur définie et de distribution des masses molaires étroite, mais plutôt de contrôler les étapes de formation des particules, en particulier, l'étape de nucléation *via* le contrôle de la formation du copolymère à blocs stabilisant. En effet, si la croissance de toutes les chaînes (nouveau bloc du copolymère ou homopolymère formé en parallèle) est parfaitement contrôlée, ces chaînes devraient toutes atteindre la longueur critique de précipitation « en même temps », ce qui engendrerait une durée de nucléation très courte. De ce fait, des particules isodisperses en taille présentant un taux de greffage optimum (proche du taux de fonctionnalisation des chaînes en fonction dithioester,

c-a-d au minimum de 91% selon les conditions de synthèse utilisées ici) pourraient être attendues.

Pour assurer cette nucléation contrôlée, la croissance simultanée des chaînes formant le nouveau bloc du copolymère avec celle des chaînes d'homopolymère semble primordiale. Cependant, la longueur critique de précipitation de l'homopolymère pourrait être plus faible que celle du copolymère à blocs. De ce fait, les chaînes homopolymères pourraient induire une nucléation avant même la formation (en quantité importante) de copolymères à blocs suffisamment longs (et donc efficace pour la stabilisation). Cette différence probable de comportement entre les chaînes homopolymères et les chaînes copolymères est une raison supplémentaire pour diminuer la quantité d'amorceur et ainsi limiter la proportion des chaînes homopolymères.

b) Choix des conditions de polymérisation

La croissance du nouveau bloc à partir de chaînes dormantes de polyNAM dépend du bon déroulement des étapes du mécanisme RAFT, en particulier de l'étape de fragmentation du radical intermédiaire. Dans les travaux précédents³⁴, le monomère utilisé était le styrène. Cependant, le radical styrényle étant relativement stabilisé, la structure du radical intermédiaire ne semble pas favorable à sa fragmentation du côté qui conduirait à la synthèse d'un copolymère à blocs poly(NAM-*b*-Sty) (Schéma 10-a). Ainsi, le choix du monomère s'est porté sur l'acrylate de *n*-butyle pour lequel le radical intermédiaire correspondant présente, *a priori*, une fragmentation préférentielle moins marquée (Schéma 10-b). Le degré de cette fragmentation préférentielle aura une influence directe sur la durée de la période d'induction.

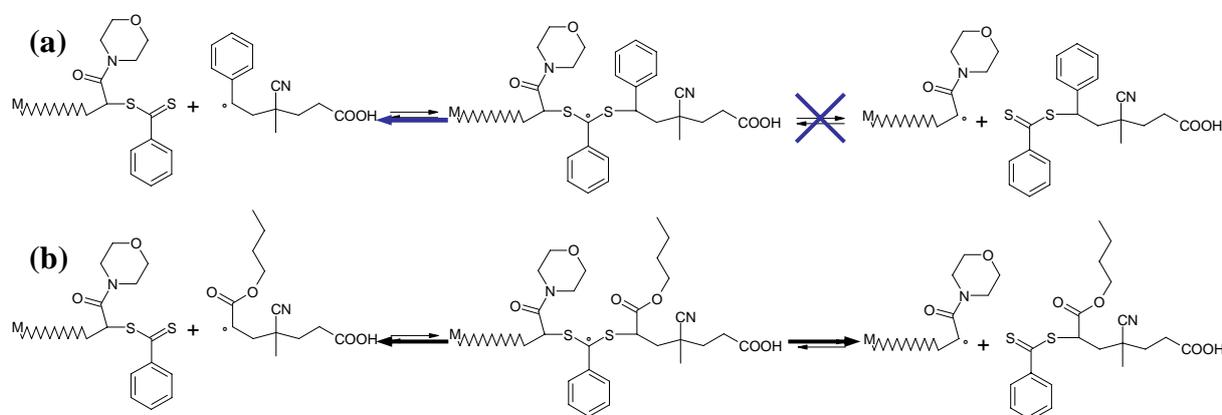


Schéma 10 : Etape d'enchaînement des blocs (sorte de « pré-équilibre ») de la polymérisation RAFT du **styrène (a)** et de l'**acrylate de *n*-butyle (b)** en présence de macro-agent RAFT (chaînes dormantes de polyNAM) [amorçage à l'aide du 4,4'-Azobis(acide 4-cyanopentanoïque)].

La polymérisation en dispersion du styrène est généralement réalisée dans l'éthanol. Le poly(acrylate de *n*-butyle) (polyABu) étant partiellement soluble dans ce solvant (taux de saturation d'environ 6% en masse³⁰), il n'est pas approprié pour la polymérisation de l'acrylate de *n*-butyle en dispersion. Wang *et al.*³⁰ ont montré que l'ajout de 40% volumique d'eau rend sa solubilité négligeable (~0,2% en masse) tout en conservant la miscibilité du

monomère (taux de saturation de 50% en masse^{*}). Le mélange éthanol/eau 60/40 (v/v) a donc été choisi comme solvant de polymérisation.

La nature de l'amorceur et la température utilisées dans l'étude de Wang *et al.*³⁰ ont été conservées : l'amorçage s'effectue par la décomposition du 4,4'-Azobis(acide 4-cyanopentanoïque (ACPA) à 70°C. La constante de décomposition est relativement faible ($2,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ^{**}) ce qui conduit à un amorçage sur toute la durée de la polymérisation ($T_{1/2} \sim 9\text{h}$, $T_{1/10} \sim 30\text{h}$).

- Formulations de référence :

En guise de comparaison, trois polymérisations en dispersion de référence ont préalablement été réalisées (Tableau 6). La première (Réf.1) utilise classiquement 30% de poly(*N*-vinylpyrrolidone) de masse molaire moyenne en masse de 40000g/mol (PVP40000)^{*} et 1% d'amorceur ACPA. Comme la polymérisation en condition RAFT nécessite un ajustement de la quantité d'amorceur, l'effet de la diminution de l'amorceur à 0,18% a ensuite été examiné (Réf.2). De plus, les capacités de transfert intrinsèques des chaînes de polyNAM ont été vérifiées (Réf.3) à l'aide d'un échantillon issu d'une polymérisation radicalaire conventionnelle (PolyNAM conv. $M_n = 54000 \text{ g/mol}$, $I_p = 3,1$).

- Formulation RAFT :

Le stabilisant PVP40000 est remplacé par des chaînes dormantes de polyNAM de masse molaire équivalente (Tableau 6). Dans le cadre de cette étude de faisabilité, des chaînes portant un ligand morpholine en extrémité α ont été utilisées.

La diminution de la quantité d'amorceur permet d'obtenir un rapport initial $[\text{macroATC}]_0/[\text{ACPA}]_0$ égal à 1,2. Celui-ci peut paraître relativement faible en comparaison à la valeur de 10 utilisée dans le chapitre précédent. Cependant, l'ACPA à 70°C se décompose beaucoup plus lentement que l'AIBN à 90°C : alors que pour ce dernier plus de 99% de la quantité initiale est décomposée après 2 heures, seul 15% le sont pour l'ACPA. Le flux initial de radicaux est donc assez faible comparé à la quantité initiale d'agent RAFT ce qui devrait permettre de rester dans de bonnes conditions de contrôle (cf. Figure 17, p.211).

Dans les conditions de l'essai *PI*, la masse molaire « visée » à 100% de conversion est égale à 128000 g/mol ($DP_n = 1000$) si les chaînes amorcées par l'ACPA sont négligées, et égale à 69000 g/mol ($DP_n = 539$) si à l'inverse elle sont prises en compte en supposant une décomposition totale de l'amorceur ($[\text{ABu}]_0/[\text{macroATC}]_0 = 1000$). Ces masses « visées » sont assez importante afin d'obtenir une croissance relativement rapide des chaînes avec la conversion. Ainsi, on peut espérer que toutes les chaînes atteindront leur longueur critique de précipitation sur un intervalle de conversion réduit. Cela devrait permettre une étape de nucléation très courte (si la cinétique est rapide). De plus, en considérant que la longueur critique de précipitation des chaînes de polyABu correspond à un DP_n modeste, en visant des masses molaire élevées, la nucléation devrait se produire à une faible conversion (comme dans une polymérisation en dispersion classique). Le rapport initial $[\text{ABu}]_0/[\text{macroATC}]_0$ est donc un paramètre important pour contrôler la nucléation des particules, toutefois, notre but n'étant pas de synthétiser des copolymères à blocs, la masse molaire finale des chaînes

* ce taux de saturation permettrait de synthétiser des latex avec des taux de solide en polyABu allant en théorie jusqu'à 50%.

** calculé à partir de $k_d = 8,97 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ à 80°C dans l'eau, $E_A = 142,3 \text{ kJ/mol}$ (Masson, J. C. In *Polymer Handbook 3ème ed.*; 3rd ed.; Wiley, Ed.; Brandrup, J. Immergut, E.H., 1989, pp II-1.)

* mode de synthèse : polymérisation conventionnelle.

obtenues est un paramètre secondaire.

Tableau 6 : Conditions de polymérisation de l'acrylate de *n*-butyle en dispersion.

Essai	Stabilisant - M_n (g/mol) (~30 % massique /monomère)	ACPA % massique /monomère
Réf.1	PVP 40000	1
Réf.2	PVP 40000	0,18
Réf.3	PolyNAM conv. 54000	0,18
<i>PI</i>	PolyNAM-DT 38100	0,18

Conditions exp. communes : solvant = éthanol/eau 60/40 (v/v) ; 10% monomère /masse totale ; $T^\circ = 70^\circ\text{C}$.

c) Premiers résultats

Les polymérisations de référence présentent une cinétique relativement rapide : plus de 80% de conversion sont atteints après 24 heures de polymérisation (Figure 15) même lorsque cinq fois moins d'amorceur est utilisé (Réf.2). Le milieu étant initialement limpide et incolore, l'apparition d'un trouble blanc trahit le début de la nucléation des particules qui est très rapide (environ 10 min.). La taille moyenne des particules est supérieure au micromètre et la distribution en taille semble très large (Tableau 7) ; en conséquence, les latex sédimentent relativement vite et de manière non homogène (Tableau 8). La polymérisation Réf.3 indique que les chaînes polyNAM ne possèdent pas intrinsèquement de propriétés transférantes suffisantes pour assurer une stabilisation supérieure à celle fournie par les chaînes de PVP.

Remarque : ces faibles propriétés de transfert des chaînes polyNAM peuvent sembler contraire au phénomène de fragmentation des chaînes polyNAM (qui nécessite une étape de transfert sur la chaîne) mis en évidence dans le chapitre 3 (p.125). Cependant, aucun des paramètres expérimentaux n'est comparable entre les deux cas (température, nature du radical propageant, [monomère], [polymère], solvant, ...).

Dans l'essai *PI* (conditions de polymérisation RAFT), la présence d'une période d'induction (stagnation de la conversion à quelques pourcents) était attendue. Durant cette période, les chaînes dormantes polyNAM deviennent des copolymères polyNAM-*b*-oligoABu (consommation des macro-ATC initiaux) mais la croissance des chaînes est extrêmement limitée. Ainsi, si les chaînes ne peuvent atteindre la longueur critique de précipitation durant la période d'induction, la nucléation des particules n'aura pas lieu. Elle ne pourra avoir lieu qu'après la fin de la période d'induction (augmentation significative de la conversion) c-a-d qu'après que la majorité des chaînes dormantes polyNAM soit convertie en copolymère poly(NAM-*b*-ABu).

Expérimentalement, la limitation de la croissance des chaînes durant la période d'induction semble effectivement efficace pour éviter une nucléation précoce puisque le milieu réactionnel est resté limpide pendant au moins les 5 premières heures de la polymérisation (le milieu réactionnel n'a pas été observé au-delà et ce jusqu'au lendemain). Il semble donc que la nucléation des particules ne se soit effectivement produite qu'après la fin de la période d'induction.

La durée de cette période d'induction (~15 heures)* a cependant été un peu inattendue. Par conséquent, la conversion finale à 24 heures n'est que de 29%.

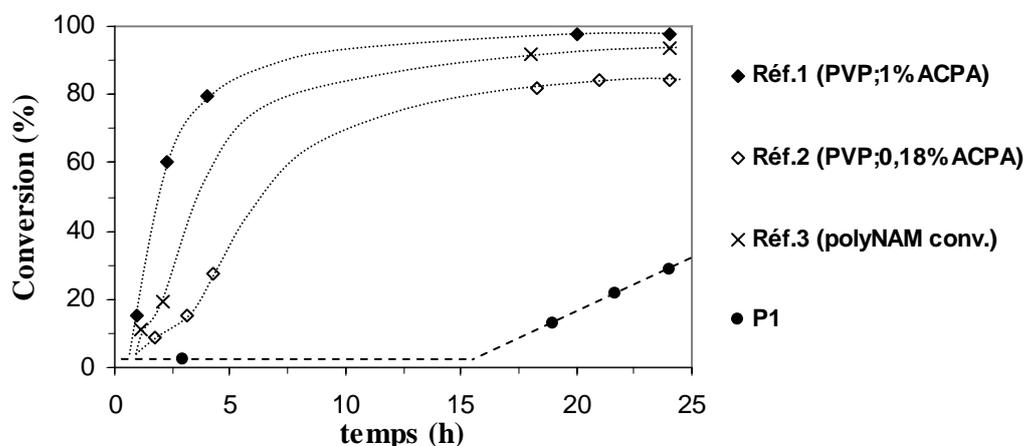


Figure 15 : Cinétiques de polymérisation en dispersion de l'acrylate de *n*-butyle en dispersion.

Tableau 7 : Résultats des polymérisations en dispersion de l'acrylate de *n*-butyle.

Essai	Début de la nucléation	Conversion à 24h	D_z (nm)*	POLY**
Réf.1	~10 min.	98%	1170	1
Réf.2	~11 min.	84%	1680	1
Réf.3	~10 min.	93%	3300	1
<i>PI</i>	<i>non déterminé</i> (Entre 5 et 15 heures)	29%	278	0,06

* D_z = diamètre hydrodynamique moyen

** POLY : paramètre sans dimension indicateur de la largeur de la distribution des diamètres des particules (0 → particules isodisperses ; 1 → particules polydisperses).

Tableau 8 : Photographies des latex après 2 jours de stockage.

Essai	Réf.1	Réf.2	Réf.3	<i>PI</i>
Apparence du latex après 2 jours de stockage (à température ambiante)			Similaire à Réf.2 (Sédimentation encore plus rapide)	

* il reste toutefois encore 30% de l'ACPA initialement introduit.

La constante de vitesse de propagation de l'acrylate de *n*-butyle est plus faible que celle des dérivés de l'acrylamide (deux ordres de grandeur séparent les k_p)³⁶. Le radical propageant correspondant est donc plus stabilisé que celui de la NAM. Ainsi, une fragmentation préférentielle (du côté ABu) du radical intermédiaire polyNAM-S-C°(Ph)-S-Abu (cf. Schéma 10, p.195), même si elle est *a priori* moins marquée qu'avec le styrène, pourrait tout de même conduire à la longue période d'induction observée.

Les caractéristiques du latex obtenu en présence des chaînes dormantes n'ont rien à voir avec celles des latex de référence : la taille moyenne des particules est d'environ 278nm, l'indice POLY égal à 0,06 est faible (particules isodisperses), et l'absence totale de sédimentation ou d'agréation (taille moyenne et indice POLY constants) après plusieurs mois de stockage atteste d'une bonne stabilité du latex.

L'absence de nucléation pendant la période d'induction et l'obtention de particules isodisperses soutiennent l'idée de contrôler la nucléation *via* le contrôle de la polymérisation. De plus, l'objectif d'optimisation de taux de greffage est en bonne voie : l'analyse par RMN ¹H et la pesée du surnageant après centrifugation ne révèle la présence que d'environ 45% du polyNAM initialement introduit. Ce taux de greffage de 55% constitue une nette amélioration en comparaison à la valeur de 15% obtenue dans le cas des chaînes terminées par une fonction thiol.

Cette étude de faisabilité de la synthèse de particules chevelues par polymérisation en dispersion en présence de chaînes dormantes est donc très prometteuse.

d) Remarques complémentaires

- Stabilité du latex :

La stabilité du latex dans le temps est très bonne : après plusieurs mois de stockage à température ambiante les valeurs D_z et POLY n'ont pas changées (à l'incertitude expérimentale près).

De plus, le latex peut être dégazé par des cycles de congélation dans l'azote liquide/vide/décongélation : le latex n'est pas déstabilisé par ce traitement de choc !

- Ré-amorçage du latex chevelu :

Après un ajout d'amorceur (quantité identique à la polymérisation initiale), dégazage puis chauffage à 70°C, le latex précédemment obtenu a été ré-amorcé (Tableau 9) : la conversion finale est de 89% et le diamètre moyen des particules a augmenté d'environ 60-70 nm sans que la distribution en taille n'en soit modifiée (indice POLY toujours faible). Cela indique qu'aucune nucléation secondaire de particules n'a eu lieu, seules les particules déjà existantes ont continué leur croissance. De plus, le taux de greffage déterminé après cette augmentation de conversion a peu évolué (60%). Il semble donc que la plupart des 45% de chaînes polyNAM n'ayant pas participé à la stabilisation lors de la polymérisation initiale ne permettent plus la formation de copolymères à blocs. L'hydrolyse des extrémités de ces chaînes sous forme de fonction thiol est très probable (le latex ayant été ré-amorcé après 3 semaines de stockage)*. Par réaction de transfert sur ces extrémités thiol, la possibilité de

* l'analyse par RMN ¹H des chaînes présentes en phase continue a été réalisée, mais leur masse molaire relativement importante (38100 g/mol) empêche la visualisation des extrémités de chaîne.

former des copolymères à blocs n'est pas exclue, cependant la probabilité de transfert est considérablement réduite du fait de la forte probabilité de capture par les particules des oligo-radicaux générés en phase continue (à cause de la très grande surface développée par les particules).

Tableau 9 : Ré-amorçage du latex obtenu en présence de chaînes dormantes.

Essais	Temps (h)	Conversion (%)	D_z (nm)	POLY	Taux de greffage ^{***}
<i>PI</i>	24	29	278	0,06	~55%
<i>PI</i> ré-amorcé*	0 ^{**}	-	293	0,05	-
	24	89	355	0,06	~60%

* Quantité d'amorceur identique à *PI*.

** Après 4 cycles de dégazage (congélation/vide/décongélation)

*** Proportion de chaînes polyNAM greffées sur les particules par rapport à la quantité de chaînes initialement introduites dans la formulation (cf. partie exp., p.217)

- Centrifugation et re-dispersion dans l'eau du latex chevelu :

La température de transition vitreuse du polyABu étant faible ($T_g \sim -50^\circ\text{C}$ ³⁷), les étapes de caractérisation nécessitant une centrifugation du latex ne sont pas aisées. Les particules du culot coalescent et le latex est irréversiblement détruit. Or, cela n'est pas le cas pour les latex chevelus *PI* et *PI* ré-amorcé : malgré une centrifugation à vitesse maximale*, le culot a été facilement re-dispersé dans l'eau par simple agitation manuelle. Cependant, la distribution des tailles est désormais bi-modale (Tableau 10), ce qui semble indiquer l'agrégation d'un nombre limité de particules.

Tableau 10 : Evolution de la taille des particules après centrifugation.

Latex	Avant centrifugation*			Après centrifugation*				
		(latex dans EtOH/H ₂ O 60/40 v/v)			(culot re-dispersé dans l'eau)			
		Diamètre moy. (nm)	Largeur (nm)	% de la population		Diamètre moy. (nm)	Largeur (nm)	% de la population
<i>PI</i>	1	262	106	100	1	120	73	93
					2	457	239	7
<i>PI</i> ré-amorcé	1	385	106	100	1	180	110	60
					2	445	220	40

* : analyse en mode multimodal (analyse des pics en nombre)

Remarque : la taille moyenne des particules re-dispersées dans l'eau est significativement plus faible que celui du latex initial synthétisé dans un mélange éthanol/eau (Tableau 10 : population 1 et Tableau 11). Pourtant, le polyNAM étant plus soluble dans l'eau que dans l'éthanol*, la chevelure devrait être plus déployée après ce changement de phase continue. La diminution de taille moyenne a donc été attribuée à un gonflement par l'éthanol du cœur de polyABu des particules.

* 26000 tr/min (soit 57440G avec le rotor utilisé)

* il a été observé que la dissolution du polyNAM est bien plus rapide dans l'eau que dans l'éthanol.

- Concentration du latex chevelu :

Cette excellente stabilité (par rapport à des particules non chevelues de polyABu) peut aussi être mise à profit pour une forte concentration des latex chevelus : la mince couche de polymère formée après évaporation du solvant à 50°C (à l'aide d'un évaporateur rotatif) reste étonnamment re-dispersable dans l'eau par simple agitation manuelle. La distribution des tailles des particules semble rester mono-modale même si la valeur de l'indice POLY augmente (Tableau 11). Malgré la faible température de transition vitreuse du polyABu, l'évaporation du solvant n'a pas conduit à la formation d'un film de latex : la mince couche de polymère observée ne serait donc qu'un agencement des particules en empilement (plus ou moins compact) dans lequel chacune garde son intégrité. La chevelure de polyNAM (polymère « dur », $T_g \sim 147^\circ\text{C}$)³⁸ en périphérie des particules semble donc suffisamment dense pour éviter (ou du moins fortement limiter) leur coalescence (par effet osmotique et/ou effet élastique).

Tableau 11 : Evolution de la taille des particules après concentration (« filmification » apparente)

Latex	Avant concentration*		Après concentration*	
	(latex dans EtOH/H ₂ O 60/40 v/v)		(« film » re-dispersé dans l'eau)	
	D_z (nm)	POLY	D_z (nm)	POLY
<i>PI</i>	281	0,07	131	0,10
<i>PI</i> ré-amorcé	355	0,06	206	0,16

* : analyse en mode mono-modal ; l'analyse en mode multimodal n'indique la présence que d'une seule population de particules.

- Estimation du nombre de cheveux par particule

Connaissant le taux de greffage des chaînes polyNAM (et la concentration initiale en chaînes), la détermination du nombre N_p de particules formées permet de calculer le nombre de cheveux par particule. En supposant qu'après re-dispersion dans l'eau, le cœur de polyABu n'est plus gonflé par le solvant, le nombre de particule formé N_p est calculé par l'équation suivante :

$$N_p = \frac{6 \cdot [\text{ABu}] \cdot M_{\text{ABu}} \cdot \text{Conversion.}}{\pi \cdot D_{\text{cœur}}^3 \cdot \rho_{\text{polyABu}}}$$

où [ABu] et M_{ABu} sont respectivement la concentration initiale et la masse molaire de l'acrylate de *n*-butyle.

ρ_{polyABu} est la masse volumique du poly(acrylate de *n*-butyle) (1,026 g.cm⁻³)³⁹.

$D_{\text{cœur}}$ est le diamètre du cœur de poly(acrylate de *n*-butyle) des particules.

Remarque : ce calcul suppose également que les quantités de polyNAM éventuellement enterrées dans le cœur et de polyABu présent en phase continue sont négligeables.

La mesure du diamètre hydrodynamique moyen, D_z , par diffusion quasi-élastique de la lumière donne le diamètre de l'ensemble de la particule (cœur + chevelure). Le diamètre du cœur n'est donc pas connu, cependant, deux calculs *limites* du nombre de particules peuvent être effectués à partir de la valeur expérimentale du diamètre hydrodynamique moyen déterminée pour le latex *PI* ré-amorcé:

- *Hyp.1* : longueur de la chevelure négligeable (\rightarrow diamètre du cœur = $D_z = 206$ nm) : $N_p = 1,69 \cdot 10^{16}$ particules par litre de latex. Le calcul donne environ 14900 cheveux par particule. En supposant que ces cheveux sont répartis de manière homogène sur la surface du cœur, la distance moyenne entre deux cheveux est d'environ 3,0 nm ($9,0 \text{ nm}^2$ par cheveu).
- *Hyp. 2* : chaînes de la chevelure totalement déployées (déploiement total d'une chaîne polyNAM de masse molaire égale à 38100 g/mol = 67nm \rightarrow diamètre du cœur = $206 - 2 \times 67 = 72$ nm) : $N_p = 3,95 \cdot 10^{17}$ particules par litre de latex. D'où environ 640 cheveux par particule soit une distance moyenne entre deux cheveux d'environ 5,1 nm ($25,6 \text{ nm}^2$ par cheveu).
Cette deuxième hypothèse n'est pas réaliste mais donne seulement la valeur minimale du nombre de cheveux par particule.

