UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Chimie Organique, Minérale et Industrielle

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques, ED 459

présentée et soutenue publiquement

par

Nicolas LARCHER

Le **4 mai 2010**

Titre :

Recherche de voies spécifiques de fonctionnalisation des dendrimères greffés de L-lysine (DGL)

JURY

Jean COUDANE	Professeur, Université Montpellier I	Président
Anne-Marie CAMINADE	Directeur de recherche, CNRS Toulouse	Rapporteur
Agnès DELMAS	Directeur de recherche, CNRS Orléans	Rapporteur
Sylvain COTTAZ	Professeur, Université Grenoble I	Examinateur
Jean-Christophe ROSSI	Maître de conférences, Université Montpellier II	Examinateur
Robert PASCAL	Chargé de recherche CNRS, Université Montpellier II	Directeur de thèse

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Chimie Organique, Minérale et Industrielle

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques, ED 459

présentée et soutenue publiquement

par

Nicolas LARCHER

Le **4 mai 2010**

Titre :

Recherche de voies spécifiques de fonctionnalisation des dendrimères greffés de L-lysine (DGL)

JURY

Jean COUDANE	Professeur, Université Montpellier I	Président
Anne-Marie CAMINADE	Directeur de recherche, CNRS Toulouse	Rapporteur
Agnès DELMAS	Directeur de recherche, CNRS Orléans	Rapporteur
Sylvain COTTAZ	Professeur, Université Grenoble I	Examinateur
Jean-Christophe ROSSI	Maître de conférences, Université Montpellier II	Examinateur
Robert PASCAL	Chargé de recherche CNRS, Université Montpellier II	Directeur de thèse

Remerciements

Le travail décrit dans ce manuscrit a été réalisé à l'Université Montpellier 2, au sein de l'équipe Dynamique des Systèmes Biomoléculaires Complexes (DSBC) faisant partie de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247, dirigé par le Professeur Jean Martinez que je remercie de m'avoir accueilli.

Je tiens à remercier le Docteur Hubert Blancou, Directeur de Recherches, anciennement directeur du laboratoire Organisation Moléculaire, Évolution et Matériaux Fluorés (OMEMF), ex-UMR 5073, de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour y effectuer mon stage de Master et de m'avoir permis de poursuivre en thèse.

Je remercie également le Docteur Robert Pascal, Chargé de Recherches, responsable de l'équipe DSBC et directeur de cette thèse de m'avoir encadré, soutenu et fait confiance sur ce sujet.

Cette thèse a aussi été encadrée par le Docteur Jean-Christophe Rossi, Maître de Conférences, qui a été par ailleurs mon tuteur lors de mon stage de Master. Durant ces quatre années de collaboration, j'ai beaucoup appris à son contact. Merci de m'avoir guidé et conseillé tout au long de cette thèse. Merci également pour ta disponibilité, pour ton écoute, pour toutes les fois où tu as pris le temps de m'expliquer et de chercher des solutions quand j'étais bloqué (et il y en a eu beaucoup!), pour avoir mis la main à la pâte à certains moments et pour ta bonne humeur.

Je suis également reconnaissant aux membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail. Je remercie donc le Professeur Jean Coudane de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury, les Docteurs Anne-Marie Caminade et Agnès Delmas qui ont bien voulu être mes rapporteurs, et le Professeur Sylvain Cottaz pour avoir examiné ce travail.

Je remercie aussi toute l'équipe DSBC (Laurent B, Jean-Phi, Odile, Isabelle, Fabien, Marie-Sophie) pour son aide et sa contribution tout au long de ma thèse. Plus précisément, je

remercie Jacques Taillades pour sa disponibilité, son aide et ses conseils pendant la rédaction de ce manuscrit et la préparation de la présentation orale. Sans son aide, j'aurais eu beaucoup de difficultés à achever ce manuscrit.

Je remercie également Hélène Collet et Auguste Commeyras, membres de Colcom, pour l'aide, le savoir et le savoir-faire qu'ils m'ont apportés concernant la synthèse des DGL, ainsi que pour les matières premières (C-Lys(TFA), G1 et G2) qu'ils m'ont fournies.

Je tiens à remercier Hervé Cottet pour son aide concernant la caractérisation des oligomères par électrophorèse capillaire, technique toute nouvelle pour moi, ainsi que Grégoire Danger pour toutes les analyses qu'il a effectuées sur mes produits et pour la mise au point des conditions d'analyse.

Merci aussi à Laurent Garelly pour sa contribution dans la caractérisation des DGL nouvellement synthétisés.

Un grand merci à Cyril, l'ancien « thésard d'en face » avec qui j'ai pu faire entre autre des glaces à l'azote liquide plutôt réussies, pour ton soutien, pour m'avoir initié aux « énigmes » de farniente, pour ta bonne humeur et ton amitié. Merci à Nadia pour ses conseils, pour les quelques pauses café qu'on a pu faire et pour la soirée Mario Kart. Merci également à Thomas pour ses cours de géopolitique, d'économie et d'histoire, l'actu-ciné du weekend, ses références culturelles (South Park, Simpsons) et son humour assez particulier (faut le temps de s'y habituer). Merci aussi à Andrea, ma dernière stagiaire maintenant en thèse. Tout le travail fourni durant ton stage m'a beaucoup aidé. Merci pour ton sourire et pour les pauses pendant ma période de rédaction. Merci à Farid, à qui j'ai souvent piqué des pipettes et qui m'a aussi aidé pour l'électrophorèse capillaire, à Tao et à Amal.

Je tiens à remercier aussi les thésards de « l'équipe d'à côté ». Notamment, Livie et Xuewei, mes compagnons de galère : c'était sympa de pouvoir se soutenir mutuellement surtout pendant la rédaction. Merci pour votre amitié. Merci également à Brieuc, Lucie, Chloé et Olivier sans qui cette thèse n'aurait pas été la même. Et, merci aussi à Chantal, « the first »

comme dirait Livie, pour ses conseils, sa bonne humeur et ses bonnes initiatives (les galettes).

Une mention spéciale pour Olivia Giani, Maître de Conférences, pour sa gentillesse : merci pour le badge.

Je remercie aussi les stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer : Sophie, Mathieu, et Christine. Merci pour votre travail et votre enthousiasme.

Mes pensées vont également vers tous ceux qui m'ont soutenu durant cette thèse, notamment mes parents et ma sœur. Merci pour votre amour, votre soutien, votre écoute et votre confiance. Si je suis arrivé jusque là c'est grâce à vous.

Un grand merci aussi à celle qui au début était mon amie et qui est devenue mon Amy, mon épouse. Merci de m'avoir supporté et encouragé, surtout pendant les derniers mois. Merci pour ta patience, ta présence et ton amour.

Enfin, à Celui qui a toujours été là pour moi : MERCI.

Table des matières

Liste des abréviations 10

Introduction générale 14

1. Les polylysines dendritiques 17

1.1. Les dendrimères de polylysines 17

1.2. Les polylysines arborescentes 18

Références bibliographiques 28

I. Contribution à l'étude de la polymérisation auto-amorcée des NCA en milieu hétérogène 34

I.1 Introduction 34

I.2 Mécanismes de polymérisation des NCA 35

I.2.1 Le mécanisme de l'amine 36

I.2.1.1 Le mécanisme du carbamate 37

I.2.2 Le mécanisme du monomère activé 37

I.2.3 Amorçage par des complexes organométalliques 39

I.2.4 Cas particuliers de la polymérisation des NCA dans l'eau 41

I.3 Synthèse des dendrimères greffés de L-lysine 45

I.3.1 Synthèse de la première génération de DGL 45

I.3.1.1 Les étapes de synthèse de la 1ère génération de DGL 45

I.3.1.2 Synthèse du NCA 47

I.3.1.3 Réactivité du NCA et des produits secondaires 51

a. Formation des produits identifiés 54

I.3.2 Synthèse des générations supérieures 60

I.4 Conclusion 62

Références bibliographiques 63

II. Polymérisation amorcée des NCA en milieu hétérogène 67

II.1 Introduction 67

II.2 Synthèse de DGL de 1ère génération en présence d'un amorceur 68

II.2.1 Les amorceurs utilisés 68

II.2.1.1 Synthèse des amorceurs 70
a. Synthèse d'AM4 70
b. Synthèse d'AM7 73
II.3 Résultats et discussion 74
II.3.1 Polymérisation en phase aqueuse du Lys(TFA)-NCA initiée par des divers amorceurs 80
II.3.1.1 Résultats 80
II.3.1.2 Discussion 82
a. Rappel des travaux de Lahav 82
b. Discussion des travaux personnels 85
II.3.2 Polymérisation du Lys(TFA)-NCA en présence d'acétonitrile 87
II.3.2.1 Initiation de la polymérisation par AM4 en présence de 50% d'acétonitrile 93
II.4 Conclusion 95
Références bibliographiques 97
Partie expérimentale 99

III. Synthèse de DGL fonctionnalisés au cœur et ligation 114
III.1 Introduction 114
III.2 Rappels bibliographiques sur la ligation chimique 116
III.2.1 La ligation par transfert d'acyle ou ligation native 117
III.2.1.1 Par un peptide thioester 117
III.2.1.2 Par la ligation de Staudinger 117
III.2.2 La ligation non-native 119
III.2.2.1 La ligation thioéther et thioester 119
III.2.2.2 La ligation imine avec insertion d'une thiazolidine ou d'une pseudo-proline 120
a. La ligation imine avec insertion d'une thiazolidine 120
b. La ligation imine avec insertion d'une pseudo-proline 121
III.2.2.3 Les ligations hydrazone et oxime 122
III.2.2.4 La ligation triazole : la chimie « Click » 123
III.2.2.5 La ligation via la réaction de Diels-Alder 124
III.3 Elaboration du bras espaceur 125

III.3.1 Réaction de désymétrisation du PEG 125
III.3.1.1 La monoactivation 126
III.3.1.2 La monoprotection 128
III.3.1.3 L'introduction d'une fonction chimique masquée 131
III.3.2 Introduction de la fonction aminooxy 133
III.3.2.1 Via l'acide aminooxyacétique et ses dérivés 133
III.3.2.2 Via la Boc-hydroxylamine 133
III.3.2.3 Via le *N*-hydroxyphtalimide 134
III.3.3 Introduction de la fonction hydrazide 135
III.4 Résultats et discussion 136
III.4.1 1ère stratégie de synthèse du bras hydrazide 137
III.4.2 Synthèse du TEG azido-alcool 33 139
III.4.3 Synthèse du bras hydrazide 139
III.4.4 Synthèse du bras aminooxy 141
III.5 Synthèse des bioconjugués 142
III.5.1 Synthèse de G1-bras 142
III.5.2 Synthèse de G2-bras 143
III.5.3 Ligation 144
III.6 Conclusion 147
Références bibliographiques 149
Partie expérimentale 154

IV. Modification de surface des DGL 170
IV.1 Introduction 170
IV.2 Modifications de surface des dendrimères de type polyamine 171
IV.2.1 Obtention de dendrimères dotés d'une surface cationique 172
IV.2.2 Obtention de dendrimères dotés d'une surface anionique 174
IV.2.3 Obtention de dendrimères dotés d'une surface neutre 175
IV.2.3.1 La « PEGylation » 175
IV.2.3.2 Le greffage de chromophores 176
IV.2.3.3 Le greffage de sucres 177
IV.2.3.4 Autres modifications 180
IV.2.4 Les dendrimères multifonctionnels 183

IV.3 Résultats et discussion 188
IV.3.1 Guanidylation des DGL 188
IV.3.2 Synthèse de DGL anioniques et neutres 190
IV.3.2.1 Synthèse de DGL anionique 190
IV.3.2.2 Synthèse de DGL neutre 190
IV.3.3 Greffage de sucres sur les DGL par amination réductrice 191
IV.4 Conclusion 202
Références bibliographiques 203
Partie expérimentale 208

Conclusion générale 213

Annexe I : Principe électrophorèse capillaire 217

Annexe II: Publication soumise à Tetrahedron Letters 219

Annexe III : Amorceurs utilisés dans le chapitre II 227

Liste des abréviations

AA	Acide aminé
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
Aoa	Acide aminooxyacétique
APC	Cellules présentatrices d'antigènes (Antigen-presentating cells)
ApTs	Acide *para*-toluènesulfonique
ARN	Acide ribonucléique
BHA	Benzhydrylamine
Boc	*tert*-butoxycarbonyl
BSA	Protéine d'albumine sérique bovine
CAA	Acide aminé N-carbamoylé (Carbamoyl amino acid)
CDI	Carbonyldiimidazole
CES	Chromatographie d'exclusion stérique
CLHP	Chromatographie liquide haute pression
C-Lys(TFA)	N^{ε}-trifluoroacétyl-N^{α}-carbamoyl-L-lysine
CPMV	Virus de la mosaïque jaune du niébé (Cowpea Mosaic Virus)
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCC	*N*,*N*'-Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DGL	Dendrimères greffés de poly-L-lysine
DHP	2,3-Dihydropyrane
DIAD	Diisopropylazodicarboxylate
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	*N*,*N*-Diméthylformamide
DMTr	4,4'-Diméthoxytrityle
DPn	Degré de polymérisation en nombre
DPw	Degré de polymérisation en poids
EC	Electrophorèse capillaire
EC/MS	Electrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse
EDC	*N*-éthyl-*N*'-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