Ces deux calculs semblent indiquer qu'une chaîne polyNAM est ancrée sur la surface du cœur des particules environ tous les 4 nm. Cette valeur confirmerait la forte densité de la chevelure en périphérie des particules.

- Caractérisation par microscopie:

La caractérisation de particules cœur-écorce est généralement effectuée par microscopie électronique à transmission (MET) : si la différence de contraste est suffisante, le diamètre du cœur ainsi que l'épaisseur de l'écorce peuvent être estimés à partir des clichés. Cependant, la technique de MET à température ambiante n'est généralement pas appropriée à l'étude des latex de polyABu : non seulement les particules coalescent rapidement sous l'effet de la température du dispositif mais en plus la densité électronique du polyABu est trop faible pour pouvoir le visualiser*. Ainsi, rien n'est visible sur les clichés de MET de latex de polyABu (sans coloration, c'est tout blanc !). Malgré cela, en raison de l'absence de filmification des latex chevelus, des clichés de MET ont tout de même été réalisés.

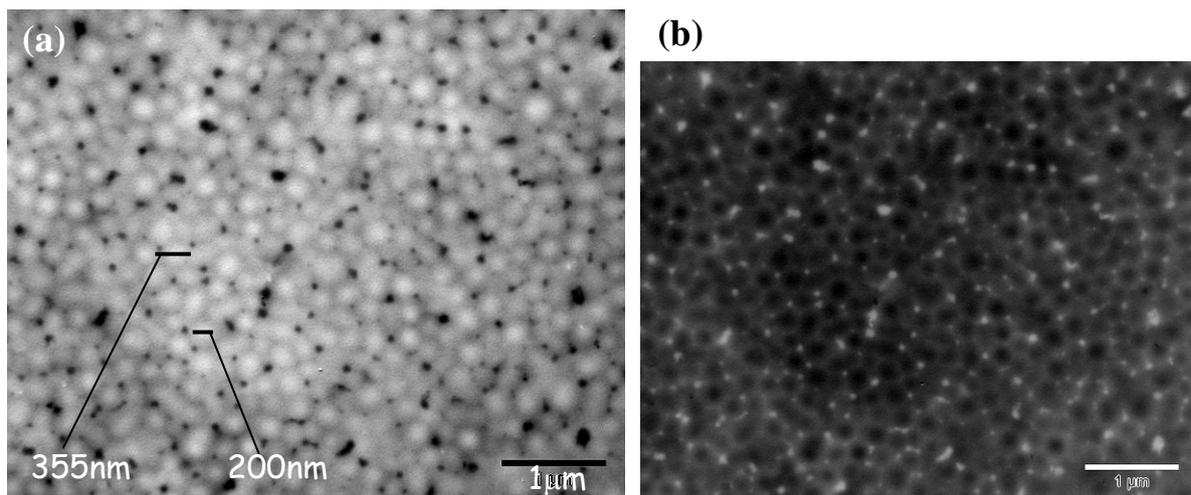


Figure 16 : Cliché de MET du latex brut *PI* ré-amorcé (a) ; même cliché en couleur négative (b)
(conversion = 89% ; $D_z = 355$ nm, POLY = 0,06)

* Des procédés de coloration peuvent cependant être utilisés, mais cela n'a pas été envisagé ici.

Comme attendu en raison du faible contraste, des particules isolées ne sont pas identifiables. Cependant, une vision d'ensemble permet d'identifier les particules blanches collées les unes aux autres et séparées par des contours à plus fort contraste (chevelure polyNAM) (Figure 16-a). L'inversion des couleurs rend ces particules plus discernables (Figure 16-b) sans pour autant rendre le cliché plus exploitable pour une mesure de diamètre moyen (D_n , D_w) et d'indice de polydispersité (D_w/D_n). Cependant, l'ordre de grandeur de la taille des particules est en accord avec le diamètre hydrodynamique moyen D_z déterminé par diffusion quasi-élastique de la lumière (DQEL). De plus les particules visibles sur le cliché semblent relativement isodisperses. Là encore, la coalescence des particules est empêchée par la présence de la chevelure dense de polyNAM.

e) Influence de la longueur de chaîne polyNAM et hydrolyse compétitive

Dans le but initial d'évaluer l'influence de la longueur des « cheveux » sur la taille des particules obtenues et sur leur stabilité colloïdale, des chaînes dormantes polyNAM de masse molaire différente ont été utilisées (38100 g/mol ; 23700 g/mol ; 3900 g/mol). Le pourcentage molaire en chaîne a été fixé à 0,1% par rapport au monomère ; par conséquent, le pourcentage massique diminue avec la masse molaire moyenne en nombre (Tableau 12). Les trois essais (P1, P4 et P6) présentent tous une longue période d'induction (~15h). Les conversions déterminées après environ 24 heures de polymérisation sont relativement proches. Cependant, les distributions en taille des particules ne sont pas identiques pour les trois essais : isodisperse pour P1, légèrement bi-populée pour P4, significativement bi-populée pour P6 (Tableau 12).

Tableau 12 : Conditions expérimentales et résultats comparés des essais de polymérisation P1, P4 et P6.

Essai	Stabilisant *		Temps (h)	Conversion (%)	DQEL			
	M_n (g/mol)	% massique**			Analyse multimodale en nombre			
					Diamètre moy. (nm)	Largeur (nm)	% de la population	
P1	38100	30	24	29	1	262	106	100
P4	23700	18,5	27	20	1	140	69	94
					2	375	144	6
P6	3900	3	24	18	1	203	45	38
					2	414	80	62

* Chaînes dormantes de polyNAM 0,1 % molaire /monomère ; ** % par rapport au monomère
Conditions exp. communes : solvant = éthanol/eau 60/40 (v/v) ; 10% monomère /masse totale ;
T° = 70°C ; ACPA : 0,18% massique/monomère.

Alors qu'il était initialement rosé, la couleur jaune du milieu réactionnel de l'essai P6 dès 3 heures de polymérisation met en évidence que le phénomène d'hydrolyse des fonctions dithioesters des chaînes dormantes ne semble pas négligeable. Cela peut éventuellement influencer la distribution en taille des particules finales.

Les valeurs des largeurs de distribution semblent indiquer que les deux populations de particules seraient isodisperses*. L'hydrolyse des chaînes dormantes est d'autant plus rapide que leur masse molaire est faible (cf. chapitre3, p.147). Or, c'est avec l'essai P6 que la

* Les valeurs des largeurs de distribution données par le mode multimodal pour des latex *a priori* isodisperses (POLY entre 0,03 et 0,06, déterminée en mode monomodal) sont inférieures à 110 nm.

distribution est significativement bi-populée. Ainsi, l'hydrolyse d'une partie des chaînes dormantes semble rendre possible la nucléation de particules plus grosses ; celles-ci se formant peut-être à partir des chaînes portant une extrémité thiol. Il est donc possible qu'il y ait deux processus de nucléation distincts qui se produisent l'un après l'autre.

Il serait alors très intéressant de mesurer la taille des particules obtenues par polymérisation en dispersion en présence de chaînes polyNAM préalablement hydrolysées afin de la comparer à la taille moyenne de la deuxième population de particules.

Malgré cet effet néfaste sur la distribution des tailles des particules, comme les périodes d'induction sont similaires pour les trois essais, l'hydrolyse relativement plus rapide d'une partie des chaînes dormantes dans le cas de l'essai P6 (par rapport à P1 et P4) ne semble pas perturber fortement l'étape d'enchaînement des blocs (cf. Schéma 10, p.195) (sorte de pré-équilibre RAFT).

Le phénomène d'hydrolyse est peut-être l'une des causes d'un taux de greffage plus faible que celui espéré. Cependant, il ne peut être la seule cause puisque le taux de greffage du latex P4 (égal à environ 65%) est supérieur à celui du latex P1 (~55%). D'autres essais utilisant des chaînes de masse molaire d'environ 40000 g/mol (P2 et P3, cf. § III-3.g), p.207) présentent des taux de greffage encore plus élevés (respectivement ~70% et ~65%). Contrairement à P1, les latex correspondants sont bi-populés (cf. § III-3.g) : la façon dont sont formées les particules semble donc avoir une influence non négligeable sur les taux de greffage. Cependant, considérant les 20% d'écart entre le taux maximal observé (70%) et le taux maximal attendu (91%), cet écart pourrait en partie être imputé au phénomène d'hydrolyse.

Remarque : le taux de greffage pour le latex P6 n'a pas (encore) été déterminé.

Le choix d'un autre monomère nécessitant un solvant de polymérisation en dispersion 100% organique devrait permettre de s'affranchir de ce problème d'hydrolyse compétitive. Le styrène a été initialement écarté à cause de la fragmentation *a priori* non favorable du radical intermédiaire formé à partir des chaînes dormantes de polyNAM. Son utilisation devrait induire une période d'induction encore plus longue que celle observée avec l'acrylate de *n*-butyle. Cependant, si la nucléation est évitée pendant cette période, la polymérisation en dispersion du styrène devrait aussi conduire à des particules semblables à celles déjà obtenues. La valeur du taux de greffage dans ce cas permettrait alors de confirmer (et de quantifier) l'influence suspectée de l'hydrolyse sur le taux de greffage.

A cause de ce phénomène « parasite » d'hydrolyse, l'étude de l'influence de la longueur des « cheveux » sur la taille des particules obtenues et sur leur stabilité colloïdale n'est pas concluante.

f) Synthèse de particules à chevelure contrôlée et fonctionnalisée en extrémité par un sucre

Compte tenu des résultats très encourageants obtenus avec les chaînes modèles polyNAM-Morpholine, des particules chevelues présentant des sucres à leur périphérie ont été envisagées. Pour cela, cheveux préformés de polyNAM-Sucre ont été utilisés ($M_n = 29600$ g/mol ; $I_p = 1,02$). L'essai correspondant, P7, a été réalisé dans les mêmes conditions que l'essai P1. A l'inverse des situations rencontrées jusqu'ici, la nucléation est relativement précoce (~3h). Par conséquent, la conversion après 27h de polymérisation est plus importante que pour l'essai P1 (Tableau 13). La valeur de l'indice POLY égal à 0,20 semble indiquer que les particules formées ne sont pas isodisperses.

Remarque : Au-delà de 0,15, la valeur de l'indice POLY n'a plus forcément de signification physique⁴. Ainsi, aucune comparaison ne peut se faire entre des indices POLY supérieurs à cette valeur.

Tableau 13 : Comparaison des résultats de l'essai P7 (polyNAM-sucre) avec ceux des essais P1.

Essai	M_n stab. (g/mol)	Nucléation	Temps (h)	Conversion (%)	D_z (nm)	POLY	% greffage		
P1	38100	~15h	24	29	218	0,07	55		
P7	29600	~3h	27	51	197	0,20**	-		
			<i>Ajout ACPA* dans milieu de polymérisation</i>						
			50	91	248	0,14**	-		
			<i>Après redispersion dans l'eau</i>						
			-	-	148	0,14**	-		

* Même quantité qu'initialement.

** L'analyse en mode multimodal n'indique qu'une seule population de particule.

Conditions exp. communes : solvant = éthanol/eau 60/40 (v/v) ; 10% monomère /masse totale ;

$T^\circ = 70^\circ\text{C}$; ACPA : 0,18% massique/monomère.

Chaînes dormantes de polyNAM : 0,1 % molaire /monomère

Sans arrêter la polymérisation (contrairement à P1 ré-amorcé), un ajout d'amorceur après 27 heures de polymérisation (12% d'ACPA résiduel) a permis d'assurer la croissance des particules jusqu'à 248 nm (de diamètre), correspondant à une conversion de 91%. Ce latex obtenu en présence de chaînes polyNAM-Sucre est aussi stable que ceux obtenus avec les chaînes polyNAM-Morpholine. Comme précédemment, après centrifugation et re-dispersion du culot dans l'eau, une nette diminution de la taille moyenne est mesurée.

Le déploiement total des chaînes polyNAM de masse molaire égale à 29600 g/mol induirait une épaisseur de chevelure de 52 nm. Cependant, comme ces chaînes ne sont pas ionisées (pas de répulsion électrostatique), elles seraient plutôt sous la forme de pelotes statistiques probablement enchevêtrées. Ainsi, l'épaisseur de la chevelure est sûrement bien plus faible que 52 nm*.

* D'après M. Graillat (Ingénieur d'étude au LCPPP), l'épaisseur de cette chevelure pourrait être aux alentours des 10-20nm.

Afin d'avoir une vision approximative de la structure des particules chevelues apparemment obtenues ($D_z \sim 150$ nm), prenons une épaisseur probable de chevelure de 15 nm (\rightarrow diamètre du cœur ~ 120 nm) et supposons un taux de greffage de 50% (valeur minimale obtenue avec les essais précédents) : dans ce cas, $8,73 \cdot 10^{16}$ particules (par litre de latex) seraient formées et il y aurait en moyenne 2400 chaînes polyNAM-Sucre par particule. La densité des cheveux serait alors effectivement importante : le rapport de la surface du cœur de la particule sur le nombre de cheveux par particule donne $18,9 \text{ nm}^2$ par cheveu. En supposant une répartition homogène, la distance moyenne entre les cheveux au niveau de la surface du cœur serait d'environ 4,3 nm. De ce fait, la périphérie des particules serait littéralement tapissée de sucres : le rapport de la « surface » de la particule entière (cœur + chevelure) sur le nombre de cheveux par particule donne $28,7 \text{ nm}^2$ par chaîne (donc par sucre) ; cela correspondrait à une distance moyenne entre les sucres d'environ 5,4 nm (Schéma 11).

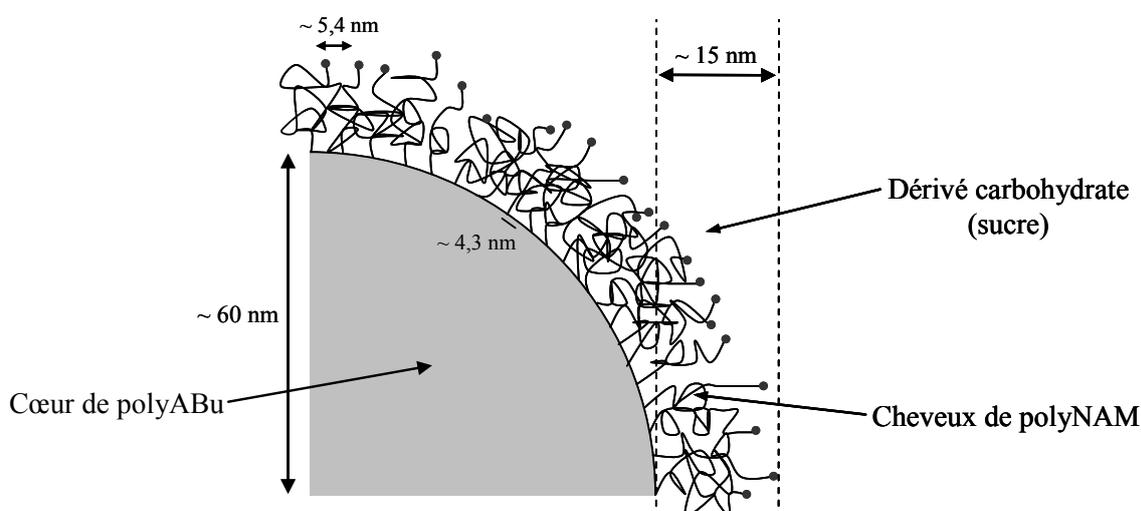


Schéma 11 : Représentation schématique d'un quart de coupe centrale de particule chevelue obtenue (hypothèse : épaisseur de la chevelure = 15 nm)

(22 cheveux sur le quart de coupe centrale correspondant à 2400 cheveux sur l'ensemble de la particule)

Remarque : dans le cas limite d'une longueur de chevelure de 52 nm, la valeur de la distance moyenne entre les sucres est de 7,2 nm (valeur maximale).

En utilisant des techniques de coloration adaptées, il serait peut-être possible de déterminer avec précision par MET un diamètre moyen du cœur des particules. Cela permettrait d'affiner cette représentation schématique des particules chevelues. De plus, celle-ci n'est valable que si les sucres se trouvent effectivement en périphérie de la chevelure. Il est en effet peut-être possible qu'une partie de ces sucres soient « enterrés » à l'intérieur du cœur de polyABu (dérivés carbohydrates protégés, hydrophobes). Il serait alors très intéressant de vérifier la présence et la localisation de ces sucres *via* des analyses par RMN ^1H du latex obtenu : dans les conditions d'analyses adéquates, le spectre ne devrait présenter que les résonances correspondant aux espèces « en solution » dans l'eau c'est-à-dire, dans notre cas, que les résonances des protons de la chevelure fonctionnalisée.

A terme, après une étape de déprotection des sucres, des essais biologiques sont également envisageables afin d'estimer la disponibilité des sucres de la chevelure vis-à-vis des processus de reconnaissance spécifique de lectines appropriées.

g) Nucléation tardive \Rightarrow Particules monodisperses ?

Dans les cas où le phénomène d'hydrolyse des chaînes dormantes n'a peu (voire pas) d'effet sur la distribution des tailles des particules ($M_n > 20000$ g/mol), une série d'essais complémentaires semble dévoiler un lien entre une nucléation tardive (après une très longue période d'induction) et l'obtention d'une seule population de particules, isodisperses. En effet, dans tous les essais où une nucléation précoce (<2h) a été observée (trouble du milieu de polymérisation), le latex *final* est systématiquement composé de deux populations de particules (Tableau 15).^{*} Les conditions de ces essais sont résumées dans le tableau suivant (Tableau 14) :

Tableau 14 : Conditions de polymérisation en dispersion des essais P1 à P5.

Essai	M_n Stabilisant* (g/mol) [Ip]	Amorceur	% molaire Amorceur (/monomère)
P1	38100 [1,06]	ACPA	0,085
P2	44500 [1,05]	ACPA	0,085
P3	44500 [1,05]	V65/ACPA 40/60**	0,085
P4	23700 [1,03]	ACPA	0,085
P5	23700 [1,03]	ACPA	0,457

* Chaînes dormantes de polyNAM-morpholine : 0,1 % molaire /monomère

** Rapport molaire [V65 = 2,2'-Azobis(2,4-diméthylvaléronirile)] (mélange V56/ACPA utilisé à t=0)

Conditions exp. communes : solvant = éthanol/eau 60/40 (v/v) ; 10% monomère /masse totale ;

T° = 70°C ; Chaînes dormantes de polyNAM : 0,1 % molaire /monomère

La nucléation des particules dans l'essai P1 ne se produit qu'après une très longue période d'induction et le latex correspondant ne contient qu'une unique population de particules isodisperses. Il en est de même pour l'essai P4 réalisé dans les mêmes conditions mais avec des chaînes polyNAM de masse molaire inférieure : même si l'analyse par DQEL en mode multimodal indique la présence de deux populations (*a priori* isodisperses), l'une est largement minoritaire (seulement 5% en nombre de particules). [Cette différence provient vraisemblablement du phénomène d'hydrolyse des chaînes dormantes plus important dans l'essai P4 que dans l'essai P1 (cf. §III-3.e)]

La nucléation des particules est relativement précoce (1 à 2 heures) pour les autres essais (P2, P3 et P5) et ils présentent tous une bi-population de particules. D'après les largeurs des distributions, ces deux populations semblent relativement isodisperses et de plus, n'apparaissant pas toujours dès le début de la nucléation (essai P3, seules les grosses particules sont présentes). Ces deux éléments plaident en faveur d'un processus de nucléation secondaire.

* sauf pour l'essai P7 (polyNAM-sucre) pour lequel la distribution des tailles semble monomodale MAIS elle est large (indice POLY élevé).

Tableau 15 : Résultats comparés des essais P1 à P5.

Essai	Longue période d'induction	Temps (h)	Conversion (%)	DQEL			
				Analyse multimodale en nombre			% de la population
				Diamètre moy. (nm)	Largeur (nm)		
P1	OUI (~15h)	19	13	1	211	143	100
		24	29	1	262	106	100
P2	Non (début de nucléation ~1h15)	1h30	12	1	236	97	49
				2	466	217	51
		27	80	1	155	32	77
				2	400	96	23
P3	Non (début de nucléation ~2h)	2	13	1	432	229	100
		6	17	1	445	198	100
		25	71	1	198	103	70
				2	396	138	30
P4	OUI (~15h)	21	10	1	130	63	97
				2	387	184	3
		27	20	1	140	69	94
				2	375	144	6
P5	Non (début de nucléation ~1h)	2	9	1	210	70	36
				2	490	367	64
		24	96	1	209	114	62
				2	372	156	38

Il a également été observé dans les essais P2, P3 et P5, qu'après la nucléation, la conversion augmente relativement rapidement (~10% de conversion pour les prélèvements effectués juste après le trouble). La polymérisation n'est donc plus *a priori* dans la période d'induction. Cependant, la période d'induction est une caractéristique de la polymérisation de type RAFT, alors que la nucléation est une étape de la polymérisation en dispersion. Relier la nucléation à la fin de la période d'induction, comme cela semble le cas, ne va donc pas de soi.

En réalité, après la nucléation des particules, il y a deux sites de polymérisation dans le procédé en dispersion : la phase continue et les particules. Les fonctions dithioester, présentes dans ces dernières, proviennent de la capture de chaînes dormantes de copolymères à blocs dont le bloc de polyABu est suffisamment long pour précipiter. La polymérisation RAFT mise en jeu dans les particules est donc comparable à un essai d'extension de chaîne pour lequel il n'y a pas de période d'induction (car la polymérisation commence directement avec l'équilibre principal sans passer par l'étape d'enchaînement des blocs). Il est donc normal que la conversion augmente après la nucléation mais cela n'est donc pas comparable avec une polymérisation RAFT en milieu homogène (solution ou en masse) pour laquelle la fin de la période d'induction correspond à une consommation significative de l'ATC initial (chaînes dormantes de polyNAM dans notre cas).

Avant la nucléation, la polymérisation en dispersion est, toutefois, similaire à une polymérisation en solution (milieu homogène). D'après la très longue période d'induction (sans nucléation) de l'essai P1, la consommation du macro-ATC initial (c'est-à-dire la conversion des chaînes dormantes de polyNAM en chaînes dormantes de copolymères

« polyNAM-*b*-ABu ») semble très lente. Ainsi, quelles que soient les raisons qui conduisent à une nucléation précoce, celle-ci se produirait alors que seule une fraction des chaînes polyNAM serait convertie en chaînes de copolymères. Cette *supposée* faible quantité de copolymère stabilisant au moment d'une nucléation précoce est en accord avec la formation dans un premier temps de grosses particules (qui semblent polydisperses) dans l'essai P3.

La nucléation précoce mobiliserait toutes les chaînes de copolymères dont le bloc polyABu serait suffisamment long pour précipiter (ou pour s'adsorber sur les particules fraîchement formées), et laisserait dans la phase continue les chaînes polyNAM initiales et les chaînes copolymères possédant un bloc hydrophobe trop court. Ainsi, deux cas limites peuvent être imaginés.