ESI	Electrospray ionization
Et_2O	Ether diéthylique
Fmoc	9-Fluorénylméthyloxycarbonyl
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Fourier Transformed InfraRed spectroscopy)
G1	Poly(L-lysine) 1ère génération
$G1_{AM}$	Poly(L-lysine) 1ère génération incluant un amorceur
G1P	Poly(N^{ε}-trifluoroacétyl-L-lysine) 1ère génération
$G1P_{AM}$	Poly(N^{ε}-trifluoroacétyl-L-lysine) 1ère génération incluant un amorceur
Gly	Glycine
HIV	Human immunodeficiency virus
HOSu	*N*-hydroxysuccinimide
HRMS	High resolution mass spectrometry
I	Indice de polydispersité
LC/MS	Chromatographie liquide haute pression couplée à la spectrométrie de masse
Leu	Leucine
Leu-NCA	*N*-carboxyanhydride de Leucine
Lys(TFA)-NCA	N^{ε}-trifluoroacétyl-N^{α}-carboxyanhydride-L-lysine
M/A	Monomère/Amorceur (rapport molaire)
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MAP	Multiple Antigenic Peptide
MeOH	Méthanol
NCA	*N*-Carboxyanhydride
PEG	Polyéthylène glycol
Phe	Phénylalanine
Phe-NCA	*N*-carboxyanhydride de phenylalanine
Phe-OMe	Ester méthylique de L-phénylalanine
TBABr	Bromure de tétrabutylammonium
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBDMS	*tert*-Butyldiméthylsilyle
tBuOK	*tert*-butanolate de potassium
TEG	Tétraéthylène glycol
TFA	Trifluoroacétyl (CF3-CO)
THF	Tétrahydrofurane

THP	Tétrahydropyranyle
TOF	Time of flight
Ts	Tosyl
Val	Valine
Z	Benzyloxycarbonyl

Introduction générale

Introduction générale

Les polymères dendritiques forment une nouvelle classe de macromolécules qui a suscité un vif intérêt au cours des 20 dernières années. Ces polymères peuvent être divisés en trois familles: les dendrimères, qui sont des macromolécules symétriques très ramifiées et monodisperses, les polymères hyperbranchés, qui sont des structures non symétriques et polydisperses, et les dendrimères greffés, qui sont des macromolécules intermédiaires entre les dendrimères et polymères hyperbranchés (Figure 1).

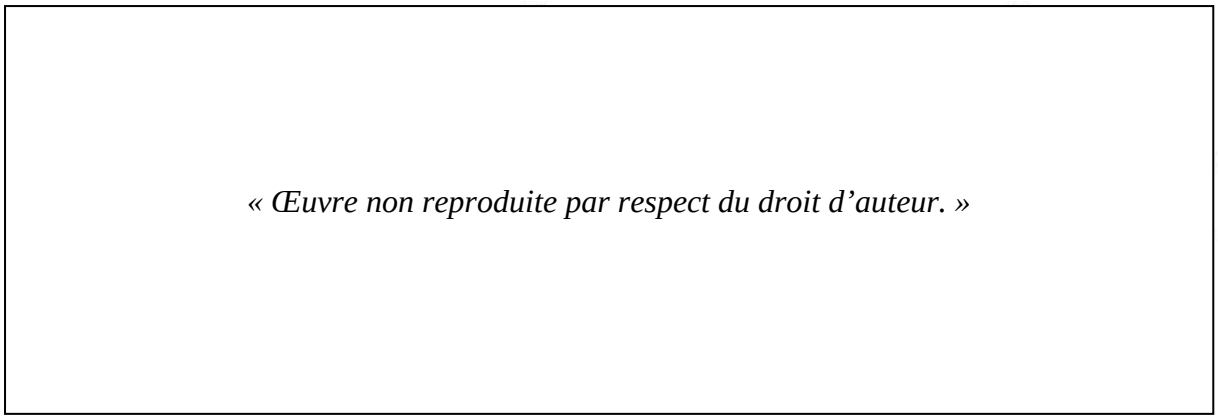


Figure 1 : Représentation de la **s**tructure (a) des dendrimères, (b) des polymères hyperbranchés, (c) des dendrimères greffés[1]

Le nombre de publications relatives aux dendrimères a considérablement augmenté ces dernières années : il est passé de 4 en 1988 à 2248 en 2008 (source SciFinder). Ces composés ont de nombreuses applications surtout dans le domaine des nanotechnologies et de la médecine. Par exemple, les PAMAM (polyamidoamines), les dendrimères les plus étudiés, sont utilisés pour encapsuler des agents anticancéreux[2], pour la vectorisation transdermale et topique d'anti-inflammatoires non stéroïdiens[3] ou encore comme vésicule ophtalmique[4]. Ce ne sont là que quelques exemples parmi les nombreuses utilisations envisagées pour les dendrimères.

Les dendrimères greffés, la famille la plus récemment découverte, sont aussi des macromolécules très prometteuses. Les premiers exemples de synthèse ont été reportés en 1991 de façon indépendante par Tomalia *et al.*[5], sous le nom de polymères Comb-burst®, et par Gauthier et Möller [6] sous le nom de polymères arborescents greffés. Et tout comme les dendrimères, ils sont composés de plusieurs couches appelées générations. Cependant, des

caractéristiques importantes différencient les dendrimères greffés, des dendrimères et des polymères hyperbranchés. Dans la synthèse des dendrimères greffés, ce sont des polymères qui servent de bloc de construction alors que pour les dendrimères, ce sont de petites molécules. Chaque chaîne latérale, du polymère de base qui constitue le cœur du dendrimère greffé, contient au moins un site de couplage permettant la synthèse de la génération suivante. Par conséquent, de hautes masses moléculaires peuvent être atteintes en peu d'étapes par rapport aux dendrimères. La distribution des masses moléculaires des dendrimères greffés est plus étroite que celle des polymères hyperbranchés, mais la structure de ces molécules est moins contrôlée que celle des dendrimères. La taille des dendrimères greffés peut être de 10 à 1000 fois plus grande que celle des dendrimères même après seulement 2 à 4 cycles de couplage.

Il existe plusieurs architectures de dendrimères greffés et par conséquent le nom donné à ces molécules varie d'une équipe de recherche à l'autre. Cependant, on distingue deux types d'architecture fondamentaux : les structures arborescentes (greffage aléatoire) et les structures semblables aux dendrimères ou « dendrimer-like » (greffage sur les bouts de chaîne). Du nom de ces deux types de structures dérivent le nom des structures plus complexes de dendrimères greffés. Le terme « dendrigraft » que l'on a traduit par dendrimère greffé est de plus en plus utilisé pour désigner l'ensemble des différentes structures de polymères dendrimériques greffés[7].

Deux méthodes de synthèse sont utilisées pour préparer des dendrimères greffés : la méthode divergente qui permet de synthétiser le dendrimère greffé en partant du cœur et en allant vers la périphérie et la méthode convergente, partant de la périphérie pour aller au cœur. La première méthode est celle qui est la plus communément utilisée car elle permet de construire le dendrimère greffé génération après génération, permettant ainsi un bon contrôle de la distribution des masses moléculaires. D'un autre côté, la seconde méthode fait intervenir un monomère bifonctionnel dans une réaction « one pot » conduisant directement à un dendrimère greffé de haute masse moléculaire, moyennant un contrôle moins efficace de la distribution des masses moléculaires[1]. D'une manière générale, les stratégies de synthèse employées pour préparer les dendrimères greffés reposent sur des réactions de polymérisation ioniques et parfois radicalaires, qui sortent du cadre de ce travail. De ce fait, nous ne développerons pas ces méthodes.

Au sein de notre laboratoire, un procédé original de synthèse de dendrimères greffés de L-lysine (DGL) a été développé et breveté[8]. La lysine a été choisie pour deux raisons.

Premièrement, c'est un acide aminé trifonctionnel qui peut être cyclisé en monomère activé (*N*-carboxyanhydride ou NCA), composé très réactif. Deuxièmement, la poly-L-lysine est un polypeptide ayant des applications multiples. En effet, elle est utilisée dans la formulation de détergents[9], comme agent antibactérien dans le domaine de l'alimentation[10,11] et de la nutrition animale[12], dans la formulation d'insecticides[13], et aussi pour son aptitude à complexer les enzymes[14]. On retrouve également l'utilisation de la poly-L-lysine dans le domaine médical. Elle entre dans la formulation de nombreux médicaments et permet une libération contrôlée de ces derniers comme le montre Porter[15] qui utilise un revêtement de poly-L-lysine pour relarguer ses médicaments uniquement dans la partie post-gastrique du tractus gastro-intestinal de l'animal ou de l'homme. Elle est aussi utilisée dans la fabrication de pansements antibactériens[16], comme constituant de peaux artificielles, pour sa faculté d'encapsulation et de passage à travers les cellules[17], et pour son action antivirale[18] puisqu'elle est capable d'inhiber l'activité de 2 bactériophages différents, les T4 et T5. En restant dans le domaine médical, il existe deux autres applications essentielles de la poly-L-lysine. La première est sa capacité à vectoriser les principes actifs. En effet, cette dernière, grâce à sa structure hélicoïdale proche de l'ADN, peut se complexer à des composés tels que des acide nucléiques[19], des polynucléotides[20] ou encore des adénovirus contenant un transgène[21] et ensuite cibler les cellules malades. Et la deuxième, est son action sur la production d'anticorps par association avec un antigène. En effet, la poly-L-lysine de masse moléculaire élevée greffée à un antigène permet de protéger et de garder celui-ci plus longtemps dans le corps, entraînant ainsi une sécrétion d'anticorps plus importante. Afin d'illustrer cette application, on peut citer les travaux de Sela *et al.*[22] qui utilisent et synthétisent de la poly-L-lysylalbumine via la polymérisation du NCA de la N^{ε}-trifluoroacétyl-L-lysine pour augmenter la sécrétion d'anticorps contre l'albumine de sérum de lapin. Un autre exemple est décrit par Kricheldorf et Fehrle[23] qui relient des bases pyrimidiques à la poly-L-lysine afin d'accroître les propriétés antigéniques.

Les polylysines utilisées dans les applications citées précédemment sont principalement des polylysines linéaires. Pour notre part, nous nous sommes focalisés plus particulièrement sur les polylysines dendritiques, nouvelle classe de polymère en plein essor.

1. Les polylysines dendritiques

Il existe deux méthodes de synthèse de polylysines dendritiques généralement utilisées dans la littérature : la méthode pas à pas, initiée par Denkewalter *et al.*[24,25] et la méthode par polymérisation d'acides aminés NCA, initiée par Klok *et al.*[26-28].

1.1. Les dendrimères de polylysines

Les premières polylysines dendritiques (qui ont été qualifiées de dendrimères réguliers) ont été préparées dès 1981 par Denkewalter via des réactions successives de couplage et déprotection à partir de N^{α},N^{ε}-di-(ter-butoxycarbonyl)-L-lysine[24,25]. Ces synthèses consistent à ajouter, à une lysine dont le groupement carboxylique est protégé par la benzhydrilamine (BHA), des monocouches successives de lysine, pour construire progressivement les composés suivants : BHALys, BHALysLys2, BHALysLys2Lys4, etc.… (Figure 2).

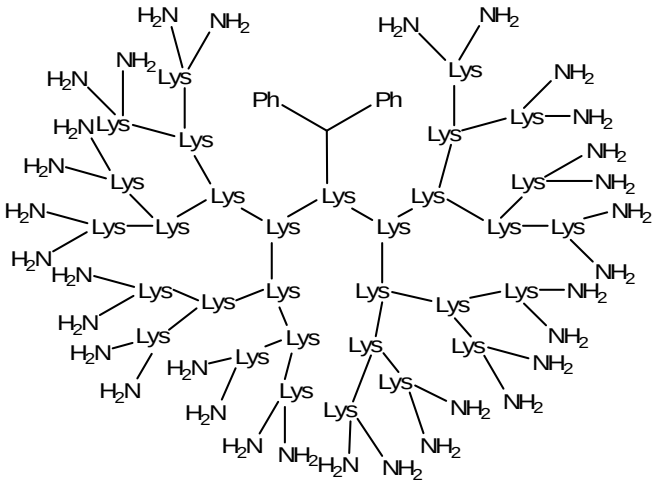


Figure 2 : Dendrimère de lysine

Les réactions de couplage sont réalisées en solvant anhydre (CH_2Cl_2 ou DMF). Les composés obtenus, considérés comme ayant un taux de ramification maximal, portent en surface de nombreuses fonctions amines et sont donc polycationiques à pH physiologique.