Hypothèses proposées :

✓ *1^{er} cas, correspondant aux résultats de l'essai P3* (c-a-d : formation de grosses particules polydisperses lors de la nucléation précoce, puis (au moins 5 heures après) nucléation secondaire de particules plus petites et isodisperses) :

Après la nucléation précoce, il resterait suffisamment de chaînes dormantes en phase continue pour que la polymérisation y soit contrôlée : la période d'induction pourrait alors perdurer dans la phase continue (alors que la conversion « globale » augmenterait grâce à la consommation du monomère dans les particules). La capture des oligoradicaux ABu par les particules pourrait limiter le nombre de radicaux s'additionnant sur les chaînes dormantes dans la phase continue ; cela pourrait faire en sorte de ralentir d'avantage la consommation des chaînes dormantes polyNAM. Durant cette étape, la conversion stagne dans la phase continue et la croissance de toutes les chaînes polyABu (homopolymères ou bloc de copolymères) y est donc extrêmement lente. Après la consommation significative des chaînes dormantes polyNAM (qui prend un certain temps), la phase continue pourrait sortir de « sa » période d'induction : les blocs polyABu croissent, et par conséquent, une quantité significative de copolymères à blocs dont la longueur est suffisante pour précipiter se formerait. Une nucléation secondaire se produirait alors formant des petites particules isodisperses (similaires à celle de l'essai P1).

✓ *2^{ème} cas, correspondant aux résultats de l'essai P2 et/ou P5* (c-a-d : formation de deux populations de particules (petites particules isodisperses et grosses particules polydisperses) peu après la nucléation précoce*) :

Après la nucléation précoce, il resterait peu de chaînes dormantes en phase continue : cela impliquerait que l'étape de nucléation précoce ait mobilisé une proportion élevée des chaînes dormantes ; la population des petites particules isodisperses se formerait alors en premier. Dans la phase continue, le rapport [macro-ATC]/[amorceur] serait désormais très faible. La polymérisation ne serait alors pas contrôlée ; Elle se rapprocherait plutôt d'une polymérisation radicalaire conventionnelle dans laquelle le reste de chaînes dormantes polyNAM encore présentes en phase continue seraient rapidement converties en copolymère à blocs stabilisant. Un début de nucléation secondaire pourrait alors se produire juste après la première nucléation.

* exemple de l'essai P2 : 15 minutes après le début de la nucléation, deux populations de particules sont déjà présentes. Le processus de nucléation semble donc différent de celui de l'essai P3 pour lequel une unique population de (grosses) particules est créée dans un premier temps (les petites particules se formant bien plus tard).

En complément de ces deux cas limites, des situations intermédiaires peuvent également être envisagées : la polymérisation en phase continue est plus ou moins contrôlée après la nucléation précoce et par conséquent des chaînes copolymères à blocs se forment plus ou moins progressivement au cours de la polymérisation.

L'essai P4 comparé à P5 confirme l'intérêt de diminuer la quantité d'amorceur par rapport à une formulation classique de dispersion : l'utilisation de 1% massique d'amorceur (P5 ; 0,457% molaire) conduit rapidement à un latex bi-populé alors que cela n'est pas le cas pour l'essai P4 (0,085% molaire) (seconde population très minoritaire, Tableau 15).

L'essai P2 est similaire à l'essai *PI* (seul le lot de polyNAM est différent). La raison d'une nucléation précoce dans ce cas est inconnue (cf. §h) ci-dessous) mais cet essai semble confirmer qu'une nucléation précoce favorise la formation d'une double population de particules.

h) Discussion sur une cause possible de la nucléation précoce

L'idée initiale lors de la conception de la formulation de la polymérisation en dispersion en présence de chaînes dormantes était de se trouver dans des conditions de polymérisation très bien contrôlée afin d'assurer une croissance homogène des chaînes, dans le but de maîtriser l'étape de nucléation. Pour cela, la quantité d'amorceur utilisée a été réduite (cinq fois moins) par rapport aux quantités habituellement utilisées en polymérisation en dispersion. L'essai *PI* semble valider cette possibilité de contrôle de la nucléation qui ne se produit qu'après la conversion d'un grand nombre de chaînes dormantes initiales en chaînes copolymères stabilisantes (ce qui n'arrive qu'en fin de période d'induction).

Cependant, une nucléation précoce a été observée lors des essais P2 et P7 alors que leurs conditions expérimentales sont très proches de celle de l'essai *PI*. Cela révèle des problèmes de reproductibilité qui sont peut-être dus à la proximité de nos conditions expérimentales avec des conditions limites ne permettant pas de contrôler la nucléation : le rapport $[ABu]_0/[macro-ATC]_0$ étant élevé (=1000), les chaînes polyABu pourraient atteindre la longueur critique de précipitation à une trop faible conversion c-a-d à une conversion trop proche (par ex. 5%) de celle qui est déjà atteinte durant la période d'induction (~3%).

De plus, il est admis qu'en tout début de polymérisation RAFT, la distribution des masses molaires est relativement large puis s'affine à conversion moyenne. Or, *dans le cas de conditions limites*, un contrôle très strict des masses molaires (c-a-d une distribution très étroite) semble nécessaire dès le début de la période d'induction afin qu'aucune chaîne n'atteigne la longueur critique avant les autres. Si le contrôle de la polymérisation est moins bon (c-a-d une distribution des masses molaires un peu plus large), il est alors possible qu'une partie des chaînes atteigne la longueur critique de précipitation durant la période d'induction. Dans ce cas, il y aurait une nucléation précoce.

La quantité de chacun des constituants de la formulation peut avoir une influence sur le contrôle de la nucléation : le rapport $[macro-ATC]/[ACPA]$ règle le contrôle de la croissance des chaînes, le rapport $[ABu]/[macro-ATC]$ règle leur vitesse de croissance, le rapport volumique éthanol/eau règle la longueur critique de précipitation des chaînes. A partir de conditions limites, une petite modification d'un des paramètres pourrait être fatal au déroulement souhaité de la polymérisation en dispersion. Ainsi, les erreurs expérimentales

cumulées (voire peut-être une erreur plus grossière de l'expérimentateur!*) lors de la préparation des essais ont peut-être fait franchir la limite de reproductibilité.

Ces conditions expérimentales limites qui nécessitent un contrôle très strict de la croissance de toutes les chaînes peuvent également expliquer l'échec de l'essai P3. Celui-ci avait été tenté dans l'espoir de réduire la période d'induction tout en restant dans des conditions de contrôle de la polymérisation qui empêcheraient une nucléation dans la période d'induction. Ainsi, la quantité globale d'amorceur est choisie identique à celle de l'essai P1 (pour garder le contrôle), mais 40% d'ACPA est remplacé par un amorceur qui se décompose très rapidement (le V65, $T_{1/2} \sim 50\text{min}$, cf. Tableau 1, p.177) afin d'obtenir un flux de radicaux initial plus important (pour diminuer la période d'induction) : ce flux initial de radicaux est alors 4,5 fois plus élevé que celui correspondant à un amorçage ACPA seul, avant de retomber à un flux similaire (pour faire croître les particules) après environ 3 heures de polymérisation (Figure 17). Avec un tel flux initial de radicaux, la distribution des masses molaires durant la période d'induction a de fortes chances d'être plus large que celle de l'essai P1. Ainsi, toujours selon l'hypothèse des conditions limites, la nucléation précoce dans l'essai P3 n'est pas une surprise.

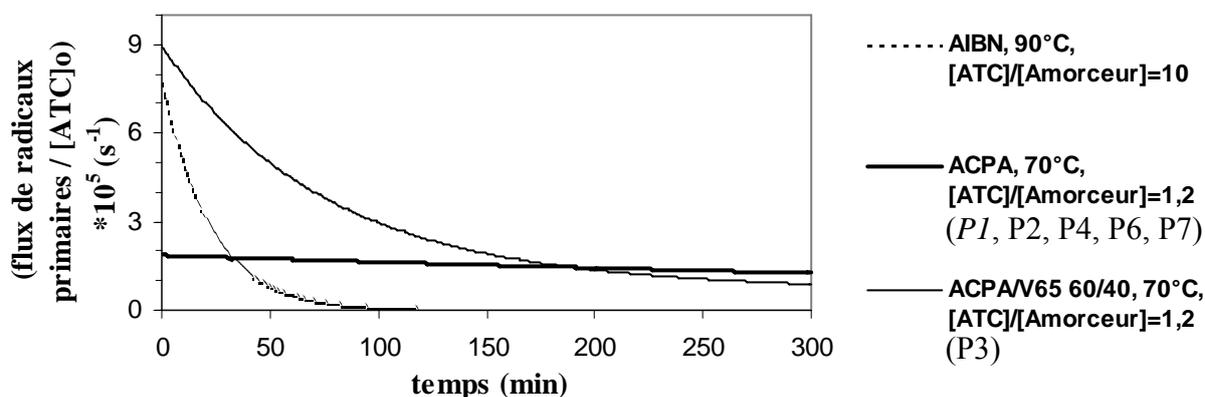


Figure 17 : Comparaison des Flux de radicaux primaires rapportés à la concentration en ATC initial pour diverses conditions de polymérisation RAFT.

Selon la même logique, la nucléation précoce dans l'essai P5 (5 fois plus d'ACPA que dans P1) est normale : le rapport $[\text{ATC}]/[\text{ACPA}]$ étant plus faible, la polymérisation est un peu moins bien contrôlée et ainsi, avec une distribution des masses molaires plus large durant la période d'induction, une partie des chaînes peut atteindre la longueur critique de précipitation.

D'autre part, une augmentation du flux de radicaux primaires induit une formation plus importante d'homopolymère polyABu. Il est très probable que ces derniers aient une longueur critique de précipitation inférieure à celle des copolymères « polyNAM-*b*-oligoABu ». Ainsi, ils pourraient conduire à la formation de nucléi avant même la formation de copolymères stabilisants. En l'absence de stabilisant, ces nucléi ne formeraient pas de particules stables mais plutôt un coagulum. Or, cela a effectivement été observé durant l'essai P3. Cependant, l'essai P5 n'a pas formé de coagulum, ce qui laisse penser que les longueurs critiques de précipitation des chaînes oligoABu et des chaînes copolymères « polyNAM-*b*-oligoABu » ne sont pas trop différentes.

* lors des essais P5 et P7... ou éventuellement dans P1 !

Ainsi, à la fois un contrôle moins strict de la polymérisation et une proportion plus importante d'homopolymère peuvent éventuellement expliquer la nucléation précoce observée dans les essais P3 et P5.

La recherche de conditions plus robustes de contrôle de la nucléation *via* le contrôle de la croissance des chaînes pourrait être intéressante. Si tout ce passe comme décrit plus haut, le « problème » de la nucléation précoce semble être dû au fait qu'une partie des chaînes peuvent atteindre la taille critique de précipitation à très faible conversion et donc pendant la période d'induction. Pour éviter cela, deux types de modification de la formulation sont possibles : augmentation du rapport éthanol/eau (pour augmenter la taille critique de précipitation) ou diminution du rapport [monomère]/[macro-ATC] (pour ralentir la croissance des chaînes). Dans les deux cas, en supposant bien sûr une croissance homogène des chaînes, la conversion nécessaire pour atteindre la longueur critique de précipitation serait plus élevée (par exemple 20%); ainsi, même si la distribution des masses molaires n'est pas très étroite pendant la période d'induction, il y a peu de risque que des chaînes atteignent cette longueur critique. La nucléation ne serait alors possible qu'après la période d'induction lorsque la conversion augmente significativement.

L'utilisation d'un rapport [monomère]/[macro-ATC] relativement faible est typiquement ce qui a été réalisé récemment par l'équipe de C. Pan^{40,41}. Il s'agit de la polymérisation en dispersion en milieu organique de l'acide acrylique (AA)⁴⁰ ou de la 4-vinylpyridine (VP)⁴¹ en présence de chaînes dormantes (dithiobenzoate) de polystyrène. Comme les masses molaires des deux blocs du copolymère obtenu sont relativement faibles (<10000 g/mol), les auteurs décrivent leur système comme des micelles (éventuellement réticulées) formées *in situ* et non pas comme des particules chevelues. Bien que les polymérisations en dispersion semblent contrôlées, la présence d'une période d'induction n'est pas reportée : dans leur cas, la fragmentation préférentielle du radical intermédiaire [polystyrène-S-C°(Z)-S-oligo(AA ou VP)] est effectivement favorable à une consommation rapide du macro-ATC.

Notons enfin une autre utilisation, encore plus récente, de chaînes homopolymère dormantes en tant que stabilisant pour un procédé de polymérisation en milieu dispersé : l'utilisation de chaînes dormantes (dithiobenzoate) de poly(méthacrylate de 2-(diéthylamino)éthyle) ($DP_n = 29$, sous forme cationisée) comme précurseurs de copolymère stabilisant lors de la polymérisation en émulsion du styrène a été reportée par Manguian *et al.*⁴² Généralement, plus rapide que le procédé dispersion, le procédé en émulsion conduit à une conversion totale dès 3h de polymérisation. Une période d'induction relativement longue (~1h) a été observée. Elle est également reliée à la présence des réactions de transfert impliquant les fonctions dithioester des chaînes dormantes. Les particules obtenues présentent un diamètre moyen d'environ 100 nm. D'après le cliché de MET reporté, elles ne paraissent pas très isodisperses (même si $D_n/D_z < 1,2$). Les taux de greffage des chaînes copolymère sur les particules ne sont pas indiqués dans cette étude.

III-4. Conclusion

La viabilité de la stratégie de synthèse de particules à chevelure contrôlée et fonctionnalisée, développée dans cette partie est confirmée : il s'agit d'une polymérisation en dispersion de l'acrylate de *n*-butyle en milieu éthanol/eau en présence de chaînes dormantes de polyNAM. Ces chaînes de longueur contrôlée préalablement synthétisées par le procédé RAFT à l'aide d'un agent RAFT approprié semblent constituer une chevelure homogène et dense autour du cœur de la particule. Le diamètre hydrodynamique moyen de ces particules dans l'eau est d'environ 150 nm. Le nombre de cheveux par particule est d'environ 2400*. Le type de fonction présente à la périphérie de ces particules chevelues est un dérivé carbohydrate.

Le bénéfice de la présence des fonctions dithioesters en extrémité des chaînes polyNAM a clairement été mis en évidence par comparaison avec le latex obtenu en présence de chaînes polyNAM synthétisées par polymérisation radicalaire conventionnelle : les particules obtenues dans ce cas sont très polydisperses avec un diamètre moyen de quelques micromètres ; par conséquent, le latex sédimente très rapidement. A l'opposé, les latex obtenus en présence de chaînes dormantes présentent des diamètres inférieurs à 500 nm (diamètre hydrodynamique). 50 à 60 % des chaînes polyNAM initialement introduites sont ancrées sur les particules, ce qui améliore considérablement la stabilisation stérique. Ainsi, le latex est très stable même dans des conditions extrêmes (congélation, centrifugation, forte concentration) : la chevelure très dense autour des particules semble empêcher toute coalescence. Une re-dispersion en milieu totalement aqueux est alors facilement réalisable.

Dans le cas où la nucléation des particules est très tardive, après une longue période d'induction (~15h), des particules très isodisperses de diamètre hydrodynamique moyen d'environ 200 nm (dans l'eau) ont été obtenues. La microscopie électronique à transmission (MET) semble confirmer la distribution étroite des tailles des particules. Ce résultat confirme l'idée qu'il est possible de contrôler la nucléation des particules *via* le contrôle strict de la polymérisation RAFT. Cependant, ce contrôle semble être perturbé par un phénomène d'hydrolyse compétitive des fonctions dithioesters dont les conséquences dépendent de la longueur des chaînes dormantes utilisées. D'autre part, ce contrôle de la nucléation n'a pu être reproduit pour des raisons qu'il reste à découvrir.

Ainsi, d'autres essais (dans des conditions expérimentales différentes ou identiques) et/ou des caractérisations complémentaires sont bien sûr encore à réaliser afin de comprendre clairement le lien supposé entre la période d'induction et l'étape de nucléation. En particulier, des analyses par chromatographie d'exclusion stérique de prélèvements réalisés pendant la période d'induction (et, au mieux, juste avant la nucléation) pourraient fournir des informations très utiles.

Enfin, une caractérisation plus complète des latex obtenus pourrait être envisagée : RMN ¹H du latex dans l'eau (pour analyser la chevelure), MET avec une technique de coloration (pour mieux visualiser le cœur des particules), mesure du potentiel zeta des particules (pour s'assurer de l'absence de stabilisation électrostatique),...

* Epaisseur supposée de la chevelure = 15 nm

IV. Conclusion du chapitre 4

L'utilisation de chacun des trois dithioesters fonctionnalisés par des ligands biologiques préalablement synthétisés (chapitre 2) a permis l'élaboration de bio-conjugués originaux utilisables dans plusieurs types d'applications bio-médicales :

- Dithioester-Lipide :

La polymérisation de la NAM en présence du dithioester-lipide conduit à des chaînes α -fonctionnelles parfaitement bien définies ayant un caractère amphiphile marqué. En s'insérant dans des bicouches lipidiques grâce à l'extrémité lipide, ce conjugué devrait augmenter la stabilisation stérique des LipoParticules.

Une limitation significative de l'agrégation des LipoParticules formées en présence de chaîne polyNAM-lipide a effectivement été observée dans un milieu à force ionique élevée (300mM).

Cependant, il semble que la présence des fonctions dithioesters à l'autre extrémité des chaînes soit néfaste aux capacités de stabilisation stérique propres aux chaînes polyNAM (et en particulier dans un milieu à force ionique de 150mM). En effet, l'hydrolyse des fonctions dithioester conduirait à la formation de fonctions thiol dont les capacités de création de pont disulfure sont connues. L'élimination des fonctions dithioester terminales après la synthèse des chaînes polyNAM-lipide est envisagée afin de pouvoir apprécier réellement l'effet de la présence des chaînes polyNAM en périphérie des LipoParticules.

- Dithioester-Biotine :

La copolymérisation de type RAFT des co-monomères NAM et NAS en présence du dithioester-biotine a permis la synthèse d'un copolymère précurseur de polymères « super-fluorescents » fonctionnalisés par une biotine à une extrémité. En effet, ayant une masse molaire élevée ($M_n > 150000$ g/mol), ces copolymères présentent d'importantes capacités de greffage latéral de fluorophores : par exemple, il y a 271 motifs NAS par chaîne de copolymère de $M_n = 159000$ g/mol contenant 25% de NAS. La présence de la biotine en extrémité de chaîne en font d'excellents candidats pour leur utilisation en tant que sondes de détection « super-fluorescentes » dans les tests de diagnostic biologique en vue d'obtenir un gain significatif de sensibilité.

L'efficacité de la synthèse de conjugués bien définis par polymérisation de type RAFT visant des masses molaires élevées (au moins supérieures à 80000 g/mol) est limitée à des taux de conversion moyens (40-50%). En effet, au-delà, deux phénomènes indépendants perturbent le bon déroulement de la polymérisation RAFT de la NAM :

- Un « effet de gel », réduisant considérablement la mobilité des espèces macromoléculaires conduit à une croissance non homogène de l'ensemble des chaînes. De ce fait, la présence (en quantité non négligeable) de chaînes présentant de masses molaires très élevées (plusieurs millions de g/mol) a clairement été mise en évidence. Ce phénomène ne modifie pas la valeur de M_n qui peut rester proche de la valeur théorique mais élargit énormément la distribution des masses molaires (croissance exponentielle des valeurs de I_p).
- Un phénomène de fragmentation des chaînes, déjà observé à conversion très élevée lorsqu'une masse molaire plus modeste est visée (50000 g/mol), est beaucoup plus

marqué. Non seulement il induit une diminution du M_n , mais surtout il peut réduire de manière importante le taux de fonctionnalisation final des chaînes. Ce phénomène, consécutif à une réaction de transfert au polymère, n'a encore jamais été décrit dans le cas de dérivés d'acrylamide. Il semblerait que l'« effet de gel » puisse favoriser ce phénomène de fragmentation de chaîne.

Les conditions de polymérisation en solution qui réduisent le phénomène de fragmentation des chaînes (concentration en monomère élevée et diminution de la température de polymérisation) contribuent à augmenter la viscosité du milieu ce qui favorise l'« effet de gel ».

- Dithoester-Sucre :

La présence des fonctions dithioester très transférantes en extrémité des chaînes polyNAM-sucre préalablement synthétisées par le procédé RAFT a été mise à profit dans le procédé de polymérisation en dispersion dont un des principes est basé sur les réactions de transfert au polymère (stabilisant). L'adaptation judicieuse de la formulation de la polymérisation en dispersion a permis l'obtention de particules chevelues isodisperses présentant un diamètre d'environ 200 nm et des taux de greffage des « cheveux » importants (>55%). Ces particules qui présentent un nombre très important de dérivés carbohydrates (sucre) à leur périphérie (2000-4500) pourraient s'avérer être de très bons supports de capture de bactéries (amélioration de l'étape de capture des tests biologiques).

Cependant, l'ensemble des phénomènes (mécanisme RAFT, hydrolyse, nucléation,...) ayant lieu et leur imbrication dans la polymérisation en dispersion est loin d'être totalement éclairci.

Bien que cette étude de faisabilité soit concluante, des conditions de synthèse de particules isodisperses plus reproductibles doivent être recherchées. Enfin, une caractérisation plus complète des particules chevelues obtenues est envisagée.

Ce chapitre 4 fera l'objet de trois publications (en préparation) concernant :

- *la synthèse et l'utilisation de polymères fonctionnalisés par un lipide pour la stabilisation de LipoParticules.*
- *la synthèse et le marquage fluorescent des chaînes copolymères biotinylés de hautes masses molaires.*
- *La synthèse de particules chevelues par polymérisation en dispersion.*

V. Partie expérimentale

V-1. Stabilisation de LipoParticules à l'aide de chaînes polyNAM-lipide

La synthèse des conjugués polyNAM-lipide est effectuée par polymérisation RAFT de la NAM en présence du dithioester-lipide (LEDBA). La synthèse de la LEDBA est décrite dans le chapitre 2. Le mode opératoire des polymérisations RAFT en présence de LEDBA ainsi que les tentatives de caractérisation du conjugué obtenu sont détaillés dans le chapitre 3.

La procédure de préparation des LipoParticules et les détails sur la méthode de caractérisation (diffusion quasi-élastique de la lumière) sont disponibles dans la littérature³. Pour la synthèse des LipoParticules présentant des chaînes polyNAM à leur surface, les conjugués polyNAM-lipide sont introduits dans la formulation lipidique dès la première étape de la procédure de préparation.

V-2. Copolymères NAM/NAS de masses molaires élevées.

La synthèse des conjugués poly(NAM-co-NAS)-morpholine et poly(NAM-co-NAS)-biotine est effectuée par polymérisation RAFT de la NAM en présence respectivement du dithioester-morpholine (MEDBA) ou du dithioester-biotine (BEDBA). La synthèse de la MEDBA et celle de la BEDBA sont décrites dans le chapitre 2. Le mode opératoire de la polymérisation RAFT et la méthode de caractérisation (CES/DDL) des conjugués obtenus sont détaillés dans le chapitre 3.

Le 2,2'-Azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) V65 (amorceur de polymérisation) est recristallisé dans l'éthanol.

Le principe du suivi par RMN ¹H de la conversion est identique à celui décrit dans le chapitre 2. La superposition de certaines résonances des deux monomères conduit à un système d'équations. Sa résolution très simple permet d'accéder aux deux conversions partielles et à la conversion globale.^{20,21}

Pour certains échantillons difficilement solubles dans le tampon aqueux d'analyse par CES/DDL, les polymères sont préalablement dissous dans quelques gouttes de DMF avant l'ajout du tampon aqueux. La valeur de l'incrément d'indice de réfraction utilisée (dn/dc poly(NAM-co-NAS) = 0,162) correspond à celle déterminée pour une composition molaire en motif NAS de 40%¹⁷. Compte tenu de la faible différence avec celle d'un homopolymère de NAM (0,163), elle a été considérée comme représentative de tous les copolymères synthétisés.

La purification des conjugués poly(NAM-co-NAS)-Biotine obtenus a été réalisée par trois précipitations successives dans un large volume d'éther diéthylique (précipité fin et poudreux). La dernière précipitation utilise une solution concentrée de polymère afin de récupérer le conjugué sous la forme de « billes », très facilement manipulable. Ces « billes » sont ensuite séchées sous vide pendant au moins une vingtaine heures.

Tableau 16 : Correspondance références des essais du texte/références des essais du cahier de laboratoire.

M1	M2	M3	B1	B2
MB46	MB47	MB48	MB49	MB50

V-3. Polymérisation en dispersion en présence de chaînes dormantes

a) Synthèse des chaînes dormantes

Les chaînes dormantes DT-polyNAM-morpholine et DT-polyNAM-sucre ont été synthétisées par polymérisation RAFT de la NAM en présence respectivement du dithioester-morpholine (MEDBA) ou du dithioester-sucre (SEDBA). La synthèse de la MEDBA et celle de la SEDBA sont décrites dans le chapitre 2. Le mode opératoire de la polymérisation RAFT et la méthode de caractérisation (CES/DDI) des conjugués obtenus sont détaillés dans le chapitre 3.

La purification des chaînes dormantes obtenues a été réalisée par trois précipitations successives dans un large volume d'éther diéthylique. Après séchage sous vide pendant plusieurs jours, l'analyse des chaînes par RMN ^1H dans CDCl_3 ne montre plus que de petites traces d'éther (sauf pour le polyNAM-Sucre, séchage sous vide uniquement pendant 24h).

b) Polymérisations en dispersion

Réactifs

L'inhibiteur de polymérisation présent dans l'acrylate de *n*-butyle est éliminé par filtration sur mini-colonne (Inhibitor-remover, Aldrich, réf. 311332).

L'ACPA (4,4'-Azobis(acide 4-cyanopentanoïque), le trioxane, et l'éthanol absolu sont utilisés sans purification préalable. De l'eau permutée est utilisée.

Mode opératoire (proportion de l'essai P1)

Dans un ballon bi-col de 50 mL, typiquement 297mg de chaînes dormantes polyNAM et 60mg de trioxane sont dissous dans un mélange composé de 3,5 mL d'eau et 4,75 mL d'éthanol. 1g d'acrylate de *n*-butyle et 1,87 mL d'une solution d'ACPA dans l'éthanol (1mg/mL) sont ensuite ajoutés. Le volume réactionnel total est égal à 11,2 mL.

Un dégazage poussé du milieu réactionnel est effectué grâce à quatre cycles de congélation dans l'azote liquide/vide/décongélation. Le milieu réactionnel est ensuite mis sous argon avant d'être plongé dans un bain d'huile à 70°C. Il est agité à l'aide d'une agitation magnétique. Des prélèvements d'environ 0,8 mL chacun sont régulièrement effectués à l'aide d'une pipette (par ouverture d'un col du ballon).

Suivi cinétique

Le suivi cinétique de la consommation du monomère, acrylate de *n*-butyle, est réalisé par RMN ^1H de la même manière que lors des polymérisations en solution (chapitre 3). 300 μL de latex sont mélangés à 500 μL de CDCl_3 . Le tube RMN est laissé reposé jusqu'à la séparation de phase entre le mélange $\text{CDCl}_3/\text{EtOH}$ et l'eau. De cette manière, l'échantillon est limpide et la majorité de l'eau se trouve au-dessus de la zone du tube analysée. Les résonances de l'éthanol ne perturbent pas la zone du spectre utile à l'intégration du signal du trioxane et à celle des signaux du monomère (5ppm-7ppm).

Mesure de la taille des particules

La mesure de la taille des particules est réalisée par diffusion quasi-élastique de la lumière (DQEL) à 90°C (ZetaSizer 1000HS_A, Malvern Instrument). Les données brutes sont exploitées en mode mono-modal puis en mode multimodal (analyse de la distribution en nombre).

Tableau 17 : Paramètres utilisés pour l'exploitation des mesures de DQEL.

Milieu dispersant	Eau	Ethanol	Ethanol/Eau 60/40 v/v
Indice de réfraction	1,33	1,36	1,348
Viscosité (cP)	1	1,2	1,12

Centrifugation – Taux de greffage

5 à 7 mL de latex (latex brut ou préalablement mis en eau) sont centrifugés au moins 3 heures à la vitesse maximale (27000 tr/min) à 8°C afin d'obtenir un surnageant limpide et incolore. Avec l'appareillage (Allegra 64R Centrifuge, Beckman-Coulter) et le rotor utilisés, cette vitesse maximale correspond à une accélération de 57440G.

La détermination des taux de greffage a été réalisée par deux méthodes (relativement concordantes) :

- Analyse par RMN ¹H du culot pour la détermination du rapport [motif NAM]/[motif ABu] :

$$\frac{[\text{motif NAM}]}{[\text{motif ABu}]} = \frac{\text{intégrale}(\text{zone 3 - 4,2ppm}) - 2.\text{intréale}(\text{zone 2,1 - 3ppm})}{8.\text{intréale}(\text{zone 2,1 - 3ppm}) - \text{intégrale}(\text{zone 3 - 4,2ppm})}$$

La zone 2,1-3ppm correspond à 1 proton du NAM (-CH-) et un proton de l'ABu (-CH-) ; la zone 3-4,2 ppm correspond à 8 proton du NAM (4 CH₂ du cycle morpholine) et 2 proton de l'ABu (-C(=O)-O-CH₂-)

La comparaison de ce rapport avec celui de la formulation initiale conduit à une valeur du taux de greffage des chaînes polyNAM sur les particules.

- Analyse par RMN ¹H du surnageant pour déterminer le rapport [motif NAM]/[motif ABu] puis le rapport massique m(polyNAM)/m(polyABu). La pesée préalable du surnageant après évaporation complète du solvant permet de déterminer la masse des chaînes polyNAM restées dans la phase continue. La comparaison avec la masse initialement introduite dans la formulation conduit à une autre estimation du taux de greffage.

Les valeurs de taux de greffage données dans le texte sont les moyennes des valeurs obtenues par les deux méthodes.

Tableau 18 : Correspondance références des essais du texte/références des essais du cahier de laboratoire.

Réf.1	Réf.2	Réf.3	P1	P1 réamorcé	P2	P3	P4	P5	P6	P7
MB56	MB58	MB66	MB59	MB59-2	MB61	MB60	MB62	MB70	MB65	MB68

Références du chapitre 4

- (1) Daviot, D. "Synthèse par polymérisation RAFT de polymères fonctionnalisés en alpha en vue de la stabilisation de LipoParticules.," UMR CNRS-bioMérieux, **2005**.
- (2) Troutier, A.-L. *Thèse, Université Lyon 1* **2005**.
- (3) Troutier, A.-L.; Delair, T.; Pichot, C.; Ladavière, C. *Langmuir* **2005**, *21*, 1305-1313.
- (4) Troutier, A.-L.; Véron, L.; Delair, T.; Pichot, C.; Ladavière, C. *Langmuir* **2005**, *21*, 9901-9910.
- (5) Messai, I.; Delair, T. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2006**, *278*, 188-196.
- (6) Thevenot, J. *Thèse, Université Lyon 1, thèse en cours*.
- (7) Bathfield, M.; Graillat, C.; Hamaide, T. *Macromol. Chem. Phys.* **2005**, *206*, 2284–2291.
- (8) Iojoiu, C.; Cade, D.; Fessi, H.; Hamaide, T. *Polymer International* **2005**, *55*, 222 - 228.
- (9) Torchilin, V. P.; Trubetskoy, V. S. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1995**, *16*, 141-155.
- (10) Klibanov, A. L.; Maruyama, K.; Torchilin, V. P.; Huang, L. *Febs letters* **1990**, *268*, 235-237.
- (11) Mori, A.; Klibanov, A. L.; Torchilin, V. P.; Huang, L. *Febs letters* **1991**, *284*, 263-266.
- (12) Perrier, S.; Takolpuckdee, P. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* **2005**, *43*, 5347–5393.
- (13) Perrier, S.; Takolpuckdee, P.; Mars, C. A. *Macromolecules* **2005**, *38*, 2033-2036.
- (14) de Lambert Bregnot du Lut, B. *Thèse, Université Lyon 1* **2003**.
- (15) Relogio, P.; Charreyre, M.-T.; Farinha, J. P. S.; Martinho, J. M. G.; Pichot, C. *Polymer* **2004**, *45*, 8639-8649.
- (16) Relogio, P. *Thèse, Institut Supérieur Technique de Lisbonne*, **2006**.
- (17) Favier, A. *Thèse, Université Lyon 1* **2002**.
- (18) Masson, J. C. In *Polymer Handbook 3ème ed.*; 3rd ed.; Wiley, Ed.; Brandrup, J. Immergut, E.H., **1989**.
- (19) de Lambert, B.; Charreyre, M.-T.; Chaix, C.; Pichot, C. *Polymer* **2005**, *46*, 623–637.
- (20) D'Agosto, F.; Charreyre, M.-T.; Veron, L.; Llauro, M.-F.; Pichot, C. *Macromol. Chem. Phys.* **2001**, *202*, 1689-1699.
- (21) Favier, A.; D'Agosto, F.; Charreyre, M.-T.; Pichot, C. *Polymer* **2004**, *45*, 7821-7830.
- (22) Sato, E.; Emoto, T.; Zetterlund, P. B.; Yamada, B. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2004**, *205*, 1829-1839.
- (23) Rzaev, J.; Penelle, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1691 –1694.
- (24) Beija, M. *Thèse, Université Lyon 1/Institut Technique Supérieur de Lisbonne, thèse en cours*.
- (25) Braconnot, S.; Elaïssari, A. In *Les latex synthétiques*; Tec&Doc, Ed.; Daniel, J.-C. Pichot, C.: Paris, **2006**, pp 1213-1230.

- (26) Viovy, J.-L. In *Les latex synthétiques*; Tec&Doc, Ed.; Daniel, J-C. Pichot, C.: Paris, **2006**, pp 1231-1246.
- (27) D'Agosto, F.; Charreyre, M. T.; Pichot, C.; Gilbert, R. G. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* **2003**, *41*, 1188-1195.
- (28) D'Agosto, F.; Hughes, R.; Charreyre, M.-T.; Pichot, C.; Gilbert, R. G. *Macromolecules* **2003**, *36*, 621-629.
- (29) Lacroix-Desmazes, P. In *Les latex synthétiques*; Tec&Doc, Ed.; Daniel, J-C. Pichot, C.: Paris, **2006**, pp 259-288.
- (30) Wang, D.; Dimonie, V. L.; Sudol, E. D.; El-Aasser, M. S. *Journal of Applied Polymer Science* **2002**, *84*, 2692-2709.
- (31) Berger, K. C.; Brandrup, G. In *Polymer Handbook 3ème ed.*; 3rd ed.; Wiley, Ed.; Brandrup, J. Immergut, E.H., **1989**, pp II-81.
- (32) Riess, G.; Labbe, C. *Macromolecular Rapid Communications* **2003**, *25*, 401-435.
- (33) Miyazaki, H.; Terada, K.; Sato, T.; Maruyama, H.; Okaya, T. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* **1996**, *0*, 2149-2157.
- (34) Bourgeat-Lami, E.; Guyot, A. *Colloid & Polymer Science* **1997**, *275*, 716 – 729.
- (35) Moad, G.; Chiefari, J.; Chong, Y. K.; Krstina, J.; Mayadunne, R. T. A.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Polym. Int.* **2000**, *49*, 993.
- (36) Berger, K. C.; Meyerhoff, G. In *Polymer Handbook 3ème ed.*; 3rd ed.; Wiley, Ed.; Brandrup, J. Immergut, E.H., **1989**, pp II-67.
- (37) Hayakawa, T.; Adachi, K. *Macromolecules* **2000**, *33*, 6834-6839.
- (38) Peyser, P. In *Polymer Handbook 3ème ed.*; 3rd ed.; Wiley, Ed.; Brandrup, J. Immergut, E.H., **1989**, pp VI-209.
- (39) Ferguson, C. J.; Hughes, R. J.; Nguyen, D.; Pham, B. T. T.; Gilbert, R. G.; Serelis, A. K.; Such, C. H.; Hawkett, B. S. *Macromolecules* **2005**, *38*, 2191-2204.
- (40) Zheng, G.; Zheng, Q.; Pan, C. *Macromol. Chem. Phys.* **2006**, *207*, 216-223.
- (41) Zheng, G.; Pan, C. *Macromolecules* **2006**, *39*, 95-102.
- (42) Manguian, M.; Save, M.; Charleux, B. *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 399–404.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale et perspectives

Ce mémoire a présenté une stratégie simple et efficace pour la synthèse d'agents de transfert de chaîne (ATC) fonctionnels. Synthétisés à partir de ligands aminés et d'un dithioester précurseur portant une fonction ester activé, ces ATC fonctionnels ont l'avantage de comporter une liaison amide. Cela a permis d'envisager la synthèse de bio-conjugués pour lesquels la présence d'une telle liaison est le gage d'une bonne stabilité en milieu aqueux. Ces bio-conjugués sous forme de chaînes polymère α -fonctionnelles ont été synthétisés en deux étapes :

- Application de la stratégie générale à la synthèse de trois ATC bio-fonctionnels : dithioester-biotine, dithioester-lipide et dithioester-sucre.
- Polymérisation RAFT d'un dérivé de l'acrylamide hydrophile (la *N*-acryloylmorpholine, NAM) en présence de chacun des trois ATC bio-fonctionnels. L'efficacité de contrôle de ces ATC ainsi que l'intégrité du ligand biologique après polymérisation ont été étudiées.

Dans le cadre de la conception de nouveaux supports de capture d'agents pathogènes, les chaînes de polyNAM α -fonctionnelles obtenues ont été jugées potentiellement intéressantes pour l'élaboration de particules à chevelure fonctionnalisée et de longueur contrôlée. Les principaux résultats de ce travail de thèse sont résumés dans les paragraphes ci-dessous avec les perspectives envisagées.

L'étude bibliographique a permis de mettre en valeur les avantages de la stratégie de fonctionnalisation des extrémités de chaînes avant polymérisation par rapport à la stratégie post-polymérisation. Cette dernière conduit à un rendement de couplage entre le composé d'intérêt et les chaînes polymère préformées d'autant plus faible que les masses molaires des chaînes augmentent.

L'apparition des techniques de polymérisation radicalaire contrôlée (PRC) a donné un nouvel élan à la stratégie d' α -fonctionnalisation avant polymérisation. Parmi les trois techniques principales de PRC (NMP, ATRP et RAFT), la technique ATRP est à l'heure actuelle la plus exploitée, en particulier en ce qui concerne l'introduction de ligands biologiques. En effet, malgré la grande versatilité du procédé RAFT (possibilités de monomères et de conditions expérimentales très variées), la synthèse d'amorceurs fonctionnels pour la polymérisation de type ATRP semble plus aisée que la synthèse d'ATC fonctionnels efficaces (en particulier les dithioesters) pour la polymérisation de type RAFT. La synthèse de nouveaux agents de contrôle pour le procédé RAFT constitue ainsi un champ d'investigation étendu qui reste largement ouvert à l'innovation.

Le chapitre 2 a décrit en détail la synthèse de dithioesters-ligands biologiques. Celle-ci se confrontait initialement à un problème d'incompatibilité entre les dithioesters et les composés aminés. Ce chapitre a démontré que l'introduction préalable d'une fonction ester activé de type oxysuccinimide au sein d'un dithioester précurseur permet de contourner très efficacement le problème de réactivité des dithioesters vis-à-vis des fonctions amine.

La synthèse de ces dithiobenzoates précurseurs a ainsi été décrite. Leur atout majeur réside dans la présence d'une fonction ester activé stable ce qui rend ces produits isolables et stockables. Cette étude s'est particulièrement focalisée sur la synthèse d'un dithiobenzoate précurseur présentant un fragment amorceur secondaire (rendement de synthèse de 45%).

Les conditions de synthèse de dithioesters fonctionnels à partir de ce dithiobenzoate précurseur ont été préalablement optimisées avec un composé aminé modèle (4-(2-aminoéthyl)morpholine). Elles ont ensuite été étendues à la synthèse de plusieurs dithioesters-ligands d'intérêt biologique. Ainsi, un dithioester-biotine, un dithioester-sucre et un dithioester-lipide

ont été obtenus avec un rendement de synthèse brut supérieur à 95%. Après des purifications minutieuses, les rendements de synthèse sont d'environ 70%. Les caractérisations complètes de ces dithioesters (RMN ^1H , RMN ^{13}C , analyses élémentaires, spectrométrie de masse FAB) ont confirmé la pureté élevée de ces produits (96-98%).

Les perspectives sur cette partie de chimie organique concernent l'amélioration des rendements de synthèse des dithiobenzoates précurseurs. Certains éléments présentés laissent penser que des rendements de l'ordre de 70% pourraient être obtenus après optimisation des conditions de synthèse.

La stratégie développée ici est une stratégie générale qui devrait permettre de fixer n'importe quel composé aminé sur un ATC. Ainsi, au sein de l'unité mixte CNRS-bioMérieux, plusieurs dithioesters-fluorophores ont été synthétisés selon cette même stratégie^{1,2}. Elle a également été exploitée au LCPP : le couplage entre des chaînes polymère et le dithioester précurseur conduit à des macro-ATC originaux ; la synthèse de dithioesters-silane utilisable dans le procédé sol-gel a également été réalisée ; enfin, l'utilisation d'un composé diaminé est une voie de synthèse aisée pour l'obtention d'ATC bi-fonctionnels.

D'autre part, plusieurs laboratoires de recherche étrangers ont déjà fait part de leur intérêt envers les dithioesters bio-fonctionnels que nous avons synthétisés.

Dans le troisième chapitre, l'efficacité de chacun des dithioesters-ligands synthétisés a été vérifiée au cours d'essais de polymérisation RAFT de la NAM. Les techniques de caractérisation telles que la chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur de diffusion de la lumière (CES/DDL), la RMN ^1H et la spectrométrie de masse MALDI-ToF ont permis de rassembler tous les critères confirmant l'obtention de polymères α -fonctionnels parfaitement définis :

- Croissance linéaire des masses molaires moyennes en nombre avec la conversion (et valeurs très proches des valeurs théoriques, gamme de masse = 2000-40000 g/mol).
- Indice de polymolécularité très faible, inférieur à 1,1.
- Conservation et intégrité des ligands biologiques présents en extrémité α des chaînes après la polymérisation et les étapes de purification du polymère.
- Taux de fonctionnalisation des chaînes élevé (au moins supérieur à la valeur théorique de 91%).

D'un point de vue plus fondamental, la présence d'un ligand biologique sur l'ATC n'a aucune influence sur les cinétiques de polymérisation. Celles-ci sont classiquement « retardées » comme de nombreuses polymérisations RAFT en présence de dithiobenzoates.

En plus de ce phénomène de retard, dont l'origine reste encore débattue dans la littérature, un épiphénomène de « sur-retard » a été mis en évidence lors de l'utilisation du dithioester-morpholine. L'origine de ce phénomène est vraisemblablement une des hypothèses proposées pour expliquer le phénomène de « retard » : des réactions de terminaison sur les radicaux intermédiaires. Pour la première fois, des radicaux intermédiaires terminés ont été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-ToF dans un échantillon issu d'une polymérisation RAFT.

Cependant, et de manière assez inattendue, nos résultats expérimentaux associés à ceux des récents travaux de Buback *et al.*³ mettent en doute la validité des deux hypothèses proposées dans la littérature concernant le phénomène de retard. Cela élargit le débat et pourrait peut-être laisser place à de nouvelles hypothèses...

Les perspectives de cette partie de polymérisation RAFT en solution sont variées. Tout d'abord, les ATC bio-fonctionnels peuvent être utilisés pour polymériser d'autres types de monomères d'intérêt (ex.: glycomonomères⁴) et/ou pour élaborer des structures macromoléculaires bio-fonctionnelles plus complexes (copolymères statistiques, à blocs, en étoile...).

Les perspectives de cette partie concernent également l'aspect fondamental de compréhension des mécanismes du procédé RAFT. La modification des conditions expérimentales (ex.: diminution du rapport [ATC]/[Amorceur]) pourrait éventuellement aider à la détection d'autres structures de radicaux intermédiaires terminés. De plus, il serait très intéressant d'essayer de reproduire le phénomène de « sur-retard » par le choix d'un autre monomère et d'un ATC de nature approprié.

Dans le dernier chapitre, la synthèse de structures à base de (co)polymères α -bio-fonctionnels en vue d'applications dans le domaine bio-médical a été présentée :

- Des chaînes polyNAM-Lipide de longueur variée ont été insérées dans les bicouches lipidiques de LipoParticules. Elles permettent une bonne stabilité des ces LipoParticules (stabilisation stérique) dans un milieu à force ionique élevé (300mM). Cependant, les essais réalisés dans un milieu à force ionique plus modeste (150mM) n'ont pas permis d'obtenir la stabilisation souhaitée. La présence de la fonction dithioester (hydrolysable en fonction thiol) en extrémité ω de ces chaînes pourrait peut-être induire des effets secondaires (pontage inter-particulaire, par exemple) limitant la stabilité des LipoParticules dans certains milieux.

Des essais complémentaires pourraient être réalisés afin de compléter cette étude de la stabilisation de LipoParticules par des chaînes de polyNAM.

- Des chaînes de copolymère statistique, poly(NAM-co-NAS)-Biotine, de masses molaires élevées ($M_n > 150000$ g/mol) et présentant une distribution des masses molaires relativement étroite ($I_p < 1,5$) ont été synthétisées. De nombreuses fonctions latérales réactives sont apportées par les motifs NAS (N-acryloxysuccinimide). Après un marquage fluorescent ultérieur, ces chaînes constitueront d'excellents candidats en tant que sondes de détection « super-fluorescentes » pour des tests de diagnostic biologique. Lorsque des masses molaires élevées sont visées, deux phénomènes perturbateurs du contrôle de la polymérisation RAFT (fragmentation des chaînes consécutif à un transfert au polymère et « effet de gel ») ont été mis en évidence. La limitation de leurs effets a permis d'atteindre l'objectif fixé.

Le marquage fluorescent de ces copolymères réactifs (plus de 271 motifs NAS par chaîne) puis leur caractérisation (notamment en terme de fluorescence) est actuellement en cours.²

- Des particules à chevelure contrôlée et fonctionnalisée par un dérivé carbohydrate (sucre) présentant un diamètre hydrodynamique moyen de 150 nm ont été synthétisées par polymérisation en dispersion de l'acrylate de *n*-butyle en présence de chaînes dormantes polyNAM-Sucre. Ces particules qui présentent un nombre très important de dérivés carbohydrate à leur périphérie (2400 à 4500 par particule) constituent un modèle de supports de capture de bactéries. Lors d'essais préliminaires utilisant des chaînes dormantes polyNAM-Morpholine, le diamètre moyen des particules se situe dans l'intervalle [150 nm - 400 nm]. 55 à 70% des chaînes polyNAM (qui constituent les « cheveux ») introduites dans la formulation sont

greffées sur les particules. L'optimisation préalable des conditions de polymérisation a conduit à des particules chevelues isodisperses. Cependant, cela n'a été obtenu que lors d'un seul essai. Les raisons de ce manque de reproductibilité (hydrolyse compétitive, conditions « limites ») ont été discutées mais elles restent toutefois encore au stade d'hypothèse.