Cette méthode de synthèse pas à pas est régulièrement reprise dans la littérature[29-37]. Il existe aussi des variantes utilisant un composé de type diamine (diaminoalkane, diaminopolyéthylène glycol,…)[38-50] ou encore de type triamine comme le tris(2-éthylamino)amine[51,52], à la place de la BHA.

Par exemple, Matthews *et al.*[29-33] synthétisent dans un premier temps des polylysines identiques à celles de Denkewalter. Puis, dans un deuxième temps, ils modifient la surface de ces polylysines en liant de façon covalente à chaque fonction amine libre, des groupements portant des fonctions anioniques ($-CO_2^-$, $-SO_3^-$, etc…) et obtiennent de nouveaux matériaux polyanioniques avec un cœur polylysine. Ces matériaux ont des propriétés antivirales[32,33], antibactériennes et antiparasitaires[30] importantes. Baigude *et al.*[42-46] modifient la surface des dendrimères en liant leurs fonctions amines périphériques à des oligosaccharides et utilisent les matériaux obtenus pour produire des vaccins[43]. Niidome *et al.*[53] les utilisent natives, c'est-à-dire sans modification des amines de surface, pour la transfection de gènes. Choi *et al.*[38] construisent pas à pas des dendrimères de poly-L-lysine à partir des deux amines du polyéthylèneglycol-α,ω-diamine, et montrent que les matériaux obtenus sont d'excellents transfecteurs de gènes. Ces multiples propriétés soulignent à l'évidence l'importance des dendrimères de polylysines.

Par ailleurs, l'intérêt pour ces nouveaux matériaux ne doit pas néanmoins masquer la complexité de la méthode de synthèse pas à pas. Par exemple, six étapes, en plus des étapes de déprotection et purification, sont nécessaires pour condenser 63 motifs lysines.

D'autres méthodes de synthèse de polylysines sont utilisées dans la littérature comme la synthèse peptidique sur support solide[54,42,55] pour conduire à des polylysines de type MAP (Multiple Antigenic Peptide) développés par Tam[56,57]. Ou encore l'utilisation en synthèse peptidique en solution d'un complexe aqueux de pentaaminecobalt III, en présence de diBoc-L-lysine, facilitant la purification du produit final et évitant la formation de gel due à la faible solubilité des dendrimères de polylysines de génération élevée protégées par des groupements Boc dans les solvants organiques[58].

1.2. Les polylysines arborescentes

Contrairement aux méthodes de synthèse précédentes, la méthode proposée par Klok *et al.*[26-28] consiste à polymériser les *N*-carboxyanhydrides de la lysine dans une procédure multi-étapes pour synthétiser des polylysines arborescentes. Cette méthode de synthèse a été récemment reprise par Lee *et al.*[59]. Ils effectuent la polymérisation, dans des proportions différentes, de deux NCA de lysine protégés différemment sur l'amine en epsilon par les groupements Z et Boc (Schéma 1).



Schéma 1: Synthèse de polylysine arborescente[26]

Cette réaction est réalisée dans le DMF anhydre en présence d'hexylamine qui sert d'amorceur à la polymérisation. La polylysine linéaire obtenue, poly([H-*N*$^{\varepsilon}$-Z-L-lysine]-co-[*N*$^{\varepsilon}$-Boc-L-lysineNHhex]), est débloquée sélectivement et sert de macroamorceur pour l'étape suivante et ainsi de suite. Le déblocage final des fonctions Z restantes conduit à des polylysines dites greffées ou hyperbranchées de générations G0, G1, G2, caractérisées par un taux de greffage inférieur à 30% (déduit de l'analyse en RMN ^{1}H de ces composés). Le taux de greffage étant défini comme le pourcentage de fonctions amines epsilon ayant réagit dans la génération n pour conduire à la génération n+1. Cette méthode permet d'obtenir des polylysines qui forment un réseau de polypeptides branchés avec une amine primaire, l'hexylamine, comme amorceur de polymérisation.

Partant des procédés de synthèse existants, une méthode simple et originale de préparation de dendrimères greffés de L-lysine basée sur la polymérisation en phase aqueuse du *N*-carboxyanhydride de *N*$^{\varepsilon}$-trifluoroacétyl-L-lysine, préparé *in situ* par nitrosation de l'acide aminé carbamoylé correspondant, a été développée au laboratoire[8,60]. Cette méthode de synthèse permet de réduire la complexité des procédés décrits ci-dessus avec une diminution importante du nombre d'étapes de synthèse et une purification des produits obtenus facile à mettre en œuvre.

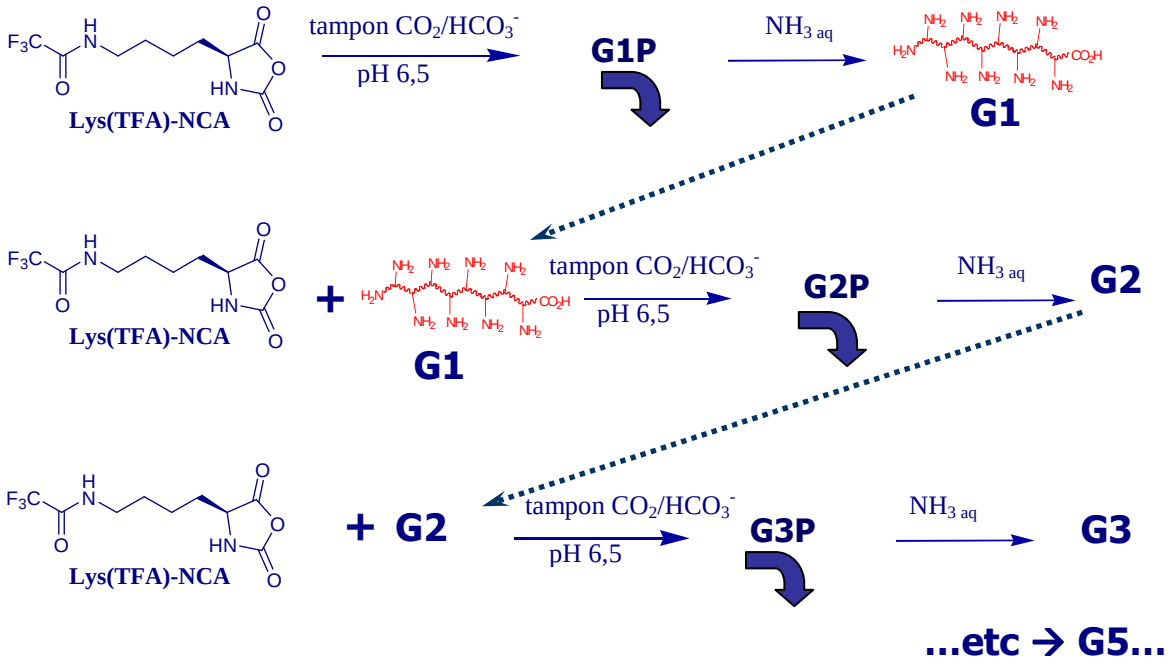


Schéma 2 : Schéma général de synthèse des DGL

Le NCA de N^{ε}-trifluoroacétyl-L-lysine (Lys(TFA)-NCA), préparé *in situ* par nitrosation, est mis en réaction dans une solution aqueuse de $NaHCO_3$ tamponnée à pH 6,5 par du CO_2. Il se produit une réaction de polymérisation auto-amorcée, c'est-à-dire qu'une partie du NCA est hydrolysée pour libérer la lysine, qui peut alors attaquer une autre molécule de NCA. Le dipeptide nouvellement formé réagit lui aussi sur un NCA, et ainsi de suite, pour conduire à la formation d'un oligomère de L-lysine, qui précipite au bout d'un certain temps hors du milieu réactionnel. Celui-ci est isolé par centrifugation, puis les fonctions amines epsilon sont déprotégées en milieu ammoniacal pour conduire à la première génération de dendrimères greffés de L-lysine, notée **G1** (Schéma 2). Cet oligomère sert ensuite d'amorceur à la synthèse de la deuxième génération selon le même mode opératoire, et ainsi de suite jusqu'à la génération 5.

L'originalité de cette méthode vient principalement du fait que le NCA utilisé n'est pas nécessairement un NCA de très haute pureté : il est préparé par nitrosation du N^{ε}-trifluoroacétyl-N^{α} carbamoyl-L-lysine, noté **C-Lys(TFA)**, et est utilisé directement, sans être purifié ni même isolé, dans la synthèse des DGL comme le montre le schéma 3 ci-après.

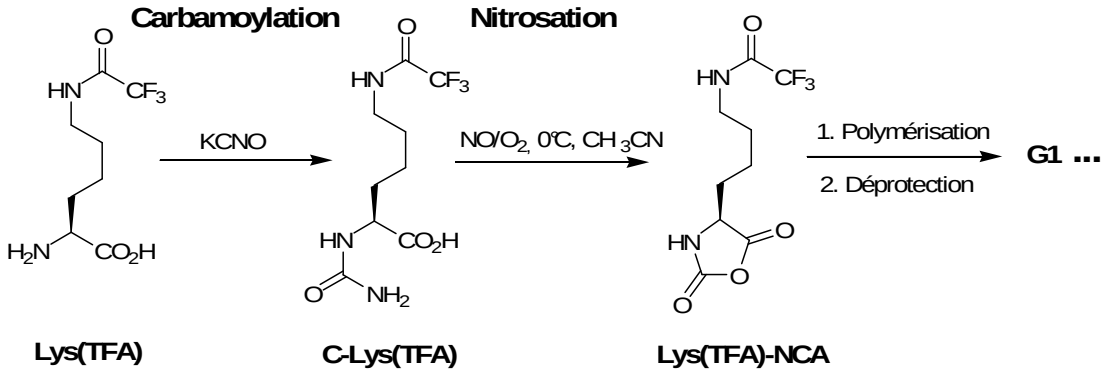


Schéma 3 : Synthèse du NCA de Lys(TFA) intervenant dans la préparation des DGL

La N^{ε}-trifluoroacétyl-L-lysine, notée **Lys(TFA)**, est carbamoylée[61] sur l'amine alpha par du cyanate de potassium pour conduire à C-Lys(TFA). Ce dernier est nitrosé[62,63], dans l'acétonitrile à froid et en présence d'un mélange gazeux NO/O_2, pour conduire au NCA de N^{ε}-trifluoroacétyl-L-lysine, qui est immédiatement mis en réaction en milieu aqueux pour conduire au DGL **G1** par polymérisation (Schéma 3). Il est important de noter que, d'une manière générale, la polymérisation de NCA est très souvent réalisée en milieu organique anhydre et nécessite un NCA de très haute pureté, les impuretés conduisant à des réactions de terminaison[64-66]. La méthode de synthèse de NCA que nous utilisons permet de s'affranchir de l'étape de purification du NCA et d'obtenir des matériaux avec une structure et des caractéristiques parfaitement reproductibles d'une synthèse à l'autre et des rendements acceptables (60-70%) à la première génération.

Les trois premières générations de DGL sont représentées dans la figure 3 ci-dessous. Ces dendrimères greffés ont été caractérisés par RMN ^{1}H, MALDI-TOF, chromatographie d'exclusion stérique (CES) et électrophorèse capillaire (EC)[67].

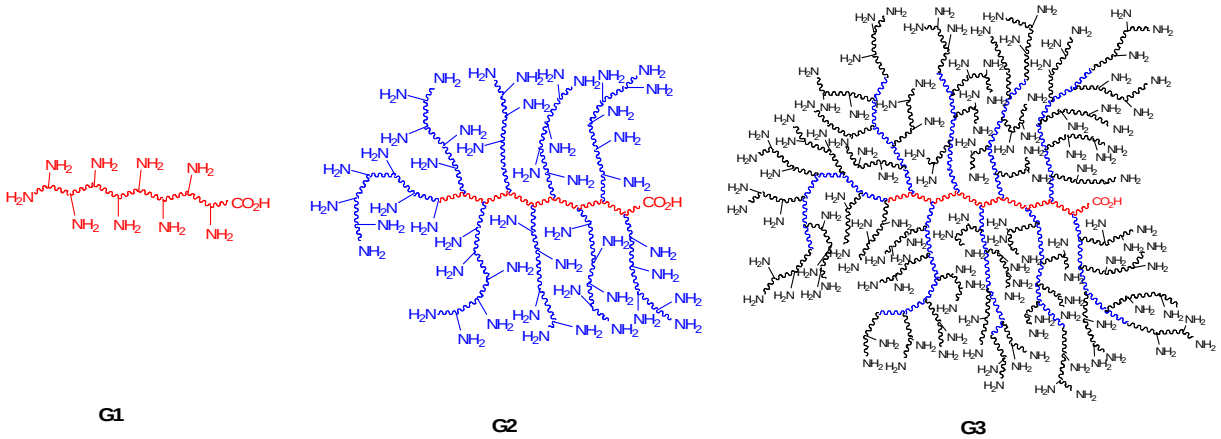


Figure 3 : Représentation des trois premières générations de DGL G1, G2 et G3.

Ces DGL peuvent être comparés aux polylysines arborescentes de Klok *et al.* décrites plus avant car ce sont les polylysines les plus proches des DGL en terme de structure (dendrimères greffés) et de matériaux de départ (NCA de L-lysine). Toutefois, nos DGL ont des taux de greffage allant de 100% à 64% pour les générations **G2** à **G5** tandis que les polylysines de Klok ont des taux de greffage inférieurs à 30%. Nous rappelons que les dendrimères ont un taux de greffage de 100%.

Les DGL ont des propriétés biologiques intéressantes. En effet, ils se sont révélés être, au travers de tests biologiques, des agents relativement actifs. L'activité de ces nano-objets a été testée sur différents agents pathogènes (bactéries $Gram^+$ et $Gram^-$, champignons). Ainsi, les dendrimères greffés de L-lysine présentent une activité antibactérienne (en phase homogène ou sur support) assez large car ils agissent aussi bien sur les bactéries $Gram^+$ que sur les $Gram^-$, et ils ont aussi une activité antifongique, les générations 2 et 3 étant les plus actives[8]. Ces tests ont permis de démontrer que les DGL peuvent être immobilisés sur des supports via des liaisons covalentes (résines) ou ioniques (charbon actif) sans altérer leurs propriétés. Les résultats obtenus indiquent aussi que les DGL sont susceptibles d'être utilisés pour lutter contre le « fouling » (colonisation spontanée d'un support par les organismes marins), notamment en empêchant la formation du film bactérien à l'origine de ce phénomène. Par ailleurs, une étude sur la toxicité aiguë et chronique du DGL **G3** sur des rats a mis en évidence la non toxicité de ces macromolécules[8]. De plus, ils sont non immunogènes[68,69]et ont une aptitude à interagir avec les membranes cellulaires[70].

En somme, les DGL sont obtenus de façon originale par un processus de synthèse parfaitement reproductible permettant de synthétiser jusqu'à 60g de DGL **G1** avec des matières premières de faibles coûts. Ce procédé implique la polymérisation en phase aqueuse d'un NCA, préparé *in situ* et non purifié, conduisant à des matériaux uniques qui s'apparentent plus à des dendrimères qu'à des dendrimères greffés, au niveau du taux de greffage, tout en conservant des caractéristiques propres aux dendrimères greffés comme la flexibilité ou encore la densité de fonctions réactives. Ces nanomatériaux sont d'ores et déjà commercialisés par la société COLCOM[71], exploitant au maximum les propriétés de ces macromolécules dans des applications telles que la création d'un kit de diagnostic pour la détection et la quantification de la flore bactérienne totale de l'eau (Dendridiag®). Ce kit est disponible avec différentes sensibilités pour s'adapter à la qualité des réseaux d'eaux comme les eaux industrielles, les eaux sanitaires et les eaux ultra-pures, ces dernières nécessitant un très faible seuil de détection des micro-organismes.

Au regard du large panel de propriétés démontrées par ces nouveaux matériaux, et afin de maximiser leur potentiel, il a semblé logique d'envisager leur modification, permettant ainsi d'augmenter la valeur ajoutée ainsi que le champ d'applications de ces molécules. A cet effet, nous avons identifié trois stratégies, exposées ci-après.

(i) Une première stratégie, la plus facile d'accès, réside dans la modification de la surface de ces molécules. En effet, les DGL présentent des fonctions amines à leur surface, ce qui en fait des entités polycationiques à pH physiologique. Il existe un grand nombre d'applications pour des dendrimères polycationiques comme les PAMAM (*e.g.* transfection d'ADN,…) mais ils sont aussi connus pour leur toxicité[72-74]. Celle-ci est en partie liée aux charges positives des fonctions amines et limite leur utilisation en milieu biologique[75]. La modulation[72,74,76,37] ou l'inversion[35] de la charge globale de ce type de matériaux permet de diminuer la toxicité qui leur est associée, tout en leur conférant de nouvelles propriétés. Les différents types de réactions impliquées dans cette stratégie sont déjà largement décrits dans la littérature.

(ii) Une autre stratégie consiste à modifier directement la première génération de DGL côté N-terminal ou côté C-terminal. Du côté N-terminal, cette modification peut se faire selon un couplage peptidique classique. Comme indiqué dans le schéma ci-dessous, cette réaction peut avoir lieu entre un DGL de 1ère génération sous forme protégée (cf. Schéma 2), noté **G1P**, et une molécule introduisant une nouvelle fonctionnalité.

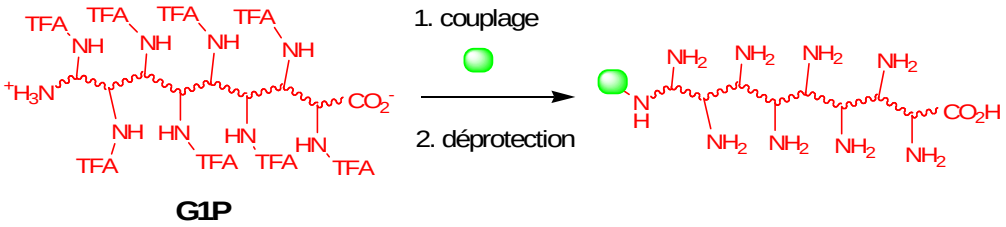


Schéma 4 : Modification de la 1ère génération de DGL côté N-terminal par couplage peptidique

Du côté C-terminal, tout comme précédemment, il est possible de réaliser un couplage peptidique classique, mais en prenant soin de protéger au préalable l'amine terminale de **G1P** comme le montre le schéma ci-dessous.

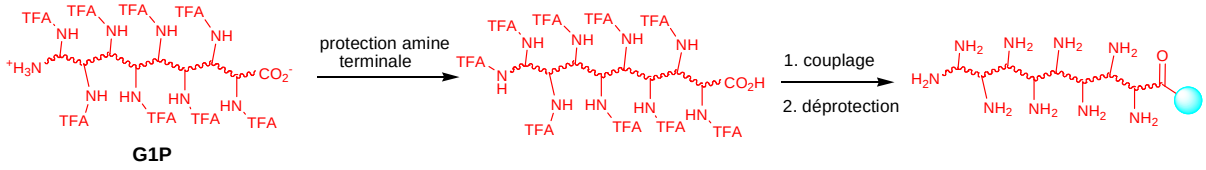


Schéma 5 : Modification de la 1ère génération de DGL côté C-terminal par couplage peptidique

Après déprotection des amines, le **G1** ainsi formé peut être utilisé pour la synthèse de DGL de générations supérieures, confinant la nouvelle fonctionnalité acquise, selon la taille de la molécule couplée, au cœur ou à la périphérie du DGL. Nous n'avons pas exploré cette stratégie faisant appel à une réaction très connue de la chimie des acides aminés, pour orienter nos recherches vers un nouveau mode de fonctionnalisation de la 1ère génération de DGL plus original, présenté ci-après.

(iii) Toujours du côté C-terminal, une alternative intéressante au couplage peptidique est d'introduire une nouvelle fonctionnalité sur **G1** au cours de la synthèse ce dernier. En effet, il est possible de modifier la première génération en mettant à profit le mode particulier de synthèse des DGL, par l'utilisation d'un amorceur aminé capable d'initier la polymérisation du Lys(TFA)-NCA.

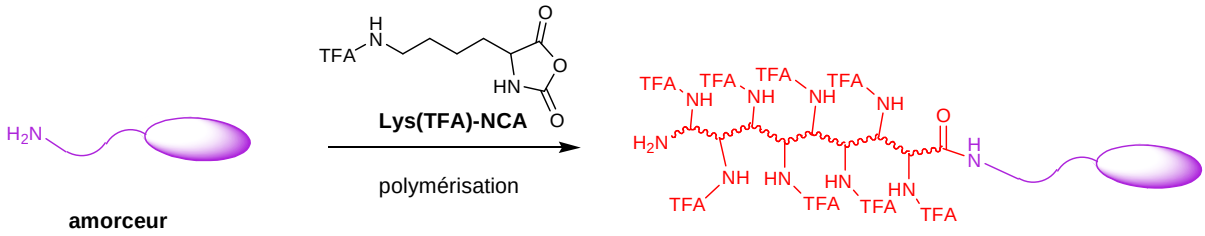


Schéma 6 : Modification de la 1ère génération de DGL par amorçage de la polymérisation de Lys(TFA)-NCA

Comme le montre le schéma ci-dessus, l'amorceur, portant une fonction amine, initie la polymérisation du NCA de Lys(TFA) conduisant à la formation d'un oligopeptide linéaire fonctionnalisé côté C-terminal par cet amorceur. La nature de ce dernier possède une très grande variabilité dans cette stratégie. Celui-ci peut être composé d'un groupement fluorescent ou contenir une molécule ayant une activité biologique particulière ou encore avoir une réactivité spécifique portée par un bras espaceur servant de point d'ancrage pour l'insertion d'une biomolécule par exemple.

Toutefois, afin d'explorer cette nouvelle voie de modification des DGL, il est nécessaire de revenir sur les bases du procédé de synthèse, c'est-à-dire sur la réaction de formation du NCA, étape-clé du procédé, et sur la polymérisation de ce dernier en phase aqueuse. L'analyse de ce processus permettra, dans un premier temps, de bien comprendre et maîtriser le mécanisme de formation des DGL. Dans un deuxième temps, cela permettra de prévoir et de mesurer l'influence de la modification d'un tel système par l'ajout d'un amorceur, apportant une nouvelle fonctionnalité, dans l'étape de polymérisation du NCA. Une fois le

DGL de première génération modifié côté C-terminal obtenu, les générations supérieures pourront être préparées à partir de ce dernier. Bien entendu, cela n'exclut pas la possibilité de modifier les amines de surface de ces DGL nouvellement synthétisés. Une porte donnant accès à une multitude de structures différentes (greffage en surface et à l'intérieur du DGL) sera alors à notre portée (Figure 4).

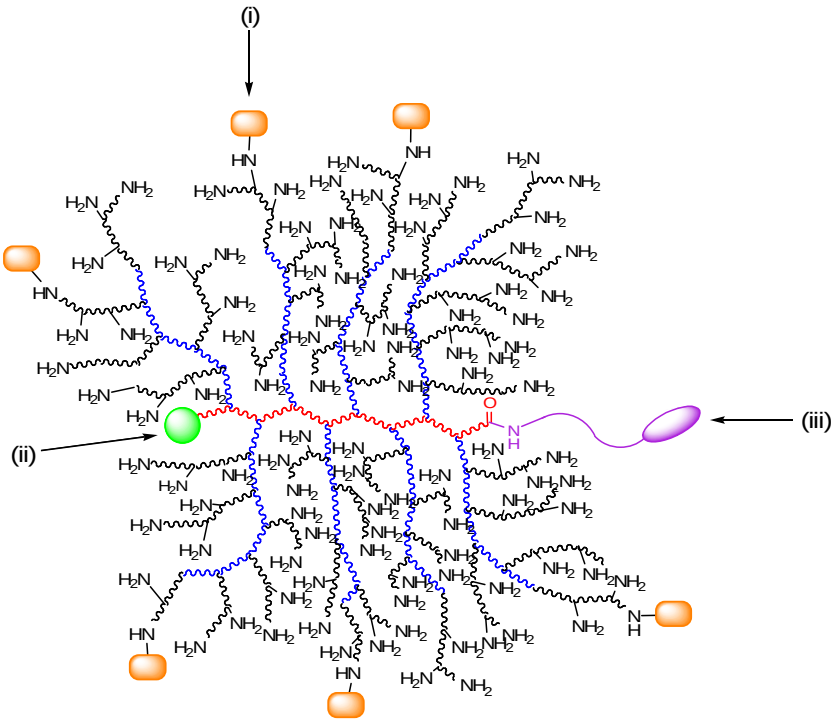


Figure 4 : Possibilités de modifications des DGL. (i) modification des amines de surface. (ii) modification de la 1ère génération côté N-terminal. (iii) modification de la 1ère génération côté C-terminal.