La dernière partie de ce travail de thèse ne représente ainsi qu'une étude de faisabilité de la synthèse de particules chevelues par polymérisation en dispersion en présence de chaînes dormantes. Celle-ci est concluante, mais elle laisse beaucoup de questions sans réponses, notamment en ce qui concerne l'imbrication du mécanisme de polymérisation RAFT avec l'étape de nucléation des particules (propre à la polymérisation en milieu dispersé). Ce travail ouvre néanmoins la voie à la possibilité de produire des latex aux fonctionnalités nouvelles qui peuvent être modulées par la grande souplesse et versatilité de synthèse qu'offre le procédé RAFT.

- (1) Prazeres, T. *Thèse, Institut Supérieur Technique de Lisbonne, thèse en cours.*
- (2) Beija, M. *Thèse, Université Lyon I/Institut Technique Supérieur de Lisbonne, thèse en cours.*
- (3) Buback, M.; Hesse, P.; Junkers, T.; Vana, P. *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 182-187.
- (4) Gody, G. *Thèse, Université Lyon I, thèse en cours.*

ANNEXES

Sommaire des annexes

ANNEXE 1	
Exploitation des résultats des analyses élémentaires	225
ANNEXE 2	
Fragmentation du SEDB au cours des analyses de spectrométrie de masse	228
ANNEXE 3	
Nature du pic gaussien mobile visible sur certains spectres RMN ¹ H des dithioesters-ligands.	230
ANNEXE 4	
Effet des impuretés (présentes dans les dithioesters) sur les cinétiques de polymérisation RAFT de la NAM.....	232
ANNEXE 5	
Spectrométrie de masse MALDI-ToF avec du THF non distillé	234
ANNEXE 6	
Agrégation des conjugués polyNAM-lipide en CES aqueuse.	240
ANNEXE 7	
Estimation de la concentration en radicaux propageant au cours de la copolymérisation RAFT du NAM avec le NAS (essai M3)	243
ANNEXE 8	
Analyse de la distribution des masses molaires dans le cas des polymérisation RAFT visant des masses molaires élevées.....	245

ANNEXE 1**Exploitation des résultats des analyses élémentaires**

Les dithioesters-ligands synthétisés (cf. chapitre 2) ont été caractérisés par analyse élémentaire afin de pouvoir estimer leur pureté massique (Tableau 1). Pour des raisons d'ordre technique, le dosage de l'oxygène n'est jamais réalisé. Ainsi, certaines approximations ont été nécessaires afin de calculer la pureté massique à partir des résultats bruts du dosage des autres éléments.

Tableau 1 : Résultats des analyses élémentaires des dithioesters synthétisés
(dosages demandés : C, H, N, S, Si, P(LEDDBA))

		% C	% H	% N	% O	% S	% P	% Si	% Cl
MEDBA	% théorique	56,77	6,55	8,28	9,45	18,95	-	-	-
	% exp.	56,86	6,57	8,15	9,30*	19,02	-	0,10	-
BEDBA	% théorique	53,58	6,57	9,61	13,73	16,50	-	-	-
	% exp.	53,01	6,68	9,29	13,50**	16,405	-	0,028	1,08*
SEDDBA	% théorique	56,51	6,25	3,00	20,53	13,71	-	-	-
	% exp.	54,27	6,005	2,76	19,49**	13,105	-	0,16	4,21*
LEDDBA	% théorique	62,88	9,16	2,77	15,80	6,33	3,06	-	-
	% exp.	61,05	8,94	2,70	15,03**	6,89	2,83	0,04	2,52*

** : valeur estimée en fonction de la moyenne des écarts relatifs des dosages des autres éléments.

* : valeur estimée = 100 - SOMME(% des autres éléments)

Le dosage du silicium a été demandé pour vérifier la teneur en silice de nos produits purifiés. Cette teneur est, heureusement, relativement négligeable. On peut cependant remarquer qu'elle est la plus faible pour les deux dithioesters qui ont subi une purification à « protocole simplifié » (BEDBA et LEDDBA) au cours de laquelle la silice a été lavée à l'acétone avant le dépôt du produit.

Seule l'analyse de la MEDBA offre des pourcentages très proches des pourcentages théoriques. Ainsi, le pourcentage manquant pour arriver à 100% a été attribué à l'oxygène. Les dosages des autres dithioesters donnent des résultats relativement différents des pourcentages théoriques, et l'attribution du pourcentage manquant à l'oxygène n'a physiquement aucun sens (beaucoup trop d'oxygène). Compte tenu que ces pourcentages expérimentaux sont (presque) tous inférieurs à la théorie (c'est flagrant pour la SEDDBA), la présence dans nos échantillons d'au moins un autre élément non dosé (en plus de l'oxygène) est obligatoire. La nature de cet élément est très certainement le chlore puisque le dichlorométhane a été le dernier solvant à être utilisé avant l'analyse. Pour avoir une idée de sa quantité dans l'échantillon, le pourcentage d'oxygène a été estimé d'après sa valeur théorique et la moyenne des écarts relatifs des résultats des éléments dosés. Ensuite, le pourcentage de chlore complète la somme pour arriver à 100% : c'est effectivement le produit le plus visqueux, la SEDDBA, qui contiendrait le plus de solvant résiduel.

Remarque : durée de séchage (sous le vide de la pompe à palette à température ambiante) des échantillons analysés :

- MEDBA et SEDDBA : 4 jours.
- BEDBA : ~36h .
- LEDDBA : ~24h (peut-être un peu court !)

A partir de ces résultats (expérimentaux et estimés), on peut remonter à la formule brute $C_xH_yN_zO_aS_bP_cSi_dCl_e$ de l'échantillon et ainsi calculer la pureté massique des dithioesters synthétisés. Le système de 8 équations à 8 inconnues (% de chaque élément en fonction de x, y, z, a, b, c, d, e) a un déterminant nul et n'a donc pas de solution unique. Le nombre de carbone x est alors fixé à sa valeur théorique afin de réduire le problème en un système de 7 équations à 7 inconnues à déterminant non nul. Ce système est alors résolu à l'aide d'Excel. Pour certains éléments, la valeur trouvée est inférieure à la valeur théorique ce qui est physiquement impossible. Ainsi, par produit en croix, les valeurs sont ajustées afin qu'elles soient toutes supérieures ou égales à la valeur théorique (formule brute du dithioester pur). La pureté massique est alors calculée par le rapport de la masse molaire correspondant à la formule brute théorique sur la masse molaire de la formule brute de l'échantillon. En négligeant la quantité de dichlorométhane résiduel, on peut également calculer la pureté massique du produit totalement exempt de solvant (Tableau 2).

Tableau 2 : Exploitation des résultats des analyses élémentaires

	Formule brute du dithioester pur Formule brute de l'échantillon	Pureté massique (%)	Pureté massique produit totalement sec (%)
MEDBA	$C_{16}H_{22}N_2O_2S_2$	98,4	98,4
	$C_{16,29}H_{22,43}N_2O_2S_{2,04} + Si_{0,01}$		
BEDBA	$C_{26}H_{38}N_4O_5S_3$	96,6	97,9
	$C_{26,53}H_{39,79}N_4O_{5,09}S_{3,09} + Si_{0,01} + 0,09 CH_2Cl_2$		
SEDBA	$C_{22}H_{29}N_1O_6S_2$	92,1	97,0
	$C_{22,63}H_{29,64}N_1O_{6,18}S_{2,07} + Si_{0,03} + 0,30 CH_2Cl_2$		
LEDBA (sans contre-ion)	$C_{53}H_{92}N_2O_{10}S_2P_1$	92,6	95,5
	$C_{55,24}H_{96,26}N_{2,11}O_{10,28}S_{2,35}P_1 + Si_{0,02} + 0,39 CH_2Cl_2$		
LEDBA (+H ₃ O ⁺)	$C_{53}H_{95}N_2O_{11}S_2P_1$	94,2	95,7
	$C_{55,44}H_{96,66}N_{2,11}O_{11,16}S_{2,35}P_1 + Si_{0,02} + 0,19 CH_2Cl_2$		

Les puretés massiques calculées indiquent une bonne efficacité des purifications ; Les dithioesters les plus purs (et les plus secs) étant la MEDBA et la BEDBA. La SEDBA semble également bien purifiée (97%) mais présente un problème de séchage optimal. La LEDBA n'est qu'à 95,5 de pureté car son spectre RMN ¹H nous indiquait déjà la présence de 2 à 3% d'eau.

Afin de vérifier la validité de ces calculs et approximations, le dosage du chlore a été demandé pour l'analyse du SEDB (MB17-lot β). Celui-ci étant en solution dans le chloroforme, 1 mL de cette solution a été évaporé sous vide pendant 5 jours.

La ligne « % exp. » du Tableau 3 correspond aux approximations réalisées précédemment en ne tenant pas compte du dosage du chlore.

Tableau 3 : Résultats de l'analyse élémentaire du SEDB (dosages demandés : C, H, N, S, Cl)

	%C	%H	%N	%O	%S	%Cl
% théorique	52,00	4,05	4,33	19,79	19,83	-
% exp.	50,25	4,15	4,07	<i>19,96*</i>	18,58	2,99
« % exp. »	50,25	4,15	4,07	<i>18,89**</i>	18,58	<i>4,06*</i>

** : valeur estimée en fonction de la moyenne des écarts relatifs des dosages des autres éléments.

* : valeur estimée = 100 – SOMME(% des autres éléments)

Tableau 4 : Exploitation des résultats de l'analyse élémentaire du SEDB

	Formule brute	Pureté massique (%)	Pureté massique produit totallement sec (%)
théorique	$C_{14}H_{13}N_1O_4S_2$	-	-
avec % exp.	$C_{14,35}H_{14,12}N_1O_{4,31}S_2 + 0,10 CHCl_3$	93,7	96,9
avec « % exp. »	$C_{14,31}H_{14,08}N_1O_{4,08}S_2 + 0,13 CHCl_3$	93,7	98,1

Les approximations sur le dosage de l'oxygène et du chlore surestiment légèrement la quantité de chloroforme résiduel dans l'échantillon analysé. Cependant, les calculs de pureté massique donnent des résultats identiques à 1% près. Cela justifie la présence de dichlorométhane résiduel dans les dithioesters-ligands analysés et valide les approximations réalisées pour remonter à la pureté massique des produits.

D'autre part, la **pureté massique du SEDB avait été estimée par RMN 1H à environ 90%** (en considérant la présence d'une unique impureté, de la DCU). Cette valeur était considérée comme une **pureté massique minimale**, ce qui permettait de se trouver toujours en léger excès de SEDB lors de la synthèse des dithioesters-ligands.

ANNEXE 2**Fragmentation du SEDB au cours des analyses de spectrométrie de masse**

Pour le SEDB, aucun pic vers 324,04 n'est visible sur le spectre basse résolution en ionisation de type Electrospray (dissolution de l'échantillon dans méthanol + acétonitrile + acide formique)(Figure 1). Ainsi, il n'a pas été analysé en haute résolution par ionisation FAB.

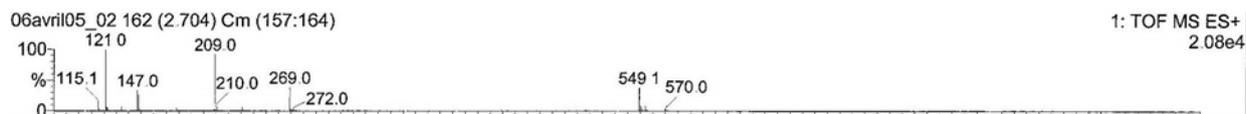


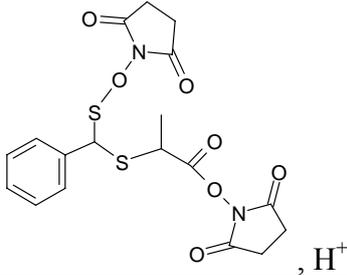
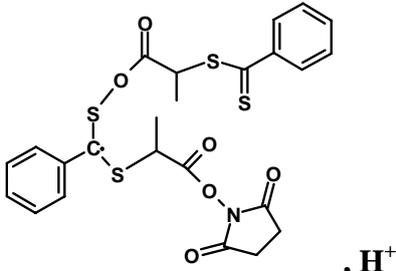
Figure 1 : Spectre général de l'analyse de type «Electrospray » du SEDB.

Remarque : D'autres pics sont visibles sur des agrandissements de ce spectre général.

Il semblerait que les conditions d'analyse en Electrospray induisent une fragmentation totale du SEDB car de nombreux pics peuvent correspondre à des fragments du SEDB voire même à des recombinaisons de ces fragments (cf. Tableau 5).

Tableau 5 : Structures supposées visibles sur le spectre de masse Electrospray du SEDB

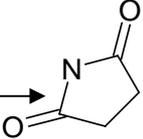
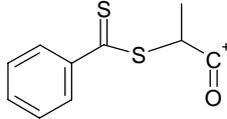
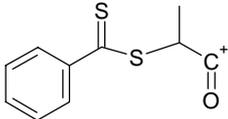
Structure	Masse calculée	Masse expérimentale
$C_4H_4NO_3, H^+$	115,03	115,1
	121,01	121,0
	209,01	209,0
	225,00	225,2
	324,04	Aucun pic !
	341,04	341,1

	439,06	439,0
	549,04	549,1

D'après M. Guy Dessalces, responsable du service spectrométrie de masse du SCA, bien que ces structures proposées de masse 341, 439 et 549 soient atypiques, elles ne peuvent pas être totalement écartées.

Cependant, il propose une autre explication basée sur une cationisation de type $[2M+H]^+$. Celle-ci devrait donner un pic à 647 qui n'est pas observé, mais la fragmentation de cette structure permet de retomber sur les masses des pics observés (cf. Tableau 6):

Tableau 6 : Autres structures supposées visibles sur le spectre de masse Electrospray du SEDB

« Structure »	Masse calculée	Masse expérimentale
$[2M+H]^+ - C_4H_4N_1O_2$ 	549,04	549,1
$[2M+H]^+ -$  $+ H^+$	439,06	439,0
$[2M+H]^+ - C_4H_4N_1O_2 -$  $+ H^+$	341,04	341,1

ANNEXE 3**Nature du pic gaussien mobile visible sur certains spectres RMN ^1H des dithioesters-ligands.**• MEDBA

Un large pic d'allure gaussienne (visible selon les spectres entre 3,5 et 7,5 ppm) est toujours visible sur les spectres de la MEDBA non lavée à l'eau. Sur ces mêmes spectres, la valeur de l'intégrale correspondant au proton de la fonction amide ($10'$ à 6,98 ppm, Figure 2) est largement sous-estimée. Or, après l'élimination quantitative du NHS, le pic gaussien a disparu et l'intégrale $10'$ donne une valeur enfin parfaitement cohérente très proche de 1 (par rapport au proton $2'$ fixé à 1). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse d'une interaction, par liaison hydrogène, entre la fonction amide et le NHS formant un « complexe » cyclique détectable en RMN (Figure 2):

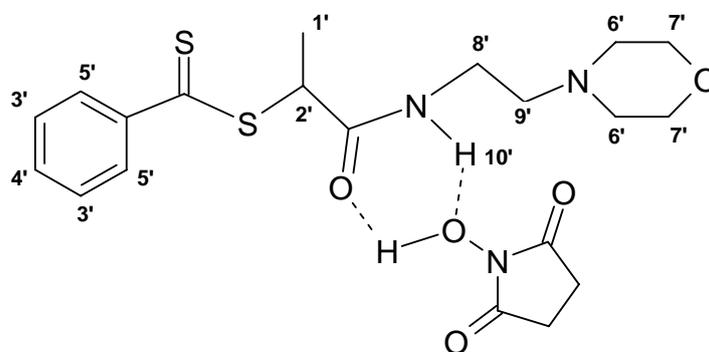


Figure 2 : cyclisation supposée entre la fonction amide et le NHS

Cette « cyclisation » modifierait l'environnement électronique de la molécule, ce qui expliquerait la légère modification de l'ensemble des déplacements chimiques, observée après l'étape de lavage à l'eau:

N° proton	Décalage (ppm) après lavage
$3', 4', 5'$	+ 0,01
$1'$	+ 0,01 à 0,02
$2'$	+0,02 à 0,03
$9'$	- 0,11
$6'$ et $8'$	~ - 0,20
$7'$	- 0,05 à 0,06
$10'$	~ - 0,10

De plus, l'ajout de NHS dans un tube de RMN dont l'analyse comporte le pic gaussien a permis de mettre en évidence deux types de NHS : NHS cyclisé (2,62 ppm) et NHS libre (2,82 ppm).

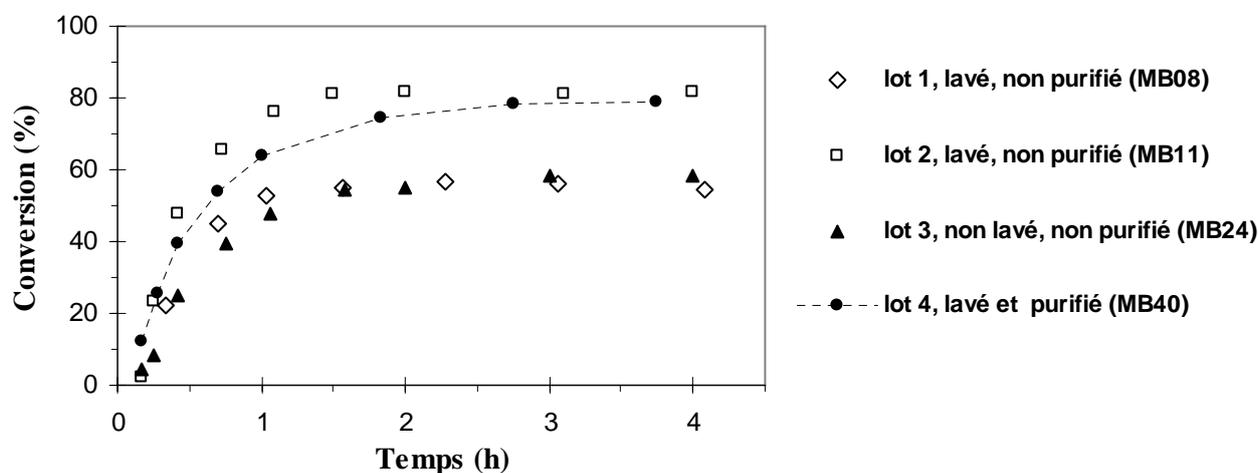
ANNEXE 4**Effet des impuretés (présentes dans les dithioesters) sur les cinétiques de polymérisation RAFT de la NAM.**

Figure 5 : Cinétique de polymérisation RAFT de la NAM en présence de différents lots de **MEDBA**.
[cond. exp. : cf. p.117 ; $[NAM]_0/[ATC]_0 = 355$]

Pour tous les essais de polymérisation présentés dans la Figure 5 et la Figure 6 (page suivante), le degré de pureté des dithioesters utilisés est pris en compte afin de respecter le rapport initial $[ATC]_0/[AIBN]_0$ désiré (=10).

Toutes ces polymérisations présentent des valeurs de M_n expérimentales très proches des valeurs théoriques. De plus les valeurs des I_p sont également faibles (<1,2). Cela signifie que :

- les polymérisations restent contrôlées malgré la présence d'impureté (et malgré un effet flagrant sur les cinétiques).
- (avec parfois un peu de chance), l'estimation de la pureté massique par RMN est proche de la réalité.

Tableau 7 : Pureté massique des différents lots d'ATC utilisés.

Lot de ATC	MEDBA				BEDBA	
	lot 1	lot 2	lot 3	lot 4	lot 1	lot 2
Pureté massique	75%*	70%*	61%*	98%	60%*	97%

* : estimation de la pureté à partir du spectre RMN 1H .

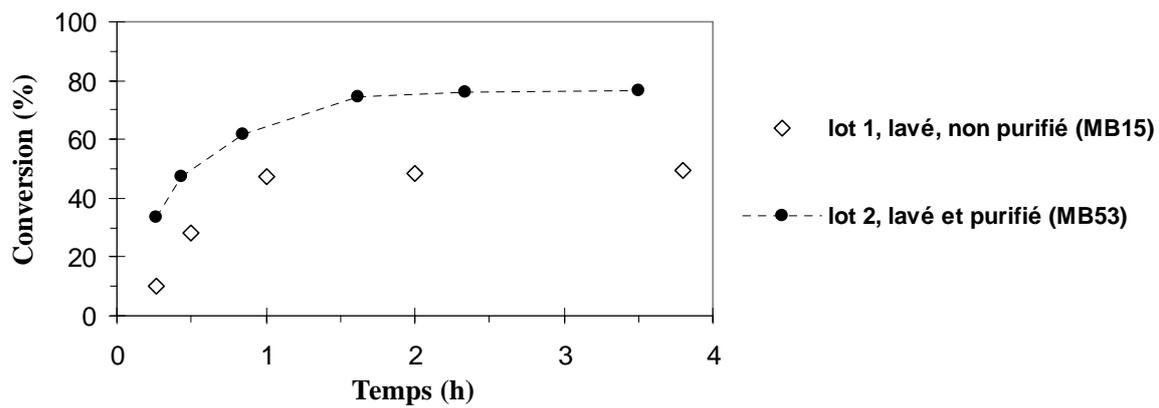


Figure 6 : Cinétique de polymérisation RAFT de la NAM en présence de différents lots de **BEDBA**.
[cond. exp. : cf. p.117 ; $[NAM]_0/[ATC]_0 = 355$]

ANNEXE 5**Spectrométrie de masse MALDI-ToF avec du THF non distillé.**

I-1. polyNAM-morpholine

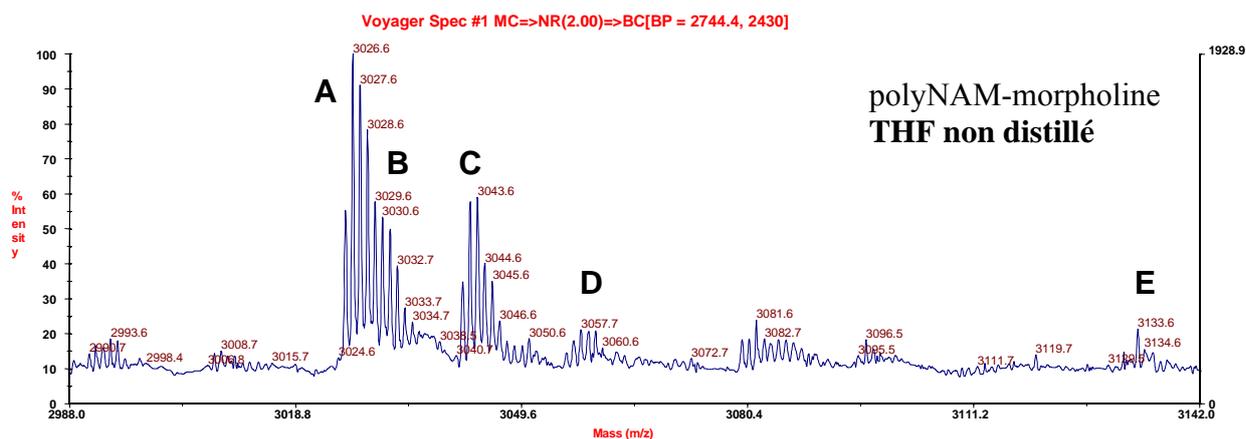
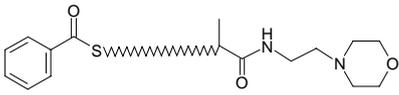
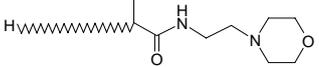
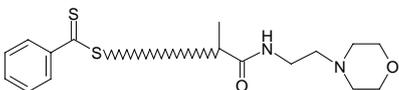
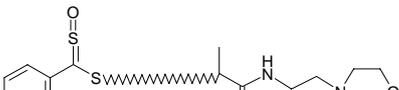
Echantillon analysé : MB43-T3 ; 56% de conversion ; $M_{n\text{théo.}} = 2600$ g/mol ; $M_{n\text{MALDI}} = 3218$ g/mol ; $I_{p\text{MALDI}} = 1,06$.