C'est pourquoi le travail exposé dans ce mémoire a pour objectif d'explorer les différents modes de modification des dendrimères greffés de L-lysine et d'en évaluer la faisabilité.

Dans une première partie, nous traiterons de la polymérisation auto-amorcée en milieu hétérogène du Lys(TFA)-NCA préparé *in situ* par nitrosation. Après un rappel des principaux mécanismes de polymérisation des NCA, pour la plupart en milieu organique anhydre, la synthèse des DGL sera détaillée point par point. A cette occasion, nous tenterons d'identifier les produits secondaires générés lors de ce processus et d'élucider leurs mécanismes de formation. Cette étude préliminaire est effectuée en vue de la modification du DGL côté C-terminal par l'amorçage de la polymérisation du NCA, qui sera l'objet du chapitre suivant.

En effet, dans la deuxième partie de ce mémoire, nous aborderons les aspects relatifs à la polymérisation du Lys(TFA)-NCA amorcée par différentes amines primaires, correctement

choisies, en milieu hétérogène. La possibilité d'introduire un fluorophore par ce biais sera aussi évaluée. Ce fluorophore situé au cœur permettrait de suivre les DGL en milieu biologique[70] tout en laissant la possibilité de fonctionnaliser la surface. Les résultats obtenus seront mis en relation avec les récents travaux de Lahav *et al.*[77-81] permettant ainsi de les rationaliser. Cela conduira à l'étude de la polymérisation du Lys(Tfa)-NCA, sans ajout d'amorceur, en présence d'un co-solvant, l'acétonitrile. Après évaluation de l'effet de ce milieu sur les oligomères obtenus, l'ajout d'un amorceur fluorescent dans ce système permettra de mettre en évidence l'importance du phénomène de démixtion intervenant à 0°C, selon le taux d'acétonitrile employé.

A la suite de ce chapitre, nous étudierons la faisabilité de la synthèse d'un bras de liaison adapté à la ligation et de son insertion au sein du DGL. Cette molécule permettra d'introduire une fonctionnalité nouvelle autorisant la ligation sur le DGL **G1** via la polymérisation du NCA. Comme le montre le schéma 7 ci-dessous, la stratégie de modification de la 1ère génération de DGL via l'amorçage de la polymérisation du NCA offre la possibilité d'introduire un bras espaceur adapté à la ligation les DGL **G1** et **G2** afin de préparer un bioconjugué utilisable pour la vectorisation par exemple.

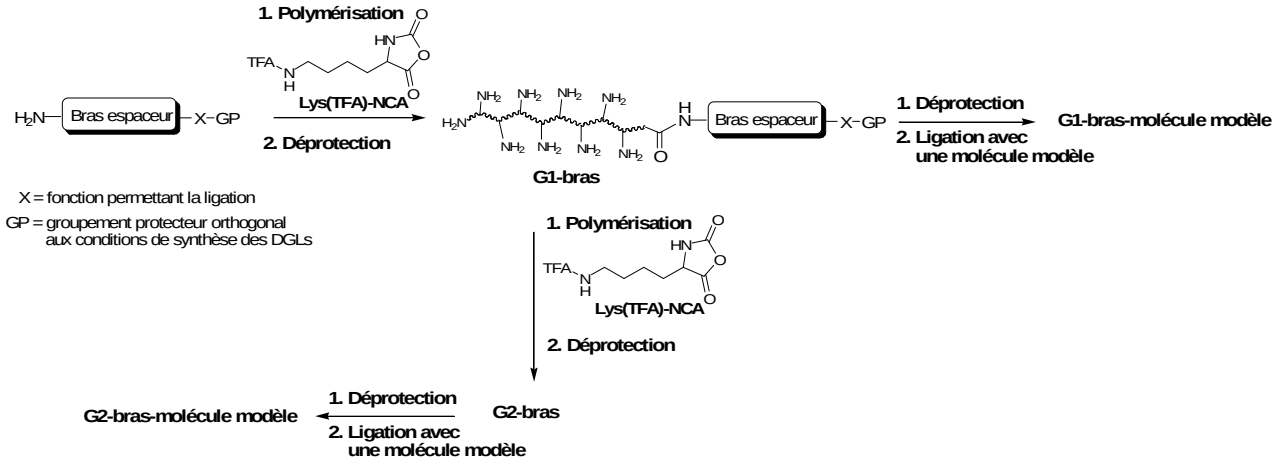


Schéma 7 : Fonctionnalisation d'un DGL par un bras de liaison adapté à la ligation

Un descriptif sur les différents types de ligation envisageables sera établit. Après avoir motivé le choix d'un bras espaceur de type polyéthylène glycol, un état des lieux des méthodes de désymétrisation des polyéthylènes glycols et des méthodes d'introduction des fonctions servant au type de ligation choisi sera exposé. Ensuite, la synthèse du bras espaceur ainsi que son insertion via la polymérisation du Lys(TFA)-NCA, préparé par nitrosation, conduisant à la formation de **G1-bras** et **G2-bras** seront détaillées. La faisabilité de la ligation de **G1-bras**

et **G2-bras** avec une molécule modèle sera testée afin de valider cette approche de fonctionnalisation.

Enfin, le dernier chapitre sera consacré à la modification en surface des DGL. Cet aspect sera illustré par le greffage de sucres sur les DGL. En se basant sur les travaux de Baigude *et al*.[42-46] sur l'introduction de sucres sur des dendrimères de lysine, la glycosylation réductrice de **G1** sera réalisée. Un exemple d'application des composés synthétisés dans le domaine analytique viendra étayer cette partie. La modification des amines de surface par des substrats de type acide succinique, acide aspartique et guanidine sera aussi explorée.

Références bibliographiques

1. Teertstra, S. J.; Gauthier, M. *Progress in Polymer Science* **2004,** *29*, 277-327.
2. Kojima, C.; Kono, K.; Maruyama, K.; Takagishi, T. *Bioconjugate Chemistry* **2000,** *11*, 910-917.
3. Cheng, Y.; Man, N.; Xu, T.; Fu, R.; Wang, X.; Wang, X.; Wen, L. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007,** *96*, 595-602.
4. Vandamme, T. F.; Brobeck, L. *Journal of Controlled Release* **2005,** *102*, 23-38.
5. Tomalia, D. A.; Hedstrand, D. M.; Ferritto, M. S. *Macromolecules* **1991,** *24*, 1435-1438.
6. Gauthier, M.; Moeller, M. *Macromolecules* **1991,** *24*, 4548-4553.
7. Gauthier, M. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2007,** *45*, 3803-3810.
8. Commeyras, A.; Collet, H.; Souaid, E.; Cottet, H.; Romestand, B.; Trambouze, O. In *PCT/FR2006/000952 (extension du brevet FR n° 05/04309)*, **2006**.
9. Jones, K.; Domke, T. W.; Gardella, J. In *US Patent 5714447*, **1998**.
10. Fujii, M.; Hatakeyama, M.; Hiraki, J. In *US Patent 5009907*, **1991**.
11. Sakai, I. In *US Patent 5453420*, **1995**.
12. Bercovici, D.; Gaertner, H.; Puigserver, A. In *US Patent 4701328*, **1987**.
13. Sanders, J. L. In *US Patent 5709890*, **1998**.
14. Miyazaki, T.; Motoi, H.; Kodama, T.; Maeda, T.; Tsujita, T.; Okuda, H. In *US Patent 5411956*, **1995**.
15. Porter, G. L. In *US Patent 4457907*, **1984**.
16. Mori, S.; Akamatsu, A.; Togo, K. In *US Patent 3867520*, **1975**.
17. Goosen, M. F. A.; O'Shea, G. M.; Sun, A. M. In *US Patent 4673566*, **1987**.
18. Miyazaki, T.; Motoi, H.; Kodama, T.; Maeda, T.; Tsujita, T.; Okuda, H. In *US Patent 5376640*, **1994**.
19. Kuo, M. T.; Ding, Z.-M. In *US Patent 5766899*, **1998**.
20. Wu, G. Y.; Wu, C. H.; Zhang, Y.; Spitalny, G. L.; Carmichael, E. In *US Patent 5728399*, **1998**.
21. Welsh, M. J.; Fasbender, A. J. In *WO 98/22144*, **1998**.
22. Sela, M.; Arnon, R.; Jacobson, I. *Biopolymers* **1963,** *1*, 517-525.
23. Kricheldorf, H. R.; Fehrle, M. *Biopolymers* **1982,** *21*, 2097-2122.

24. Denkewalter, R. G.; Kolc, J. F.; Lukasavage, W. J. In *US Patent 4289872*, **1981**.
25. Denkewalter, R. G.; Kolc, J. F.; Lukasavage, W. J. In *US Patent 4410688*, **1983**.
26. Klok, H.-A.; Rodriguez-Hernandez, J. *Macromolecules* **2002,** *35*, 8718-8723.
27. Klok, H.-A.; Rodriguez-Hernandez, J.; Müllen, K. In *WO/2003/064452*, **2003**.
28. Rodriguez-Hernandez, J.; Gatti, M.; Klok, H.-A. *Biomacromolecules* **2003,** *4*, 249-258.
29. Matthews, B. R.; Holan, G. In *WO/1995/034595*, **1995**.
30. Matthews, B. R.; Holan, G. In *WO/2000/015240*, **2000**.
31. Matthews, B. R.; Holan, G.; Mardell, K. W. In *WO/2000/015239*, **2000**.
32. Matthews, B. R.; Holan, G.; Giannis, M. P. In *WO/2002/079298*, **2002**.
33. Matthews, B. R.; Holan, G.; Karellas, P.; Henderson, S. A.; O'Keefe, D. F. In *WO/2002/079299*, **2002**.
34. Boyd, B. J.; Kaminskas, L. M.; Karellas, P.; Krippner, G.; Lessene, R.; Porter, C. J. H. *Molecular Pharmaceutics* **2006,** *3*, 614-627.
35. Kaminskas, L. M.; Boyd, B. J.; Karellas, P.; Henderson, S. A.; Giannis, M. P.; Krippner, G. Y.; Porter, C. J. H. *Molecular Pharmaceutics* **2007,** *4*, 949-961.
36. Kaminskas, L. M.; Boyd, B. J.; Karellas, P.; Krippner, G. Y.; Lessene, R.; Kelly, B.; Porter, C. J. H. *Molecular Pharmaceutics* **2008,** *5*, 449-463.
37. Kaminskas, L. M.; Wu, Z.; Barlow, N.; Krippner, G. Y.; Boyd, B. J.; Porter, C. J. H. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009,** *98*, 3871-3875.
38. Choi, J. S.; Joo, D. K.; Kim, C. H.; Kim, K.; Park, J. S. *Journal of the American Chemical Society* **2000,** *122*, 474-480.
39. Kato, T.; Uchiyama, M.; Maruo, N.; Arai, T.; Nishino, N. *Chemistry Letters* **2000,** *29*, 144-145.
40. Ohsaki, M.; Okuda, T.; Wada, A.; Hirayama, T.; Niidome, T.; Aoyagi, H. *Bioconjugate Chemistry* **2002,** *13*, 510-517.
41. Okuda, T.; Kidoaki, S.; Ohsaki, M.; Koyama, Y.; Yoshikawa, K.; Niidome, T.; Aoyagi, H. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003,** *1*, 1270-1273.
42. Baigude, H.; Katsuraya, K.; Okuyama, K.; Yachi, Y.; Sato, S.; Uryu, T. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2002,** *40*, 3622-3633.
43. Baigude, H.; Katsuraya, K.; Okuyama, K.; Tokunaga, S.; Uryu, T. *Macromolecules* **2003,** *36*, 7100-7106.

44. Baigude, H.; Katsuraya, K.; Okuyama, K.; Hatanaka, K.; Ikeda, E.; Shibata, N.; Uryu, T. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2004,** *42*, 1400 - 1414.
45. Baigude, H.; Katsuraya, K.; Okuyama, K.; Kariya, N.; Uryu, T. *Sen'i Gakkaishi* **2004,** *60*, 118-124.
46. Baigude, H.; Katsuraya, K.; Tokunaga, S.; Fujiwara, N.; Satoyama, M.; Magome, T.; Okuyama, K.; Borjihan, G.; Uryu, T. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2005,** *43*, 2195-2206.
47. Okuda, T.; Kawakami, S.; Akimoto, N.; Niidome, T.; Yamashita, F.; Hashida, M. *Journal of Controlled Release* **2006,** *116*, 330-336.
48. Okuda, T.; Kawakami, S.; Maeie, T.; Niidome, T.; Yamashita, F.; Hashida, M. *Journal of Controlled Release* **2006,** *114*, 69-77.
49. Yamagata, M.; Kawano, T.; Shiba, K.; Mori, T.; Katayama, Y.; Niidome, T. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007,** *15*, 526-532.
50. Fox, M. E.; Guillaudeu, S.; Fréchet, J. M. J.; Jerger, K.; Macaraeg, N.; Szoka, F. C. *Molecular Pharmaceutics* **2009,** *6*, 1562-1572.
51. Han, S.; Baigude, H.; Hattori, K.; Yoshida, T.; Uryu, T. *Carbohydrate Polymers* **2007,** *68*, 26-34.
52. Han, S.; Yoshida, T.; Uryu, T. *Carbohydrate Polymers* **2007,** *69*, 436-444.
53. Niidome, T.; Ohsaki, M.; Hirayama, T.; Wada, A.; Aoyagi, H. *Peptide Science* **2001,** *2000*, 201-204.
54. Florence, A. T.; Sakthivel, T.; Toth, I. *Journal of Controlled Release* **2000,** *65*, 253-259.
55. Kantchev, E. A. B.; Chang, C.-C.; Chang, D.-K. *Peptide Science* **2006,** *84*, 232-240.
56. Tam, J. P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988,** *85*, 5409-5413.
57. Tam, J. P.; Lu, Y.-A.; Yang, J.-L. *European Journal of Biochemistry* **2002,** *269*, 923-932.
58. Al-Hamra, M.; Ghaddar, T. H. *Tetrahedron Letters* **2005,** *46*, 5711-5714.
59. Lee, C. C.; Frechet, J. M. J. *Macromolecules* **2006,** *39*, 476-481.
60. Collet, H.; Souaid, E.; Cottet, H.; Deratani, A.; Boiteau, L.; Dessalces, G.; Rossi, J.-C.; Commeyras, A.; Pascal, R. *Chemistry - A European Journal* **2010,** *16*, 2309-2316.

61. Taillades, J.; Boiteau, L.; Beuzelin, I.; Lagrille, O.; Biron, J.-P.; Vayaboury, W.; Vandenabeele-Trambouze, O.; Giani, O.; Commeyras, A. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **2001**, 1247 - 1254.
62. Commeyras, A.; Collet, H.; Mion, L.; Benefice-Malouet, S.; Calas, P.; Choukroun, H.; Taillades, J. In *PCT/FR 95/01380*, 1995.
63. Collet, H.; Bied, C.; Mion, L.; Taillades, J.; Commeyras, A. *Tetrahedron Letters* **1996,** *37*, 9043-9046.
64. Kricheldorf, H. R. *Springer-Velag, Berlin* **1987**.
65. Kricheldorf, H. R. *Angewandte Chemie International Edition* **2006,** *45*, 5752-5784.
66. Hadjichristidis, N.; Iatrou, H.; Pitsikalis, M.; Sakellariou, G. *Chemical Reviews* **2009,** *109*, 5528-5578.
67. Cottet, H.; Martin, M.; Papillaud, A.; Souaid, E.; Collet, H.; Commeyras, A. *Biomacromolecules* **2007,** *8*, 3235-3243.
68. Johannessen, C.; Kapitan, J.; Collet, H.; Commeyras, A.; Hecht, L.; Barron, L. D. *Biomacromolecules* **2009,** *10*, 1662-1664.
69. Romestand, B.; Rolland, J. L.; Commeyras, A.; Coussot, G.; Desvignes, I.; Pascal, R.; Vandenabeele-Trambouze, O. *Biomacromolecules* **2010,** *11*, 1169-1173.
70. Tsogas, I.; Theodossiou, T.; Sideratou, Z.; Paleos, C. M.; Hélène Collet; Rossi, J.-C.; Romestand, B.; Commeyras, A. *Biomacromolecules* **2007,** *8*, 3263-3270.
71. COLCOM. *http://www.colcom.eu*.
72. Malik, N.; Wiwattanapatapee, R.; Klopsch, R.; Lorenz, K.; Frey, H.; Weener, J. W.; Meijer, E. W.; Paulus, W.; Duncan, R. *Journal of Controlled Release* **2000,** *65*, 133-148.
73. Fischer, D.; Li, Y.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J.; Kissel, T. *Biomaterials* **2003,** *24*, 1121-1131.
74. Jevprasesphant, R.; Penny, J.; Jalal, R.; Attwood, D.; McKeown, N. B.; D'Emanuele, A. *International Journal of Pharmaceutics* **2003,** *252*, 263-266.
75. Bhadra, D.; Yadav, A. K.; Bhadra, S.; Jain, N. K. *International Journal of Pharmaceutics* **2005,** *295*, 221-233.
76. Agrawal, P.; Gupta, U.; Jain, N. K. *Biomaterials* **2007,** *28*, 3349-3359.
77. Nery, J. G.; Eliash, R.; Bolbach, G.; Weissbuch, I.; Lahav, M. *Chirality* **2007,** *19*, 612-624.

78. Eliash, R.; Nery, Jose G.; Rubinstein, I.; Clodic, G.; Bolbach, G.; Weissbuch, I.; Lahav, M. *Chemistry - A European Journal* **2007,** *13*, 10140-10151.

79. Rubinstein, I.; Eliash, R.; Bolbach, G.; Weissbuch, I.; Lahav, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2007,** *46*, 3710-3713.

80. Rubinstein, I.; Clodic, G.; Bolbach, G.; Weissbuch, I.; Lahav, M. *Chemistry - A European Journal* **2008,** *14*, 10999-11009.

81. Weissbuch, I.; Illos, R. A.; Bolbach, G. r.; Lahav, M. *Accounts of Chemical Research* **2009,** *42*, 1128-1140.

Chapitre I

Contribution à l’étude de la polymérisation auto-amorcée des NCA en milieu hétérogène

I. Contribution à l'étude de la polymérisation auto-amorcée des NCA en milieu hétérogène

I.1 Introduction

La méthode de synthèse de dendrimères greffés de L-lysine (DGL) développée au laboratoire, est basée sur la polymérisation du N^{ε}-TFA-L-lysine-*N*-carboxyanhydride, notée **Lys(TFA)-NCA**, en phase aqueuse, en utilisant comme macroamorceur pour la génération n, le produit obtenu lors de la génération n-1 dans des conditions contrôlées de température et de pH[1,2]. D'une manière générale, la méthode la plus simple et la plus utilisée pour la préparation des NCA est la réaction entre un acide aminé libre AA et le phosgène. Cette procédure, appelée méthode de Fuchs-Farthing[3-6], implique la formation intermédiaire d'un *N*-chloroformylacide aminé (Schéma 8). Il faut noter que plusieurs cristallisations successives sont nécessaires à l'obtention d'un NCA pur.

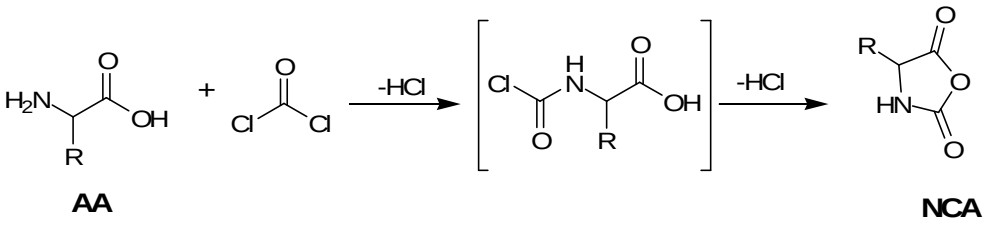


Schéma 8 : Synthèse d'un NCA via le phosgène

Le NCA que nous utilisons pour réaliser la polymérisation est préparé *in situ* selon un procédé original. Cette méthode de synthèse, évitant l'utilisation du phosgène (composé hautement toxique), est basée sur une réaction de nitrosation d'un acide aminé carbamoylé CAA par un mélange gazeux NO/O_2[7]. Nous détaillerons plus loin le mécanisme de cette réaction.

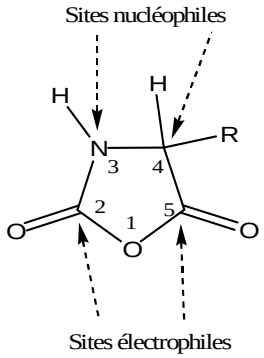


Figure 5 : *N*-CarboxyAnhydride

Les NCA (Figure 5) sont des composés très réactifs, connus depuis longtemps pour leur aptitude à polymériser[8]. Ils possèdent 4 sites réactifs: deux sites électrophiles (les carbones C2 et C5) et deux nucléophiles correspondant au NH en position 3 et au CH en position 4 qui après déprotonation donnent respectivement des amidures et des carbanions très réactifs.
Leuchs[8] a été le premier à décrire la synthèse d'un polypeptide en faisant réagir les NCA en présence d'eau. Depuis, la polymérisation des NCA a suscité l'attention de nombreux chercheurs et est devenue une méthode de choix pour synthétiser des polypeptides. Cet engouement pour les NCA est toujours d'actualité comme en témoigne la publication récente de deux revues concernant ces molécules par Kricheldorf[9] en 2006 et Hadjichristidis[10] en 2009. L'étude de la polymérisation des NCA montre cependant une grande complexité en raison de la multiple réactivité des monomères. La multiplicité des sites réactionnels implique d'avoir une bonne connaissance des mécanismes mis en jeu lors de la polymérisation et une bonne maîtrise des conditions opératoires. De plus, l'espèce chimique permettant d'initier la polymérisation des NCA joue un rôle déterminant dans le mécanisme de cette réaction.

I.2 Mécanismes de polymérisation des NCA

Dans la littérature, on dénombre 3 mécanismes principaux de polymérisation[11] des NCA : le mécanisme de l'amine, le mécanisme du carbamate, qui est une variante du mécanisme de l'amine, et le mécanisme du monomère activé. D'autres mécanismes faisant intervenir des métaux de transition seront aussi abordés.

I.2.1 Le mécanisme de l'amine

Le mécanisme de l'amine peut être décrit de la façon suivante : dans un premier temps, l'amorceur effectue une attaque nucléophile sur le carbone le plus électrophile (celui en position 5) du NCA. Cette attaque nucléophile est suivie d'une décarboxylation de l'acide carbamique formé. Cette réaction conduit à la formation d'un amide α-aminé : c'est l'étape d'amorçage de la polymérisation (Schéma 9).

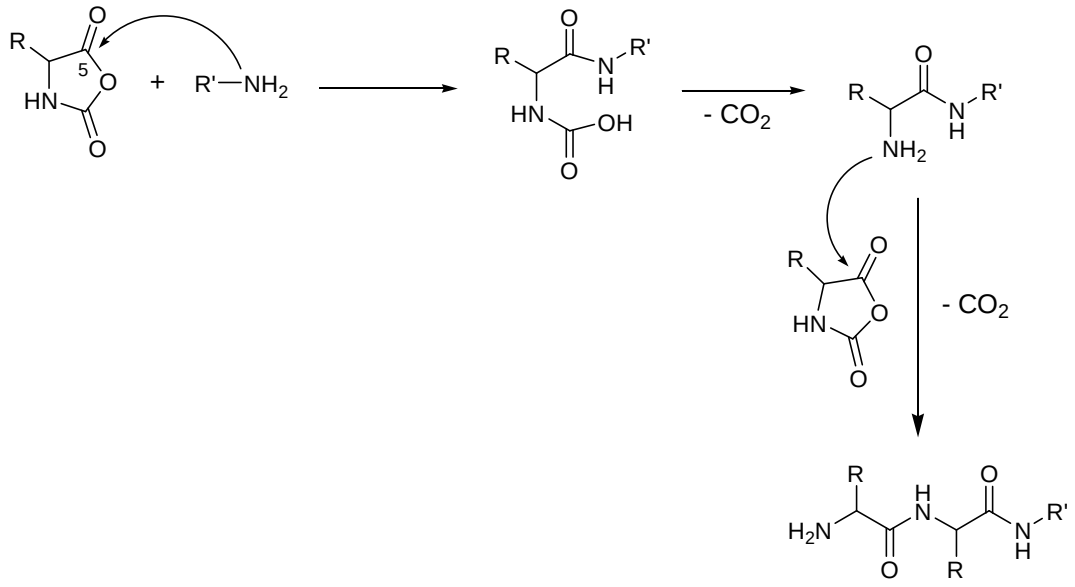


Schéma 9 : Mécanisme de l'amine

La réaction de propagation fait intervenir l'amide α-aminé nouvellement formé qui attaque, avec sa fonction amine, le carbone en position 5 d'un autre NCA. L'entité ainsi formée se décarboxyle à son tour pour conduire à un dimère possédant une fonction amine terminale réactive (Schéma 9). Ce processus conduit à l'incorporation de l'amorceur en bout de chaîne du côté du carbone terminal du polypeptide.