Figure 7 : Spectre MALDI-TOF (mode réflectron) de l'échantillon MB43-T3, zoom sur le degré de polymérisation majoritaire (DP=19).

Tableau 8 : Structures correspondantes aux pics de la Figure 7.

Pic	Masse monoisotopique		Structure	Cationisation	DP
	expérimentale	théorique			
A	3025,6	3025,5	 espèce oxydée	Na	19
B	3030,6	3030,7	 espèce fragmentée	Na	20
C	3041,6	3041,6	 espèce attendue	Na	19
		3041,6	espèce oxydée	K	19
D	3055,7	3057,7	espèce attendue	K	19
		3057,6	 espèce oxydée (sulfine)	Na	19
E	3133,6	3133,5	espèce attendue	In (Indium)	19

Les chaînes amorcées par l'AIBN ($+Na^+$: 3065,6 m/z) ne sont pas visibles : aucun pic ne correspond. Une cationisation Indium¹ a été envisagée car on retrouve systématiquement une population à +92m/z par rapport à l'espèce attendue et ce quel que soit la nature de l'extrémité de chaîne (morpholine, lipide, sucre). Elle n'est visible uniquement que sur les spectres réalisés avec du THF non distillé ; il peut peut-être s'agir d'un contaminant du THF qui offre une bonne désorption/ionisation.

¹ Isotope le plus abondant étant le second isotope de masse 114,9039 g/mol.

I-2. polyNAM-sucre

Echantillons analysés : MB45-T2 ; 59% de conversion ; $Mn_{théo.} = 2800$ g/mol ;
 $Mn_{MALDI} = 2935$ g/mol ; $Ip_{MALDI} = 1,03$.

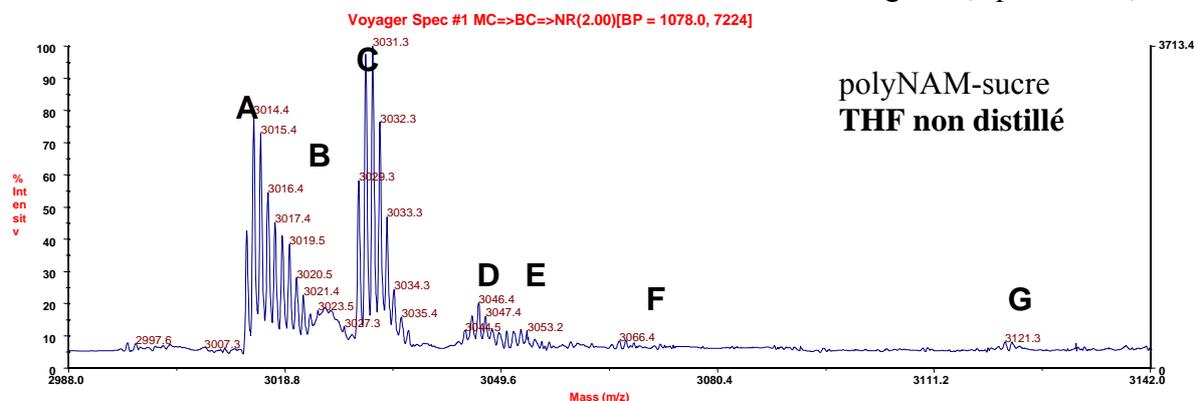
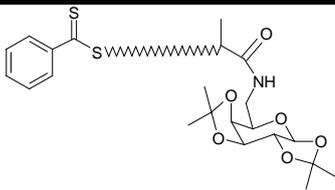
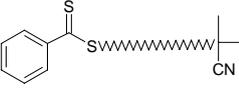


Figure 8 : Spectre MALDI-TOF (mode réflectron) de l'échantillon MB45-T2, zoom sur le degré de polymérisation majoritaire (DP=18).

Tableau 9 : Structures correspondantes aux pics des figures Figure 8.

Pic	Masse monoisotopique		Structure	Cationisation	DP
	expérimentale	théorique			
A	3013,4	3013,5	espèce oxydée	Na	18
B	3018,5	3018,6	espèce fragmentée	Na	19
C	3029,3	3029,5	 espèce attendue	Na	18
		3029,6	espèce oxydée	K	18
D	3044,5	3045,7	espèce attendue	K	18
		3045,5	espèce oxydée (sulfine)	Na	18
E	3049,4	3049,5	espèce oxydée amorcée par l'AIBN	Na	20
F	3065,4	3065,6	 espèce amorcée par l'AIBN	Na	20
G	3121,3	3121,4	espèce attendue	In (Indium)	18

I-3. polyNAM-lipide

Echantillons analysés : DD5-T2 ; 11% de conversion ; $Mn_{théo.} = 1900$ g/mol ;
 $Mn_{MALDI} = 2490$ g/mol ; $Ip_{MALDI} = 1,10$.

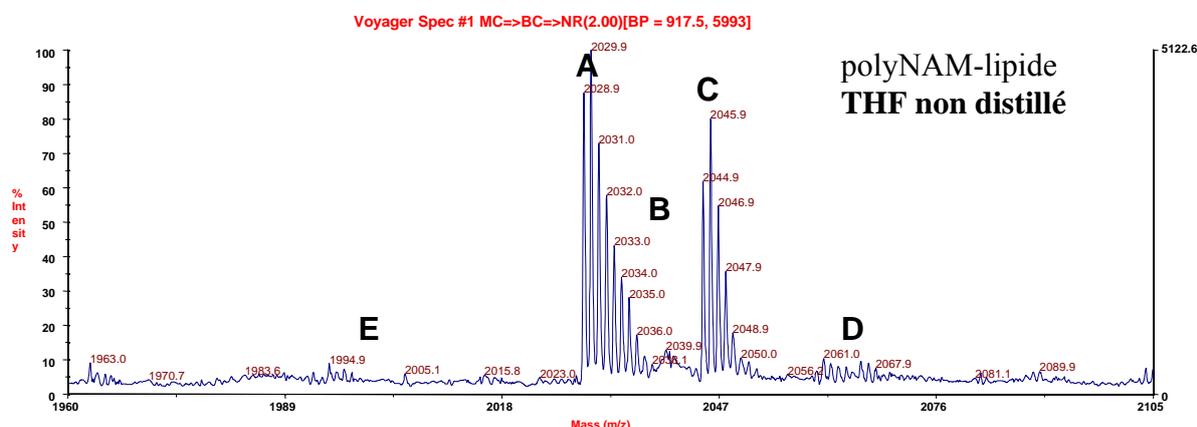
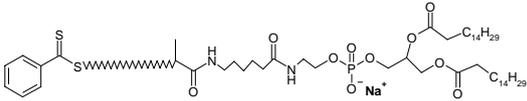
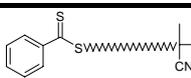


Figure 9 : Spectre MALDI-TOF (mode réflectron) de l'échantillon DD5-T2, zoom sur le degré de polymérisation majoritaire (DP=7).

Tableau 10 : Structures correspondantes aux pics des figures Figure 9.

Pic	Masse monoisotopique		Structure	Cationisation	DP
	expérimentale	théorique			
A	2028,9	2029,1	espèce oxydée	Na	7
B	2034,0	2034,2	espèce fragmentée	Na	8
C	2044,9	2045,1	 espèce attendue	Na	7
		2045,2	espèce oxydée	K	7
D	2061,0	2061,2	espèce attendue	K	7
		2061,1	espèce oxydée (sulfine)	Na	7
E	1995,9	1996,0	espèce attendue	In (Indium)	6
	2136,9*	2137,0			7
	2278,0*	2278,1			8
F	2078,1	2078,0	 espèce amorcée par l'AIBN	Na	13
	1372,7*	1372,7			8

* visible sur d'autres agrandissements du spectre général.

I-4. polyNAM-biotine

Echantillons analysés : MB51-T2 ; 69% de conversion ; $Mn_{théo.} = 3400$ g/mol ;
 $Mn_{MALDI} = 3490$ g/mol ; $Ip_{MALDI} = 1,08$.

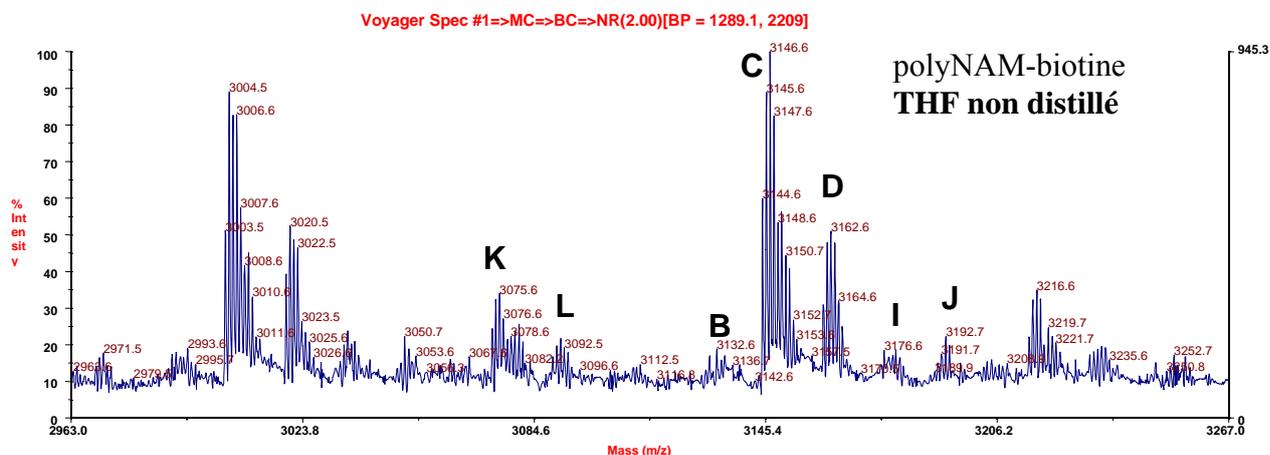
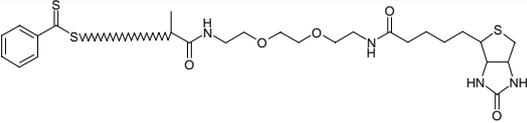
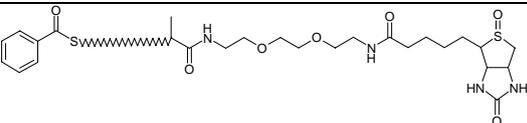
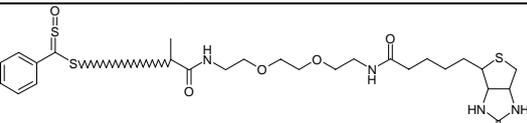
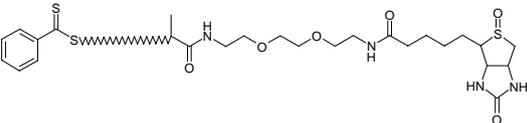
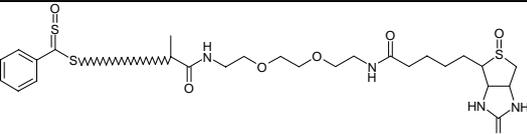


Figure 10 : Spectre MALDI-TOF (mode réflectron) de l'échantillon MB51-T2, zoom sur deux degrés de polymérisation majoritaires (DP=17 et 18).

Etonnamment, le spectre du polyNAM-biotine ne présente pas d'espèce oxydée. Par contre, l'écart de 16 m/z entre les pics C, D, I et J incite à envisager la forme sulfine y compris avec le soufre de la biotine. Cette sulfine sur la biotine peut-elle déstabiliser le cycle et induire une fragmentation de la biotine sous l'effet du laser ?

Tableau 11 : Structures correspondantes aux pics des figures Figure 10.

Pic	Masse monoisotopique		Structure	Cationisation	DP
	expérimentale	théorique			
A	<i>Pas de pic</i>	3128,5	espèce oxydée	Na	18
B	3132,6	3133,7	espèce fragmentée	Na	19
C	3144,6	3144,6	 espèce attendue	Na	18
		3144,6	espèce oxydée	K	18
		<u>3144,5</u>	 espèce oxydée avec sulfone sur la biotine	Na	18
D	3160,6	<u>3160,7</u>	espèce attendue	K	18
		3160,6	 espèce oxydée (sulfone) OU  sulfone sur la biotine	Na	18
I	3176,6	3176,7	espèce oxydée (sulfone) OU sulfone sur la biotine	K	18
		3176,6	 double sulfone	Na	18
J	3192,7	3192,7	double sulfone	K	18
K	3073,6	- 71 / espèce attendue	Fragmentation de la biotine ?	Na	18
L	3089,5			K	18

ANNEXE 6**Agrégation des conjugués polyNAM-lipide en CES aqueuse.**

Le comportement des polymère-lipides en milieu aqueux a été mis en évidence lors des analyses en chromatographie d'exclusion stérique en tampon borate 50mM (pH= 9,3). En effet, avec les polymères ne présentant pas de phénomène d'agrégation (poly(NAM)-Morpholine par exemple), la trace réfractométrique ne présente qu'un seul pic **3** (courbe rouge de la Figure 12) ; la trace de diffusion de la lumière (DDL), sensible à une très faible quantité de poly(NAM) de haute masse molaire², présente un second pic vers des volumes d'éluion plus faibles (pic **1** de la courbe rouge de la Figure 11). L'analyse dans les mêmes conditions d'un polymère-lipide de même masse molaire théorique (38.000 g/mol) offre des signaux réfractométriques et DDL bien plus faibles (avec normalement la même quantité injectée) avec la présence d'objets (« pic » **2**) entre les pics **1** et **3** (courbe orange de la Figure 11). De plus, le retour à la ligne de base du signal DDL après le pic **3** est extrêmement lent (retour après environ 40 mL).

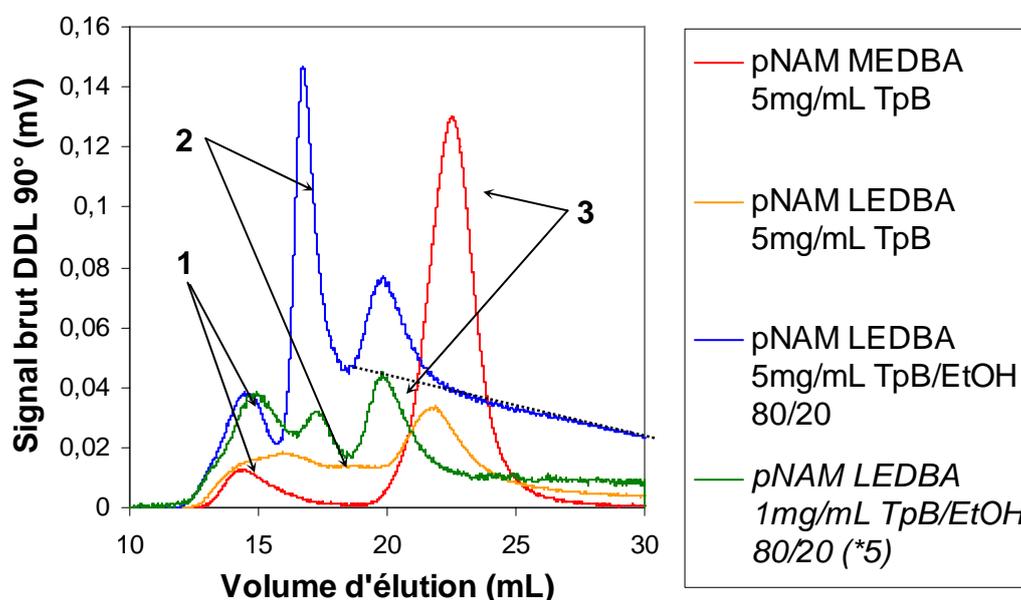


Figure 11 : Signal brut DDL (90°) des analyses CES/DDL comparées de poly(NAM)-Morpholine (MB40-T7) et poly(NAM)-Lipide (MB42-T6) de masses molaires identiques ($M_{n,théo.} = 38.000\text{g/mol}$) dans différentes conditions d'analyses.

[5mg/mL → concentration en polymère de l'échantillon injecté]
 [TpB/EtOH 80/20 → éluant = mélange tampon borate 50mM/éthanol, 80/20, v/v]
 [(*)5 → signal brut multiplié par 5]

² présent initialement dans le flacon de NAM, même après distillation de ce dernier !

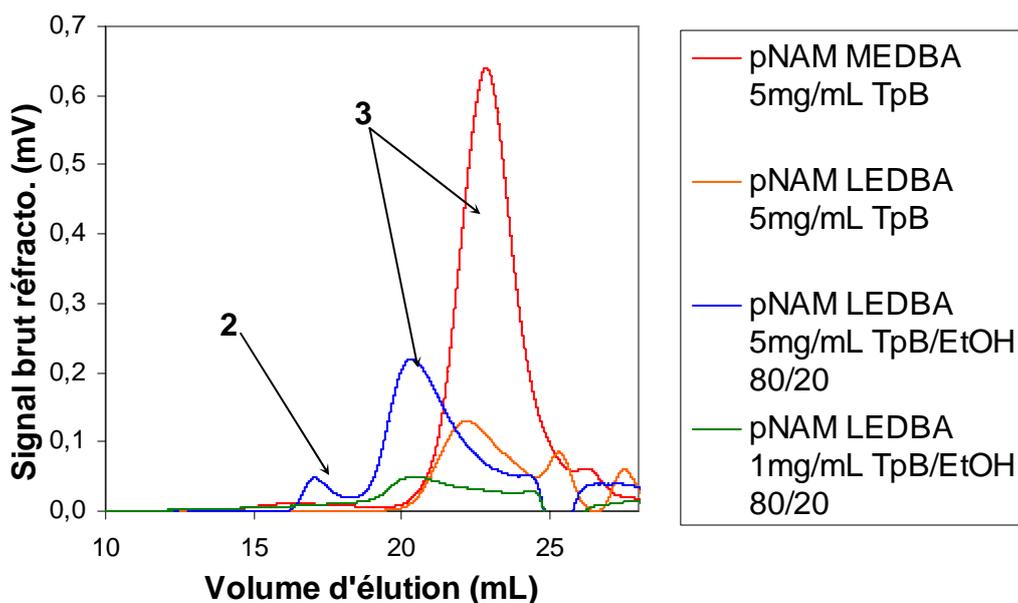


Figure 12 : Signal brut réfractométrique des analyses CES/DDL comparées de poly(NAM)-Morpholine (MB40-T7) et poly(NAM)-Lipide (MB42-T6) de masses molaires identiques ($M_{n\text{théo.}} = 38.000\text{g/mol}$) dans différentes conditions d'analyses.

L'ajout de 20% volumique³ d'éthanol (bon solvant du lipide) dans l'éluant, fait apparaître un nouveau pic (pic 2 de la courbe bleue) sur les deux détecteurs tout en permettant de retrouver des intensités de signaux exploitables. Ce changement d'éluant modifie également le volume d'éluant du pic d'« unimère » 3 mais sans en modifier sa forme (retour à la ligne de base toujours problématique). L'étroitesse du nouveau pic 2 laisse supposer qu'il s'agit d'un **pic de « micelles » de polymère-lipides**. La diminution de son intensité relative par rapport à celle du pic d'« unimères » lorsque l'échantillon est injecté plus dilué⁴ (1mg/mL, courbe verte) semble confirmer cette attribution : pour une concentration plus faible, le rapport « unimères » / « micelles » augmente.

La présence de ce pic, avec l'absence du retour à la ligne de base, perturbe beaucoup l'exploitation du pic d'unimère afin de déterminer sa masse molaire moyenne en nombre. Cependant, une attribution arbitraire mais systématique d'une ligne de base (ligne en pointillés sur la Figure 11) a permis de calculer des valeurs de M_n « relatives » à ce positionnement de la ligne de base.

De plus, l'effet de la température des colonnes du système chromatographique a également été exploré pour un seul échantillon (MB42-T5, $M_{n\text{théo.}} = 32.400\text{ g/mol}$): cf. Figure 13.

³ quantité maximale de solvant organique acceptée par les colonnes du système chromatographique (colonnes Ultrahydrogel 500 et 2000, Waters). Echantillon polymère-lipide dissous dans l'éthanol pur puis ajout du tampon borate.

⁴ Autre échantillon dissous dans un volume plus important d'éluant.

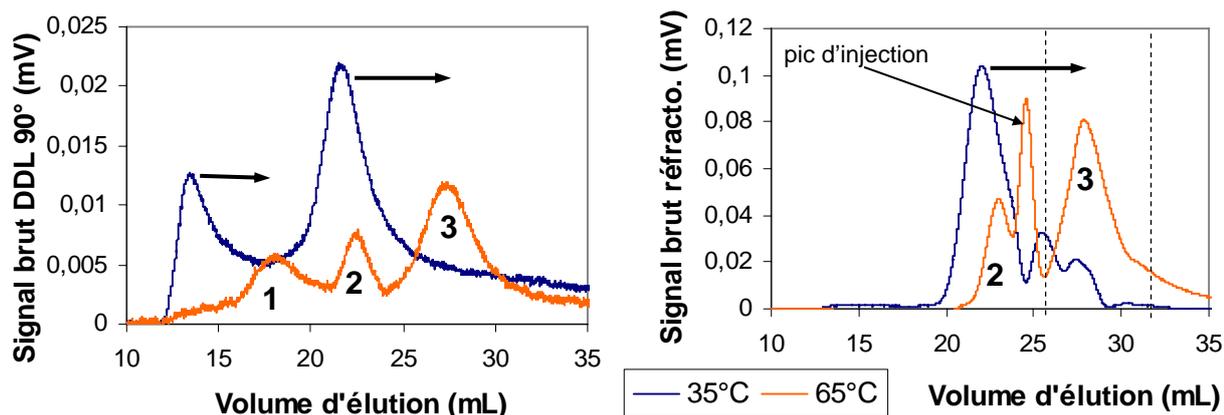


Figure 13 : Effet de la température sur l'analyse de l'échantillon MB42-T5 ($M_{n_{théo.}} = 32.400$ g/mol)
[échantillon à 5 mg/mL dans tampon borate 50 mM]

L'augmentation de 30°C de la température des colonnes induit une augmentation des volumes d'élution (+ 5-6 mL) et fait également apparaître un pic de « micelles » (pic **2**) (« micellisation » favorisée par la température ?). Cependant, contrairement à l'utilisation d'éthanol dans l'éluant, les signaux réfractométriques et DDL restent faibles. De plus, l'augmentation de la température semble amplifier l'intensité du pic d'injection⁵, ce qui rend ce pic plus grand que celui des unimères (pic **3**). Le calcul de la distribution des masses molaires du pic **3** (bornes = traits verticaux en pointillés de la Figure 13) donne $M_n = 32.800 \pm 3.000$ g/mol et $I_p = 1,05 \pm 0,12$. Ces résultats sont très proches de ceux attendus ; Les pic **2** et **3** étant presque résolus, ces résultats peuvent être considérés comme relativement fiables si la valeur de dn/dc du poly(NAM)-lipide à 65°C est proche de celle du poly(NAM) à 35°C (0,163). Ils semblent indiquer un contrôle effectif de la polymérisation du NAM en présence de LEDBA.

⁵ artefact du signal réfractométrique qui est généralement d'intensité négligeable par rapport au pic du polymère.

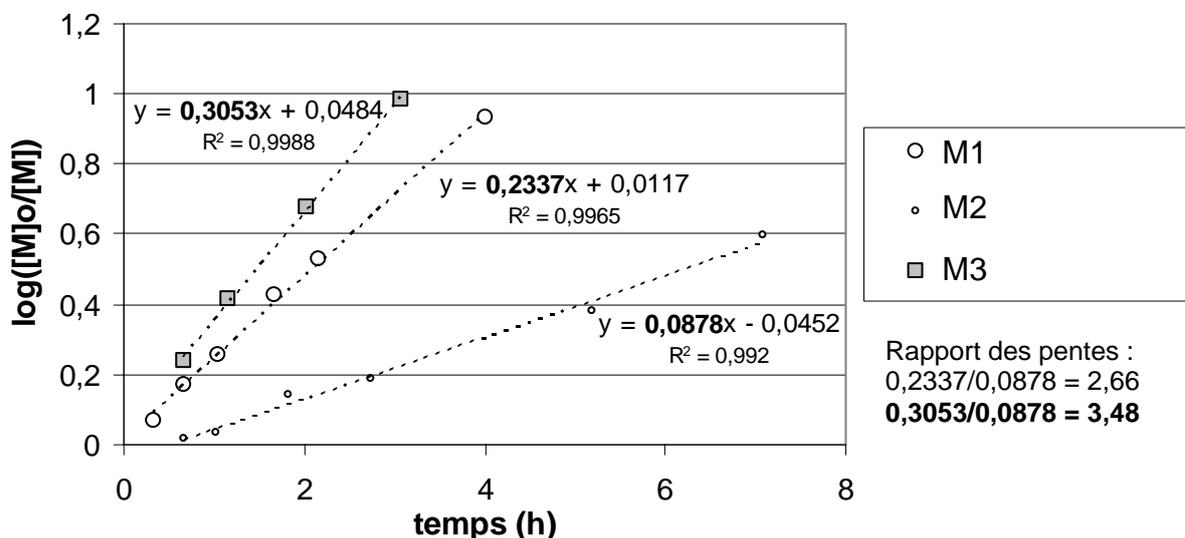
ANNEXE 7**Estimation de la concentration en radicaux propageant au cours de la copolymérisation RAFT du NAM avec le NAS (essai M3)**

Figure 14 : Graphe $\log([M]_0/[M]) = f(\text{temps})$ des essais M1, M2 et M3

Vitesses de disparition des deux comonomères (NAM : indice 1 ; NAS : indice 2) :

$$\frac{d[\text{NAM}]}{dt} = -k_1 \cdot [\text{NAM}] \cdot [\text{P}_1] - k_{2/1} \cdot [\text{NAM}] \cdot [\text{P}_2] ; \frac{d[\text{NAS}]}{dt} = -k_2 \cdot [\text{NAS}] \cdot [\text{P}_2] - k_{1/2} \cdot [\text{NAS}] \cdot [\text{P}_1] \text{ avec}$$

P_1 = macroradical terminé par une unité NAM

et P_2 = macroradical terminé par une unité NAS

En considérant l'état quasi-stationnaire : $\frac{d[\text{P}_1]}{dt} = \frac{d[\text{P}_2]}{dt} = 0$, soit $[\text{P}_1] = \text{cte}$ et $[\text{P}_2] = \text{cte}$.

D'où, après intégration : $\ln\left(\frac{[\text{NAM}]_0}{[\text{NAM}]}\right) = (k_1 \cdot [\text{P}_1] + k_{2/1} \cdot [\text{P}_2]) \cdot t$ et

$$\ln\left(\frac{[\text{NAS}]_0}{[\text{NAS}]}\right) = (k_2 \cdot [\text{P}_2] + k_{1/2} \cdot [\text{P}_1]) \cdot t$$

Or, parce qu'on est à la **composition azéotrope** (conversion totale égale aux deux conversions partielles), les pentes des graphes $\ln([\text{NAM}]_0/[\text{NAM}])=f(\text{temps})$ et $\ln([\text{NAS}]_0/[\text{NAS}])=f(\text{temps})$ sont égales. De plus, elles sont supérieures de 3,48 fois à celles du graphe de l'essai d'homopolymérisation M2 (cf. Figure 14) :

$$\text{donc, } k_1 \cdot [\text{P}_1] + k_{2/1} \cdot [\text{P}_2] = k_2 \cdot [\text{P}_2] + k_{1/2} \cdot [\text{P}_1] = 3,48 \cdot k_1 \cdot [\text{P}_1]_{\text{hom}} \quad (1)$$

$$\text{A partir de la première égalité : } [\text{P}_2] = \frac{k_1}{k_2} \cdot \left(\frac{1 - 1/r_1}{1 - 1/r_2} \right) \cdot [\text{P}_1] = \frac{k_1}{k_2} \cdot \beta \cdot [\text{P}_1],$$

r_1 et r_2 étant les rapports de réactivité.

En remplaçant cette expression de $[P_2]$ dans le premier terme de (1), on obtient :

$$[P_1] \left(1 + \frac{1-1/r_1}{r_2-1} \right) = 3,48 \cdot [P_1]_{\text{homo}} \text{ soit, avec } \alpha = \left(1 + \frac{1-1/r_1}{r_2-1} \right), [P_1] = \frac{3,48}{\alpha} \cdot [P_1]_{\text{homo}} .$$

En utilisant les valeurs des rapports de réactivité déterminés en copolymérisation conventionnelle* ($r_1=0,75$ et $r_2=0,63$), $\alpha = 1,90$ et $\beta = 0,57$;

$$\text{d'où } [P_1] = 1,83 \cdot [P_1]_{\text{homo}} .$$

$$\text{Au final : } [P_1] + [P_2] = \left(1 + 0,57 \cdot \frac{k_1}{k_2} \right) \cdot 1,83 \times [P_1]_{\text{homo}} .$$

Ainsi, si $k_2 \sim k_1$, $[P_1] + [P_2] = 2,9 \times [P_1]_{\text{homo}}$ et même si $k_2 = 10 \cdot k_1$, $[P_1] + [P_2] = 1,9 \times [P_1]_{\text{homo}}$.

Il semble donc bien qu'il y ait **plus de radicaux propageant au cours de la copolymérisation NAM/NAS 60/40 qu'au cours de l'homopolymérisation de la NAM** (avec un flux de radicaux primaire identique). La présence du NAS semble donc défavoriser les réactions de terminaison, ce qui est plutôt cohérent avec une viscosité plus élevée.

* F. D'Agosto, M.T. Charreyre, L. Véron, M.-F. Llauro and C. Pichot, "Kinetic Study of Free-Radical Solution Copolymerization of N-Acryloylmorpholine with an Activated Ester-Type Monomer, N-Acryloxysuccinimide", Macromol Chem Phys **202** (2001), p. 1689.

ANNEXE 8

Analyse de la distribution des masses molaires dans le cas des polymérisations RAFT visant des masses molaires élevées.

L'intérêt de la représentation de la distribution de masses molaires « Concentration molaire en chaîne = $f(M_i)$ » est qu'elle permet une visualisation directe de l'évolution des chaînes en cours de polymérisation. Elle a été appliquée à l'essai de référence AF137 afin de mieux comprendre le phénomène de stagnation des masses molaires.

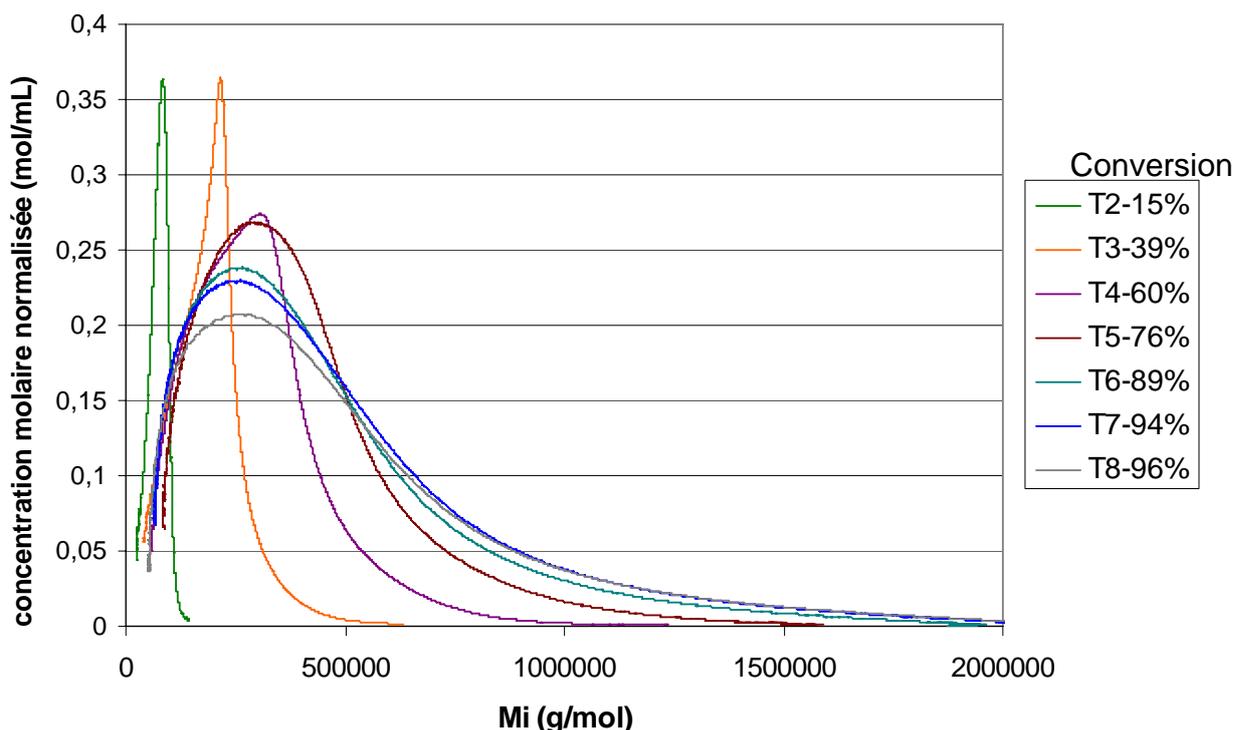


Figure 15 : Graphes généraux $c_{i, \text{norm}} = f(M_i)$ pour différents prélèvements de l'essai AF137

Les graphes de la Figure 15 mettent clairement en évidence deux phénomènes simultanés : stagnation puis diminution de la masse molaire de la population majoritaire en mole (sommet des pics) mais aussi traînée de très grandes chaînes (>80.0000 g/mol) de plus en plus importante avec la conversion (phénomène invisible sur l'évolution des M_n en fonction de la conversion). La Figure 16 permet de quantifier facilement la proportion de telles chaînes : jusqu'à 60% de conversion elles sont quasi-inexistantes ($<0,5\%$), à 76%, elles représentent 2% de la totalité de chaînes, puis 4% à 89% de conversion, et enfin 5% à 96% de conversion.

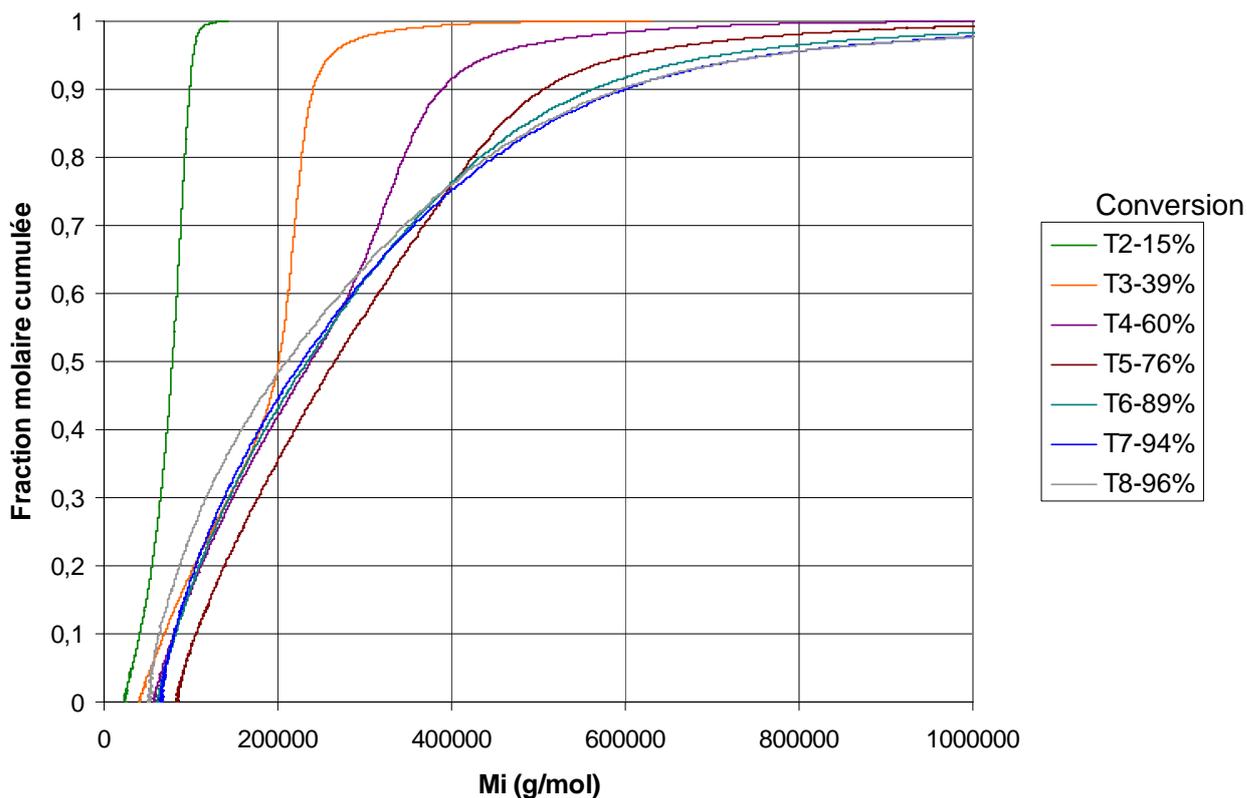


Figure 16 : Fraction molaire cumulée = $f(M_i)$ pour différents prélèvements de l'essai AF137

La Figure 16 permet également de bien visualiser la stagnation de la croissance des chaînes de masse inférieure à 200000g/mol (les graphes T3 et T4 paraissent « déformés » par rapport à l'allure du graphe T2) puis ensuite la formation de telles chaînes (après T5 elles apparaissent plus importantes et le début de la distribution commence plus tôt).

La formation de ces nouvelles chaînes est responsable de la stagnation des masses molaires moyennes en nombre avec la conversion. Pour expliquer cette formation, deux hypothèses peuvent être émises :

- il existe une source de radicaux inconnue⁶ qui influe sur la polymérisation à partir d'une certaine conversion.
- Le poly(NAM) subit des réactions de transfert au polymère suivi d'une β -scission du radical en milieu de chaînes. Ce type de réaction est bien connu dans le cas de la polymérisation des monomères acrylates⁷.

Cependant, d'après la longueur des nouvelles chaînes créées, l'hypothèse d'une source de radicaux inconnue est physiquement difficilement concevable. En effet, la Figure 17 indique que ces nouvelles chaînes ont une masse molaire supérieure à 60.000g/mol ! Une croissance si rapide (en moins de 15% de conversion) d'une chaîne à partir d'un radical primaire est difficilement imaginable. Pire encore, la formation de beaucoup de nouvelles chaînes (pas si petite que ça !) dans un milieu appauvri en monomère à la fin de la polymérisation (entre T7 et T8) écarte totalement l'hypothèse d'un flux de nouveaux radicaux primaires.

⁶ L'amorçage thermique du NAM est totalement exclu compte tenu des conditions : température de « seulement » 60°C, début du phénomène dès les quelques premières heures de la polymérisation

⁷ E.Sato, T.Emoto, P.B.Zetterlund, B.Yamada, *Macromol. Chem. Phys.*, **2004**, 205, 1829–1839

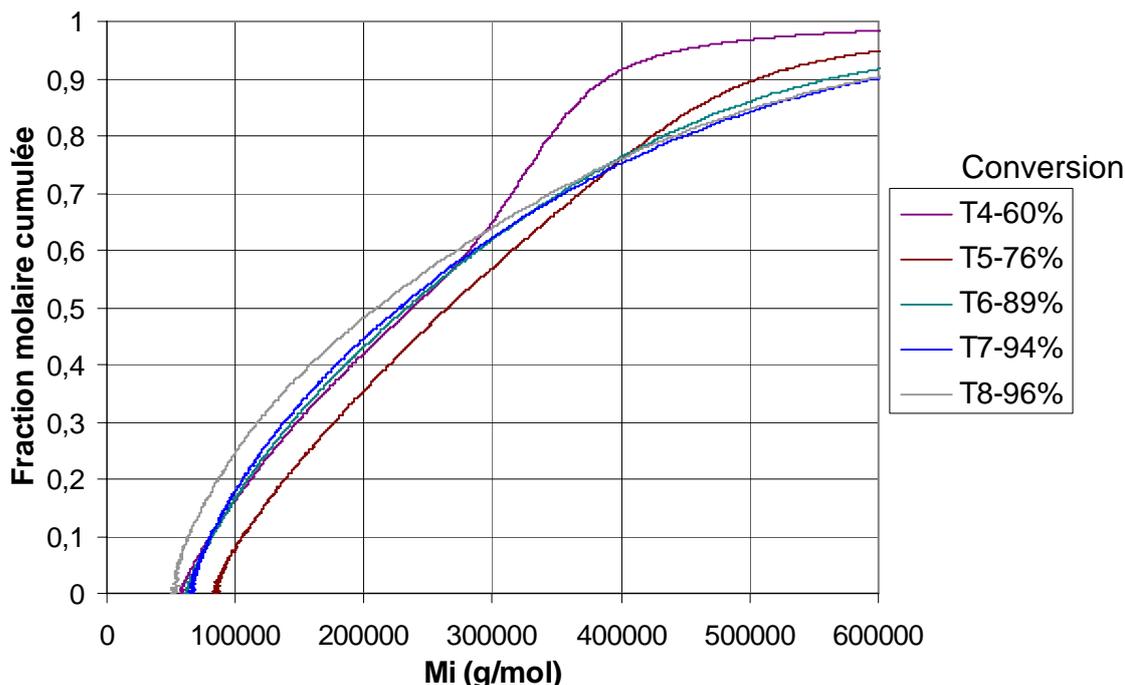


Figure 17 : Apparition des chaînes de « faibles » masses molaires dans l'essai AF137

A l'inverse, l'hypothèse de transfert au polymère suivi de β -scission colle parfaitement à de telles observations. En effet, ce phénomène est doublement favorisé par des conversions élevées : premièrement, une augmentation de la concentration en polymère favorise les réactions de transfert au polymère pour former un radical en milieu de chaîne (RMC), deuxièmement, la fragmentation de ce RMC est favorisée par rapport à une réaction de propagation (\rightarrow branchement) avec la diminution de la concentration en monomère.

De plus, ce phénomène est également fortement suspecté à forte conversion pendant la polymérisation conventionnelle de la NAM (cf. chapitre 3, §.I-3.b)

Concernant la formation des très grandes chaînes, elle semble également n'être plus négligeable à partir de 60% de conversion, conversion à partir de laquelle le milieu est « figé » et l'agitation bloquée. L'hypothèse d'un « effet de gel » tel que celui fortement suspecté dans la copolymérisation NAM/NAS (essai M3) est également envisageable pour toutes les polymérisations « grandes chaînes ». Cependant, la formation de chaînes branchées (propagation à partir d'un RMC) suite à des réactions de transfert au polymère permet également d'obtenir des chaînes plus longues que la population majoritaire. Mais la création de tels branchements (obligatoirement plusieurs par chaînes) permet-elle vraiment d'atteindre des masses molaires si élevées ? Il est assez peu probable que la propagation à partir de RMC puisse conduire à des branchements suffisamment longs pour augmenter si fortement la masse molaire d'une chaîne branchée. En effet, le transfert au polymère semble se produire « fréquemment » à partir du moment où la probabilité de propagation diminue (moins de monomère dans le milieu), donc la propagation à partir de RMC est également réduite. Ainsi, à partir d'une certaine conversion, les RMC donneraient préférentiellement soit des branchements courts soit deux chaînes polymère après fragmentation.

D'autre part, si les réactions de branchements sont responsables de la traînée de chaînes de très grande masse, celles-ci devraient également modifier la distribution des masses molaires lors d'une polymérisation qui vise 50.000g/mol à 100% de conversion. Une telle condition est remplie avec essai AF115 (autres conditions de polymérisation identiques à AF137).

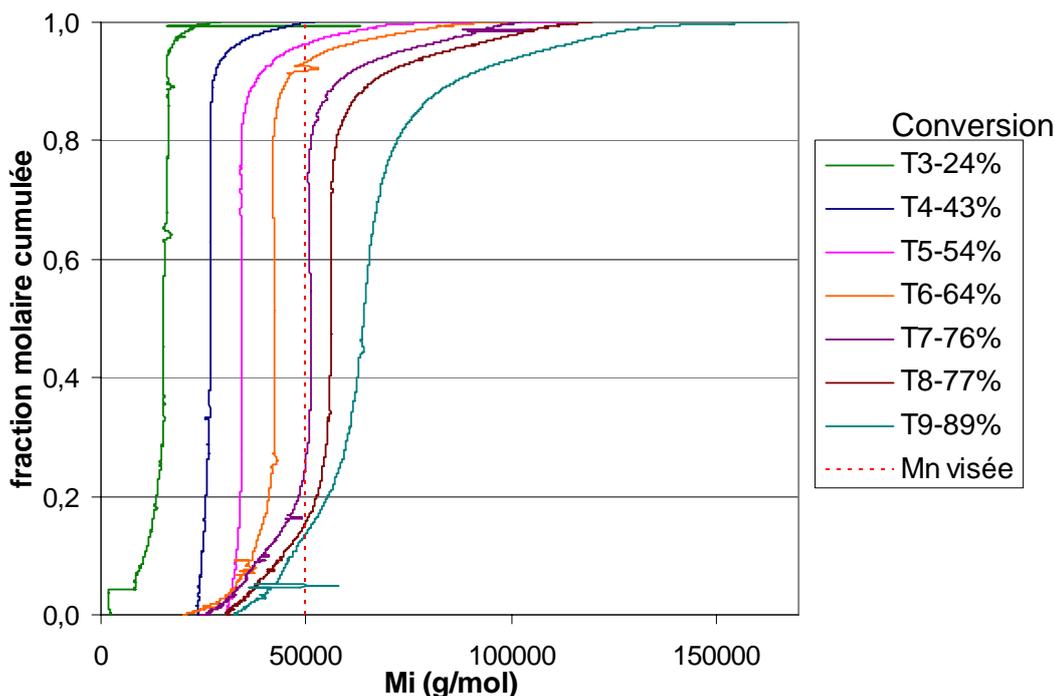


Figure 18 : Fraction molaire cumulée = $f(M_i)$ pour différents prélèvements de l'essai AF115

L'évolution des courbes de la Figure 18 montre une limitation de la croissance des plus petites chaînes accompagnée d'une augmentation de la fraction des plus grandes chaînes après 60% de conversion. Les mêmes phénomènes ont donc bien lieu lorsque la masse visée est 10 fois plus petite mais ils sont extrêmement limités et ne perturbent pas le contrôle de la polymérisation ($I_p=1,07$ pour AF115-T9, cf. Figure 20).