Ce mécanisme a été validé par différentes études cinétiques de polymérisation du NCA de l'acide glutamique γ-benzoylé dans le dioxane[12,13]. La preuve de ce mécanisme a été apportée indépendamment par Peggion *et al.*[14] et Goodman *et al.*[15] en confirmant l'incorporation de l'amorceur, marqué au ^{14}C, dans le polymère final. Le NCA a lui aussi été marqué au ^{14}C afin de déterminer le site d'attaque de l'amine. Ce mécanisme de polymérisation est attribué aux amines primaires, et notamment aux acides aminés. Mais les amines secondaires faiblement encombrées peuvent aussi initier la polymérisation des NCA selon ce mécanisme.

Cependant, il a été observé que les amines primaires peuvent amorcer la polymérisation des NCA selon un autre mécanisme, plus connu sous le nom de mécanisme du carbamate.

I.2.1.1 Le mécanisme du carbamate

Ce mécanisme a été mis en évidence pour la première fois par Idelson et Blout[16] au cours de la polymérisation du NCA de l'acide glutamique γ-benzoylé dans le dioxane, en présence de MeONa. Dans le cas d'une amine primaire, le mécanisme de polymérisation se déroule comme suit :

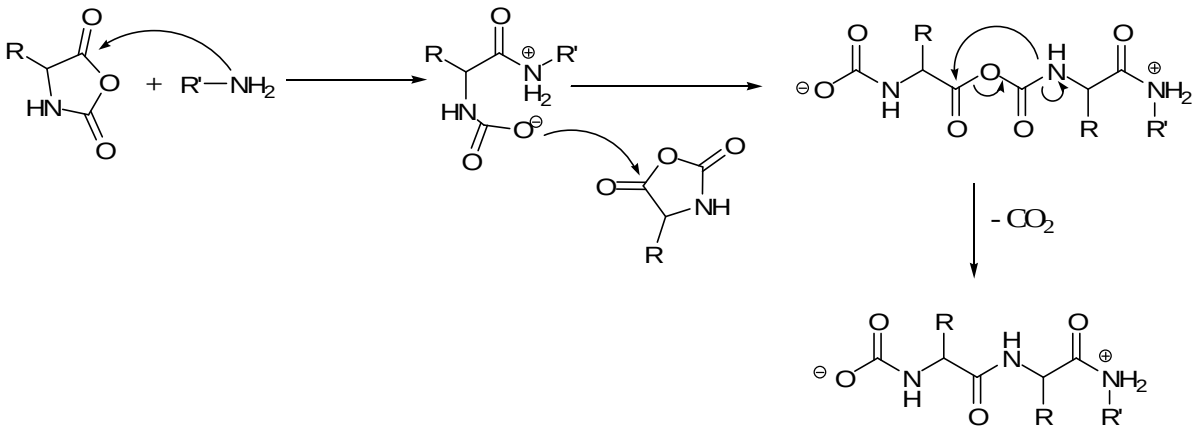


Schéma 10 : Mécanisme du carbamate

lorsque l'on se trouve dans des conditions basiques où la décarboxylation du carbamate, formé comme précédemment (Schéma 9), est défavorisée, celui-ci réagit comme un nucléophile vis-à-vis du carbone en position 5 d'un autre NCA, pour conduire à un anhydride interne. Ce dernier se décarboxyle lentement[17] allongeant d'une unité la chaîne en croissance via un couplage peptidique intramoléculaire (Schéma 10).

Lorsque l'amorceur est une amine secondaire fortement encombrée, une amine tertiaire ou une base forte, celui-ci se comporte différemment vis-à-vis du NCA et emprunte un autre mécanisme de polymérisation : le mécanisme du monomère activé.

I.2.2 Le mécanisme du monomère activé

Ce mécanisme a été proposé premièrement par Ballard *et al.*[18] pour expliquer la polymérisation du NCA de D,L-phénylalanine initiée par une amine tertiaire[19]. Plus tard, Szwarc[20,21] élargit le mécanisme du monomère activé à l'initiation de la polymérisation par

des bases fortes. Dans ce mécanisme, la base utilisée déprotone l'azote du NCA. L'anion du NCA (ou monomère activé), nucléophile, est capable d'interagir avec une seconde molécule de NCA, amorçant ainsi la polymérisation (Schéma 11).

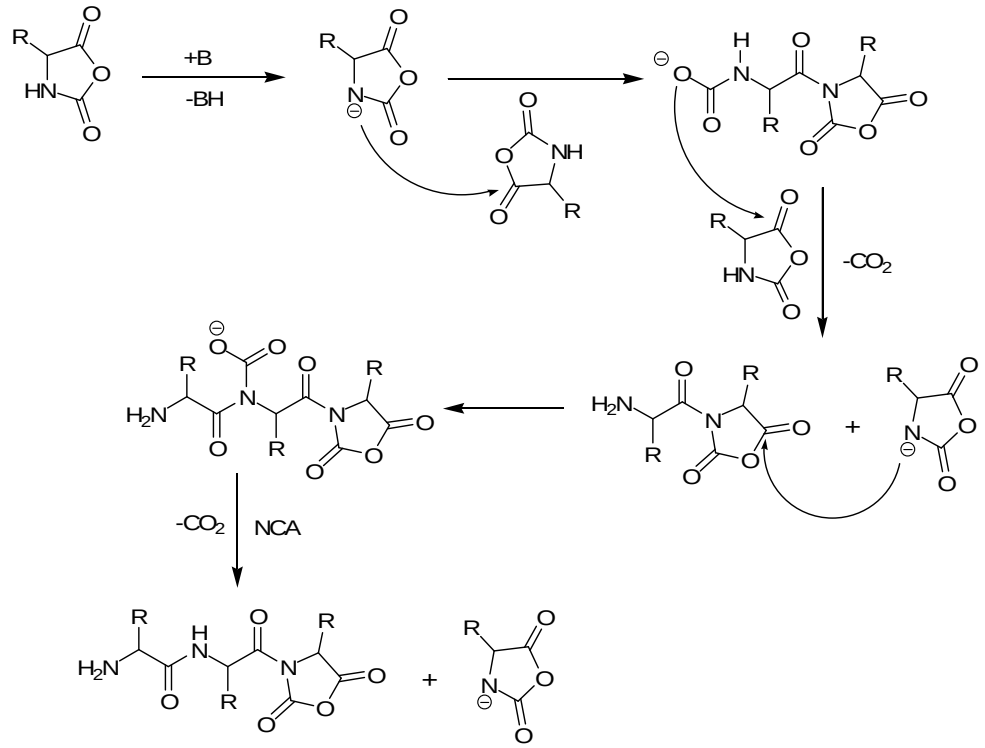


Schéma 11 : Mécanisme du monomère activé

L'entité formée réagit, par sa fonction carbamate, avec une autre molécule de NCA pour conduire après décarboxylation à un nouvel anion de NCA et un dimère. Celui-ci subit l'attaque de l'anion du NCA pour conduire, après réaction avec une autre molécule de NCA et décarboxylation, à un trimère ; et ainsi de suite. A chaque ajout d'acide aminé, il se reforme un anion de NCA. Dans ce cas la base utilisée ne joue pas le rôle d'amorceur, mais plutôt de catalyseur basique. C'est le NCA sous sa forme anionique qui est l'amorceur. Toutefois, dans le cas des NCA *N*-substitués[22], comme celui de la proline par exemple, le mécanisme de polymérisation amorcée par une base forte peut passer, dans ce cas très particulier, par la déprotonation du carbone C4.

Les réactions empruntant les mécanismes de l'amine, du carbamate ou du monomère activé nécessitent un milieu réactionnel très propre c'est-à-dire un solvant organique parfaitement anhydre et un NCA de très haute pureté. Autrement, il se produit des réactions de terminaison, souvent par cyclisation, conduisant à des bouts de chaînes de type dicétopipérazine ou encore

hydantoïne. La présence de chlorures, impuretés dues au procédé de synthèse des NCA par la méthode de Fuchs-Farthing (cf. Schéma 8), influe aussi sur la reproductibilité de la polymérisation car les ions chlorures peuvent intervenir dans le mécanisme de cette réaction[19,22].

En dehors des polymérisations de NCA initiées par des amines primaires ou des bases, des travaux ont été effectués utilisant des complexes de métaux de transition comme amorceurs.

I.2.3 Amorçage par des complexes organométalliques

Vers la fin des années 90, Deming[23-25] a découvert une nouvelle classe d'amorceur de polymérisation de NCA permettant de limiter les réactions de terminaison : les complexes organométalliques. Jusque là, les équipes travaillant sur la synthèse d'homo- et copolypeptides faiblement polydisperses et de haute masse moléculaire s'étaient heurtées à des réactions de terminaison dues à la présence d'eau, d'impuretés dans le NCA ou dans le solvant, conduisant à des polymères ayant des distributions de masses moléculaires assez larges. En utilisant les métaux de transition sous forme de complexes, Deming est parvenu à obtenir des homo- et des copolypeptides blocs avec une faible polydispersité (< 1,2). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les métaux de transition Ni et Co sous forme de bipyNi(COD)[†] et $(PMe_3)_4Co$ [25]. Récemment, une méthode donnant des résultats similaires à ceux obtenus par Deming et utilisant un complexe organométallique à base de Pt, a été décrite par Peng *et al.*[26]. Ces réactions suivent toutes le même mécanisme. Dans la première étape, le métal réagit avec le NCA via une addition oxydante au niveau de la liaison anhydride O-C5 pour former, après décarbonylation, un complexe cyclique à 5 membres (Schéma 12).

[†] Bipy = 2,2'-bipyridyl ; COD = 1,5-cyclooctadiène

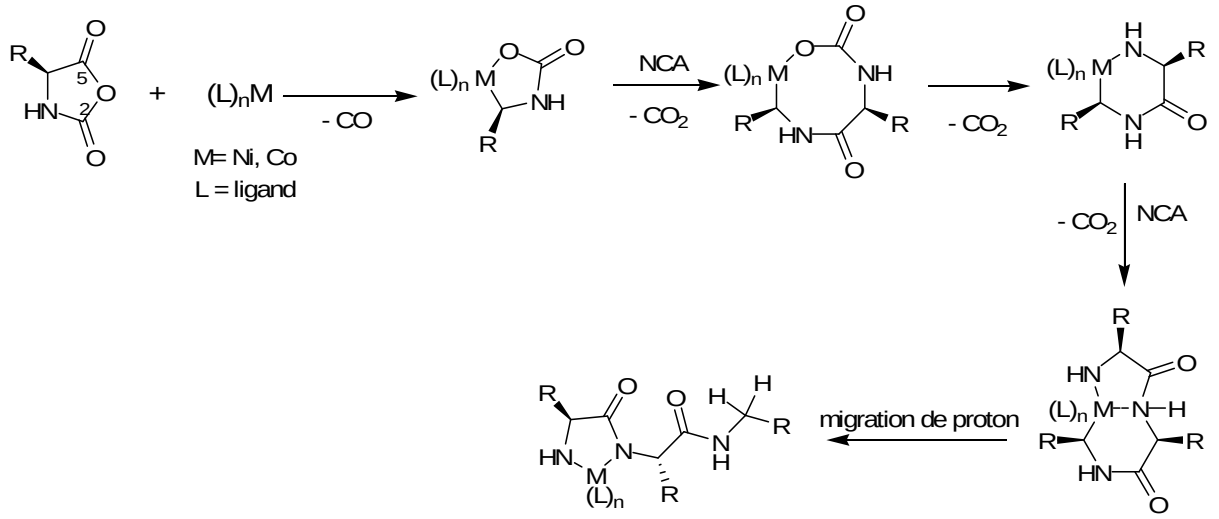


Schéma 12 : Mécanisme de polymérisation des NCA en présence de complexes organométalliques proposé par Deming *et al*.[27]

Ce dernier réagit avec une nouvelle molécule de NCA pour former, après décarboxylation, un cycle à 8 centres, qui perd aussitôt une molécule de CO_2 pour conduire à un complexe cyclique à 6 membres. Ce nouveau cycle réagit alors avec une molécule de NCA pour conduire à un intermédiaire cyclique plus grand, qui suite à une migration du proton de l'amide vers la liaison carbone-métal, donne un cycle complexe métallique amido-amidate à 5 membres. Cette entité est l'intermédiaire actif de la polymérisation (Schéma 12). La propagation de cette polymérisation se fait ensuite par le biais de l'attaque de la fonction amine de ce composé sur d'autres molécules de NCA, selon le schéma ci-dessous.