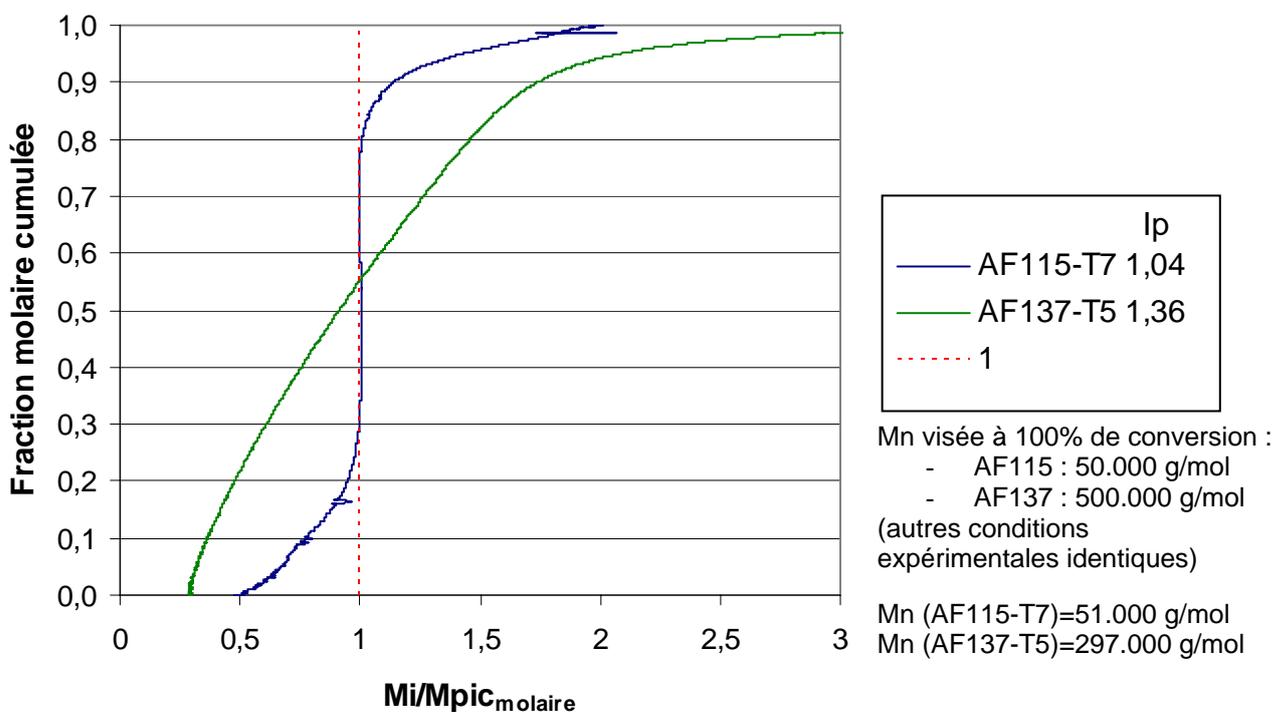


Figure 19 : Comparaison AF115 et AF137 à même conversion (76%)

Afin de s'affranchir d'une masse visée à 100% de conversion différente, la Figure 19 présente la fraction molaire cumulée en fonction de la masse molaire rapportée à la masse molaire de la population majoritaire en mole ($M_{pic_{molaire}}$)⁸. Elle met clairement en évidence l'effet de la masse visée : la fraction de plus petites chaînes, formées par transfert au polymère puis β -scission, est bien plus importante lorsque la masse visée est 10 fois supérieure c'est-à-dire lorsque les chaînes polymère sont bien plus grande (M_n 6 fois plus grand). Alors que les concentrations en monomère et en polymère sont identiques pour les deux essais, les réactions de transfert au polymère semblent donc être favorisées par une grande longueur de chaîne. Cela semble indiquer une diffusion du monomère réduite dans un milieu présentant un enchevêtrement de grandes chaînes (>100.000g/mol) par rapport à un milieu contenant des chaînes de longueur moyenne (10.000-50.000g/mol). Cela supporte l'hypothèse de branchements courts mais semble contradictoire avec l'idée d'un « effet de gel » dans lequel une chaîne en croissance « isolée » pourrait additionner un grand nombre d'unité monomère. Cependant, cette chaîne active « isolée » pourrait très bien transférer sur elle-même en « attendant » la diffusion du monomère. Ainsi, les chaînes de très grandes masses (>1.000.000 g/mol) seraient des chaînes avec un nombre très important de branchements courts (\rightarrow chaînes hyperbranchées ?). Les réactions de transfert au polymère suivies d'une propagation à partir du RMC peuvent donc participer à la formation de très grandes chaînes mais cette participation n'exclut pas l'existence d'un « effet de gel » qui tend à isoler certaines chaînes actives du processus d'addition-fragmentation du mécanisme RAFT. De plus, cet « effet de gel » ne doit pas être vu uniquement comme un effet d'une augmentation importante de la viscosité (vision macroscopique) mais également comme une réduction importante de la mobilité des espèces présentes dans le milieu de polymérisation (vision à l'échelle moléculaire) : avec une augmentation de la longueur de chaîne, non seulement la mobilité des espèces polymères (chaînes actives et chaînes dormantes) se trouve très réduite (\rightarrow diminution importante de la probabilité d'addition sur une chaîne dormante) mais aussi celle du monomère diminue (nécessité de diffuser entre les chaînes \rightarrow probabilité de transfert au polymère augmente).

Afin de tenter de découpler les effets des deux phénomènes mis en jeu (transfert au polymère et « effet de gel »), la Figure 21 présente l'évolution de la distribution des masses molaires en fonction de la conversion pour l'essai MB40 (cf. conditions expérimentales en début du chapitre 3). A 90°C avec une concentration en monomère initiale de 1,6mol/L et en visant 50.000g/mol à 100% de conversion, le milieu de polymérisation reste toujours liquide (pas de problème pour l'agitation magnétique) contrairement à l'essai AF115 (milieu extrêmement visqueux en fin de polymérisation et agitation réduite). L'évolution des graphes de l'essai MB40 montre clairement la formation relativement importante de plus petites chaînes à partir de 75% de conversion (plateau de conversion) mais pratiquement aucune évolution des plus grandes chaînes. Cette observation colle parfaitement à l'augmentation des indices de polymolécularité après 75% de conversion (Figure 20).

⁸ Pour ces deux échantillons, AF115-T7 et AF137-T5, $M_{pic_{molaire}} \sim M_n$; c'est souvent le cas mais pas toujours notamment avec les copolymérisations NAM/NAS (parfois $M_{pic_{molaire}} < M_n$).

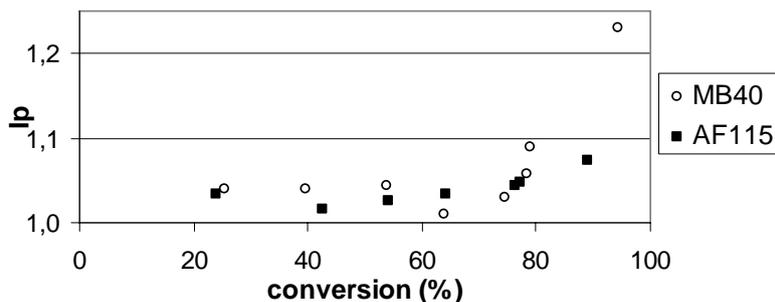


Figure 20 : Evolution des indices de polymolécularité avec la conversion pour les essais MB40 et AF115

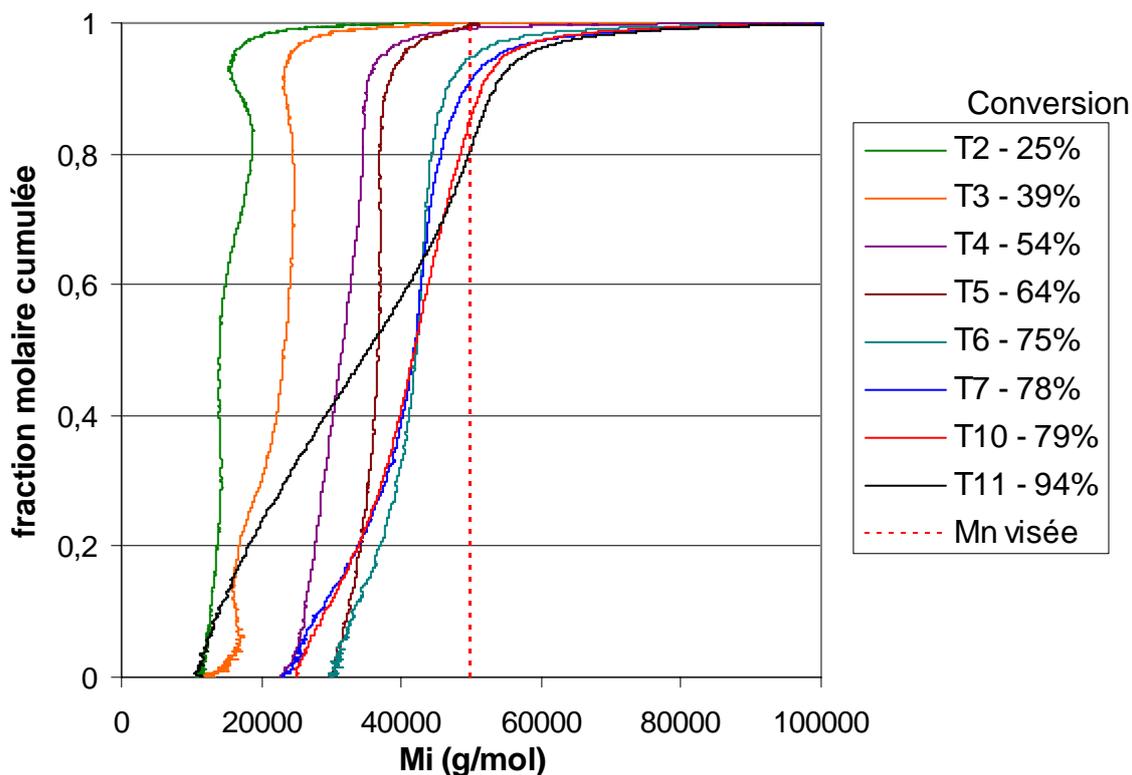


Figure 21 : Fraction molaire cumulée = $f(M_i)$ pour différents prélèvements de l'essai MB40

Les comparaisons des distributions des masses molaires à différentes conversions des essais MB40 et AF115 sont présentées dans la Figure 22. L'essai MB40 semble être légèrement mieux contrôlé (I_p plus faible) que l'essai AF115 jusqu'à 75% de conversion mais la tendance s'inverse radicalement au-delà à cause de la création de nombreuses petites chaînes. En effet, la température favorisant à la fois les réactions de transfert au polymère et les réactions de β -scission, la formation de nouvelles petites chaînes est favorisée. Par contre, la présence moins importante de plus grandes chaînes dans l'essai MB40 que dans l'essai AF115 semble indiquer que « l'effet de gel » est nécessaire à leur formation et/ou que les réactions de propagation à partir de RMC sont très réduites.

De plus, cette comparaison montre que les conditions qui minimisent le transfert au polymère (augmentation de la concentration en monomère et baisse de la température) favorisent un certain « effet de gel ». Dans le cas de masses molaires visées moyennes, cet

« effet de gel » est très limité (pas de chaînes de masses supérieures à 2,5 fois $M_{pic_{molaire}}$), ce qui permet de garder des I_p faibles ($<1,01$). Malheureusement, dans le cas de masses molaires visées plus importante, l'« effet de gel » est tel qu'il entraîne non seulement la formation de très grandes chaînes mais qu'il ne permet pas également de limiter suffisamment le transfert au polymère (à cause certainement d'une diffusion du monomère réduite).

Il serait intéressant de réaliser un essai dans les mêmes conditions qu'AF115 mais à une concentration en monomère de 1,6 mol/L afin de contrôler l'effet propre de la concentration sur l'évolution de la distribution des masses molaires en fin de polymérisation.

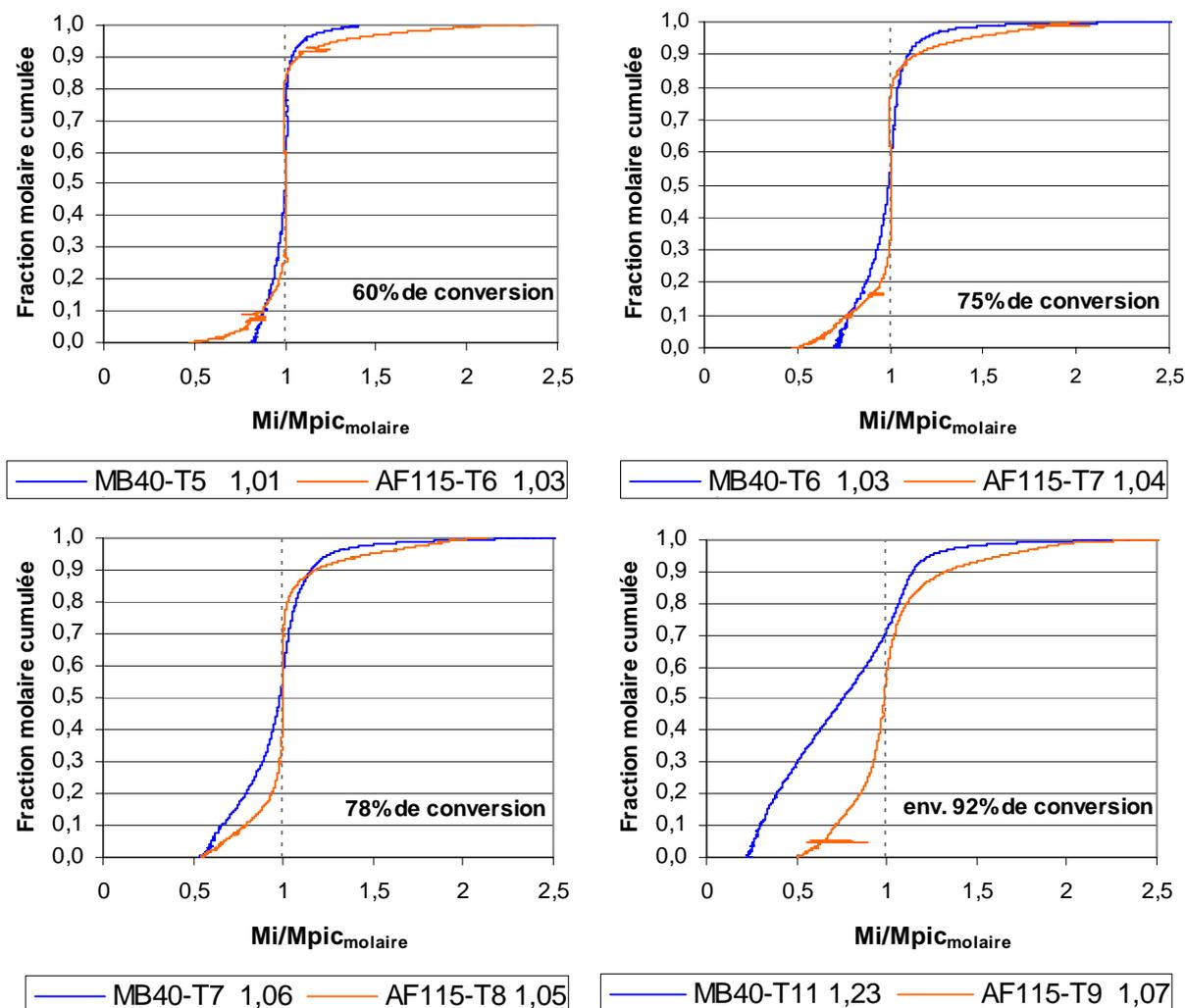


Figure 22: Evolution de la distribution des masses molaires en fonction de la conversion pour les essais MB40 et AF115. (légende = prélèvement et I_p correspondant)

La Figure 23 (avec les commentaires qui suivent) peut être présentée en guise de conclusion. Deux phénomènes simultanés, le transfert au polymère ($+\beta$ -scission) et un « effet de gel », peuvent expliquer ces différences de distribution de masses molaires.

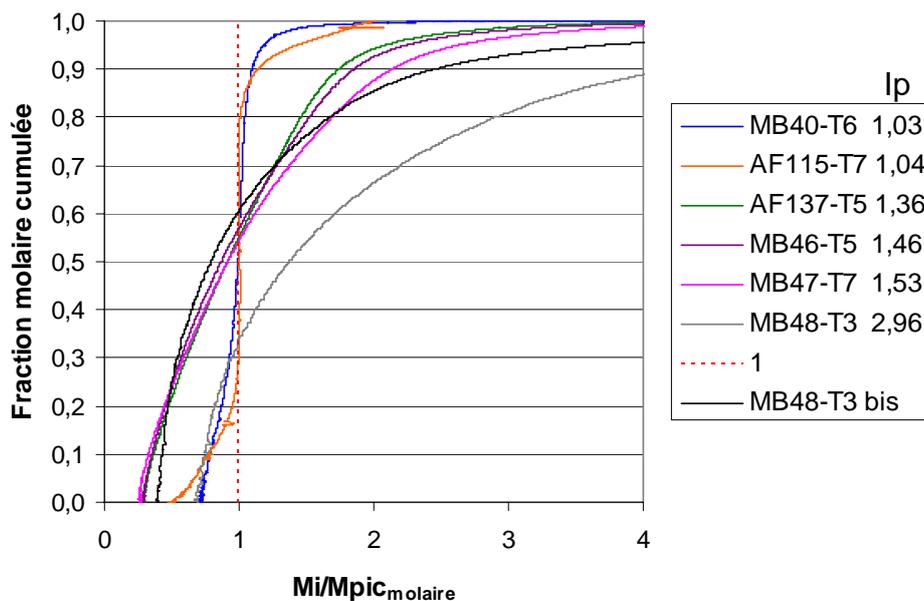


Figure 23: Comparaison de la distribution des masses molaires à 75% de conversion
(**Attention** : abscisse de la courbe « MB48-T3 bis » = M_i/M_n)

Lorsque des masses molaires moyennes sont visées (MB40 et AF115), les deux phénomènes sont très limités : même si les indices de polymolécularité augmentent à partir du plateau de conversion, ils restent très faibles ($<1,1$).

Lorsque de grandes masses molaires sont visées (AF137), « un effet de gel » important (réduction de la mobilité des espèces polymères par rapport à celle du monomère) réduit considérablement la probabilité pour une chaîne active de s'ajouter sur une chaîne dormante. Les chaînes actives ont donc tendance à additionner un grand nombre d'unité monomère entraînant la formation de très longues chaînes (possibilité d' I_p élevé même à faible conversion). Parallèlement, les réactions de transfert au polymère se font de plus en plus fréquentes avec la diminution de la concentration en monomères dans le milieu. Celles-ci permettent la formation de plus petites chaînes s'il y a fragmentation du radical en milieu de chaîne ou participent à la formation de plus grandes chaînes s'il y a propagation (formation d'un branchement, *a priori* plutôt court).

Le remplacement du DBtB par de la MEDBA (AF137→MB46) ne semble pas modifier fortement l'effet de ces phénomènes.

La diminution de la quantité d'amorceur (MB46→MB47) semble favoriser la formation de grandes chaînes : avec moins de macro-radicaux dans un même volume, ils ont plus de « chance » de se trouver « isolé » par l'effet de gel.

L'ajout de 40% de NAS (monomère solide « peu » soluble dans le dioxane) accroît considérablement l'effet des deux phénomènes. L'augmentation de la viscosité du milieu semble favoriser l'« effet de gel » (formation importante de très grandes chaînes + accélération de la vitesse de polymérisation). Concernant les plus petites chaînes, leur formation est telle qu'elles deviennent majoritaires ($M_{pic_molaire} < M_n$). De ce fait, les plus grandes chaînes paraissent encore plus grandes par rapport à la population majoritaire (courbe MB48-T3 de la Figure 23). Cette si importante formation de nouvelles petites chaînes peut être attribuée à la nature du NAS (dérivé acrylate) qui doit être plus sensible aux réactions de transfert au polymère que les dérivés d'acrylamide. Cependant, une diffusion réduite du monomère au milieu des chaînes polymère peut également favoriser les réactions de transfert (et les réactions de β -scission).

**SYNTHESE D'AGENTS DE CONTROLE ORIGINAUX POUR L'OBTENTION
DE COPOLYMERES α -FONCTIONNELS PAR LE PROCEDURE RAFT.
APPLICATION A L'ELABORATION DE PARTICULES A CHEVELURE CONTROLEE.**

Résumé :

Le procédé RAFT (transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation) est une technique de polymérisation radicalaire contrôlée de choix permettant d'obtenir directement des chaînes polymères α -fonctionnelles de longueur contrôlée. La synthèse préalable d'agents de transfert de chaîne (ATC) fonctionnalisés est une étape primordiale dans cette optique.

Dans ce travail de thèse, une stratégie simple a été développée pour la synthèse d'ATC fonctionnalisés utilisant des ATC précurseurs originaux appartenant à la famille des dithioesters. Cette nouvelle voie de synthèse a préalablement été validée à l'aide d'un composé modèle avant d'être appliquée à la synthèse de dithioesters portant un ligand biologique tel que la biotine, un phospholipide ou un dérivé carbohydrate.

La polymérisation de type RAFT de la *N*-acryloylmorpholine en présence de chacun de ces nouveaux bio-ATC vérifie tous les critères d'une polymérisation contrôlée. En particulier, les polymères obtenus ont une distribution des masses molaires très étroite ($I_p < 1,1$). De plus, la présence du ligand biologique en extrémité α des chaînes a été confirmée par RMN ^1H et par spectrométrie de masse MALDI-ToF.

Enfin, cette stratégie de synthèse de polymères α -bio-fonctionnels a été utilisée pour la conception de structures macromoléculaires répondant aux critères requis pour des applications dans le diagnostic biologique : 1- un copolymère réactif de masse molaire élevée précurseur de sondes de détection « super-fluorescentes » a été synthétisé à partir du dithioester-biotine ; 2- Un procédé de polymérisation mixte associant le principe de la polymérisation en dispersion avec celui de la polymérisation de type RAFT a été imaginé. L'utilisation, dans ce procédé, de polymères α -fonctionnels synthétisés à partir du dithioester-sucre a permis l'élaboration de particules fonctionnalisées à chevelure contrôlée potentiellement utilisables pour la capture d'agents pathogènes.

**SYNTHESIS OF NEW CHAIN TRANSFER AGENTS IN ORDER
TO PRODUCE α -FUNCTIONALIZED COPOLYMERS BY THE RAFT PROCESS.
APPLICATION TO THE PREPARATION OF PARTICLES WITH CONTROLLED HAIR.**

Summary :

α -functionalized polymer of controlled chain length can be designed by the use of the RAFT (Reversible Addition Fragmentation chain Transfer) process, which is a controlled radical polymerization technique. The first requirement for this strategy is to synthesize functionalized chain transfer agents (CTA).

In this research work, a simple strategy is presented: original dithioester precursors CTA were designed and used to provide a large variety of functionalized dithioesters. The efficiency of this strategy was previously checked with a model compound, and was then applied to the synthesis of dithioesters bearing biomolecules (bio-CTA) like a biotin, a phospholipid or a carbohydrate derivative.

RAFT polymerization of *N*-acryloylmorpholine mediated by each of these new bio-CTAs is well controlled, the resulting polymer exhibiting narrow molar mass distributions ($PDI < 1.1$). Moreover, ^1H NMR and MALDI-ToF mass spectrometry analyses confirmed the presence of the biological compound at the α -end of the chains.

Finally, the same strategy (leading to α -bio-functionalized polymers) was used to elaborate macromolecular structures for applications in biological diagnostic tests: 1- a high molecular weight reactive random copolymer was synthesized from the biotin-dithioester, and may serve as "highly-fluorescent" detection probes; 2- Functionalized particles with controlled hair were obtained *via* dispersion polymerization using α -functionalized polymer chains bearing a carbohydrate derivative (potentially able to capture pathogenic agents) as precursor stabilizer.

DISCIPLINE : Matériaux Polymères et Composites

MOTS-CLES : Polymérisation radicalaire contrôlée ; Procédé RAFT ; Agents de transfert de chaîne fonctionnels ; Dithioesters ; Polymères α -fonctionnels ; Dérivés d'acrylamide ; Particules chevelues ; Polymérisation en dispersion.

LABORATOIRES DE RECHERCHE :

SMPH (Systèmes Macromoléculaires et Physiopathologie Humaine)

UMR 2714 CNRS/bioMérieux - Ecole Normale Supérieure de Lyon - 46, allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07

LCPP (Laboratoire de Chimie et Procédés de Polymérisation)

UMR140 CNRS/ESCPE Bat. 308F - 43, Bd du 11 nov. 1918, BP2077, 69616 Villeurbanne Cedex