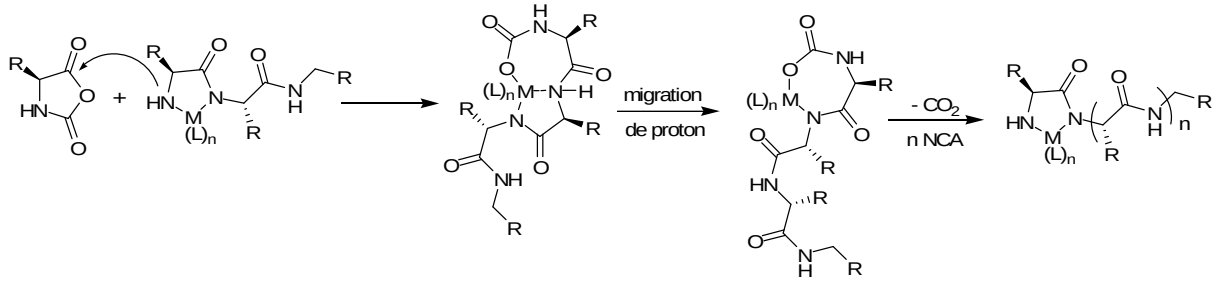


Schéma 13 : Propagation de la polymérisation

Cette réaction, nécessitant la présence d'un hydrogène sur l'azote du NCA, ne peut pas avoir lieu avec des NCA N-substitués[27]. Bien que cette méthode permette l'obtention de polypeptides bien définis, l'inconvénient majeur reste bien sûr la présence de métaux de transition dans le polypeptide final.

La polymérisation des NCA a été essentiellement étudiée dans milieux réactionnels anhydres avec des solvants tels que le DMF, le THF ou encore le dioxane. Cependant, très peu d'études ont été réalisées sur la polymérisation des NCA en milieu aqueux.

I.2.4 Cas particuliers de la polymérisation des NCA dans l'eau

Les premières études de la réaction des NCA en présence de nucléophiles ont commencé avec l'eau. Leuchs[8,28] a fait deux observations importantes : il obtient des polypeptides pour des rapports molaires NCA/H_2O>10 et des acides α-aminés (la glycine) pour des rapports NCA/H_2O<0,001. Pour des rapports intermédiaires, il constate la présence d'oligopeptides. Bartlett *et al.*[29,30], à l'aide d'une étude cinétique détaillée de l'hydrolyse à 0°C des NCA de la glycine, de la D,L-alanine et de l'acide α-aminoisobutyrique en milieu acide et neutre, proposent un mécanisme d'hydrolyse des NCA dans lequel une molécule d'eau attaque le carbone en position 5 du NCA (Schéma 14A). Il en résulte la formation d'un acide carbamique qui est mis en évidence par l'ajout de $Ca(OH)_2$ ou $Ba(OH)_2$ pour conduire au sel de Siegfried[31]comme l'indique la réaction ci-après (Schéma 14B).

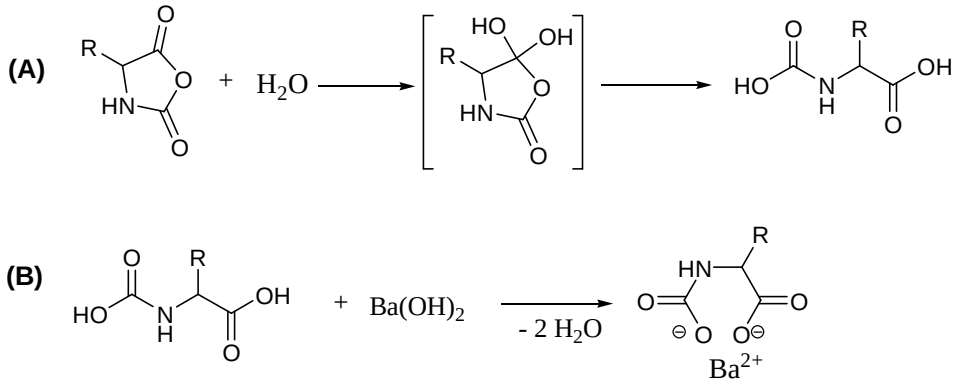


Schéma 14 : (A) Attaque d'une molécule d'eau sur un NCA (B) Formation du sel de Siegfried

Contrairement aux carbamates, l'acide carbamique est instable au-dessus de 0°C. Donc, le produit d'hydrolyse du NCA se décarboxyle pour former un acide α-aminé (Schéma 15).

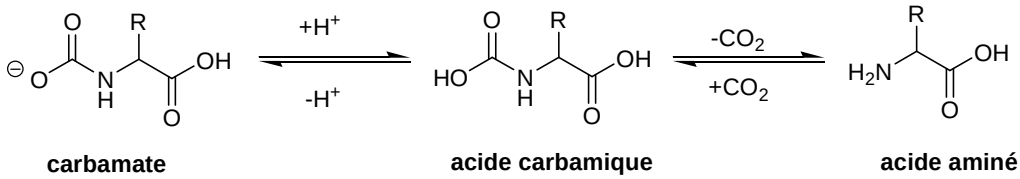


Schéma 15 : Décarboxylation de l'acide carbamique

Le taux de décarboxylation dépend de l'équilibre entre la forme ionique (carbamate) et la forme neutre (acide carbamique) donc de la nature de l'acide α-aminé et du pH. L'addition d'acide à une solution de NCA partiellement hydrolysés peut accélérer le processus de décarboxylation si des anions carbamates sont présents, car l'addition d'acide déplace l'équilibre vers la droite (Schéma 15). La décarboxylation est ensuite suivie par la protonation du groupement amine empêchant de ce fait, l'oligomérisation ou la polymérisation des NCA. En d'autres termes, pour une hydrolyse complète des NCA en acides aminés, sans formation de produits secondaires, il est préférable d'utiliser une solution aqueuse acide.

Lorsque le milieu a un pH basique, les ions OH^- catalysent l'hydrolyse des NCA, mais ils favorisent aussi la formation d'oligopeptides. A de tels pH, les fonctions amines se trouvent sous forme libre, et du fait de leur importante nucléophilie, elles peuvent concurrencer l'eau et les ions OH^- dans l'attaque des NCA non hydrolysés (Schéma 16).

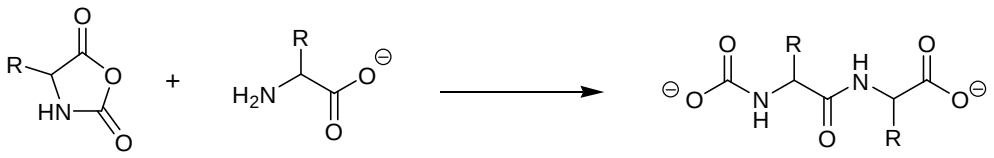


Schéma 16 : Attaque d'un acide aminé sur un NCA en milieu basique

Les ions carbamates sont plus nucléophiles que l'eau et par conséquent leur réaction avec les NCA peut concurrencer l'hydrolyse selon le mécanisme du carbamate (Schéma 10). Il devient évident que l'augmentation du pH favorise la formation d'oligopeptides au détriment d'acides aminés libres. Cependant, à pH alcalin, la polymérisation des NCA est rapide et non contrôlée[32]. La rapidité des réactions d'hydrolyse et d'aminolyse des NCA conduit généralement à la formation de matériaux hautement polydisperses.

D'après ces observations, si l'on se place à un pH légèrement acide (proche de la neutralité) un mécanisme hydrolytique où la molécule d'eau attaque le carbone en position 5 du NCA peut être envisagé (Schéma 17). L'acide carbamique, peu stable au-dessus de 0°C, est ensuite converti en acide α-aminé. Cet acide α-aminé peut alors réagir sur une nouvelle molécule de NCA via sa fonction amine selon le mécanisme de l'amine (Schéma 9) pour former des polypeptides.

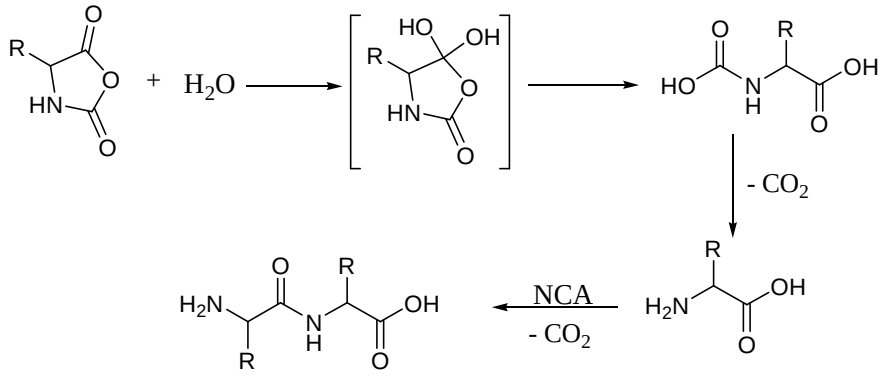


Schéma 17 : Mécanisme supposé de polymérisation des NCA en phase aqueuse légèrement acide

Liu[33] et Hitz[34,35] se sont aussi intéressés à la polymérisation des NCA en phase aqueuse. Ils ont réalisé la polymérisation dans l'eau à pH 6 et à une température de 0°C : ce sont des conditions très proches de celles que nous utilisons lors de la synthèse des DGL. Toutefois, ils utilisent une autre méthode pour préparer les NCA *in situ* : il s'agit de la réaction d'Ehler-Orgel[36]. Cette réaction fait appel à l'utilisation du carbonyldiimidazole (CDI) qui, en présence d'un acide aminé, subit une attaque nucléophile, venant de la fonction amine de l'acide aminé, pour conduire à une urée dissymétrique, avec libération d'imidazole, comme le montre le schéma ci-dessous.

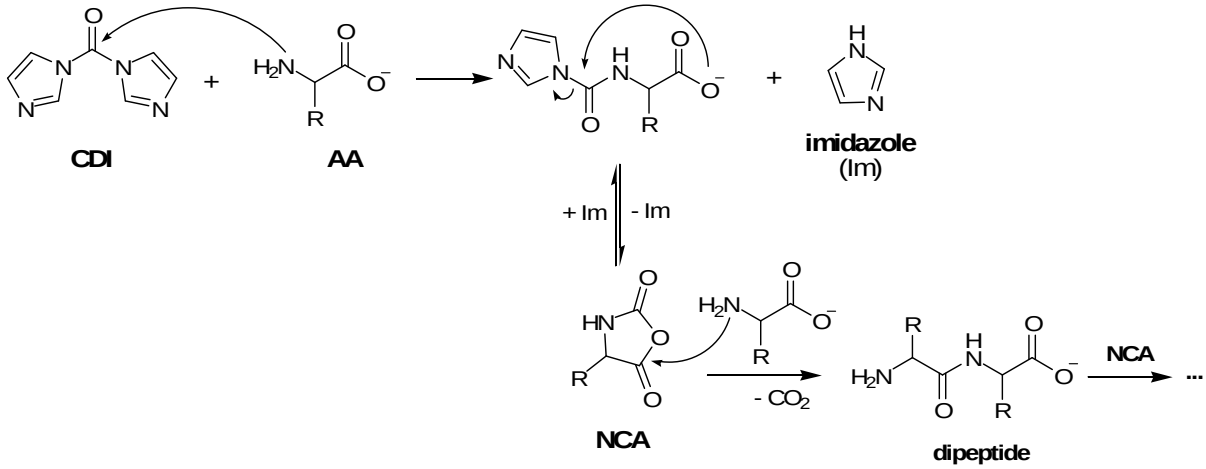


Schéma 18 : Préparation et polymérisation des NCA via l'utilisation du CDI

Cette entité peut alors se cycliser en NCA par l'attaque intramoléculaire du carboxylate sur le carbonyle de l'urée et la libération d'imidazole. Il s'établit alors un équilibre entre le NCA et l'urée dissymétrique. Le NCA ainsi formé peut subir l'attaque d'un acide aminé pour conduire au dipeptide, qui peut réagir à son tour sur une autre molécule de NCA pour former le tripeptide et ainsi de suite. La polymérisation se fait en « one pot ». Cependant, nous

pensons que le NCA n'est pas la seule entité qui puisse se former lors de la réaction entre le CDI et l'acide aminé. En effet, le carboxylate de l'acide aminé peut aussi attaquer le CDI pour conduire à un anhydride mixte intermédiaire comme le montre le schéma ci-dessous.

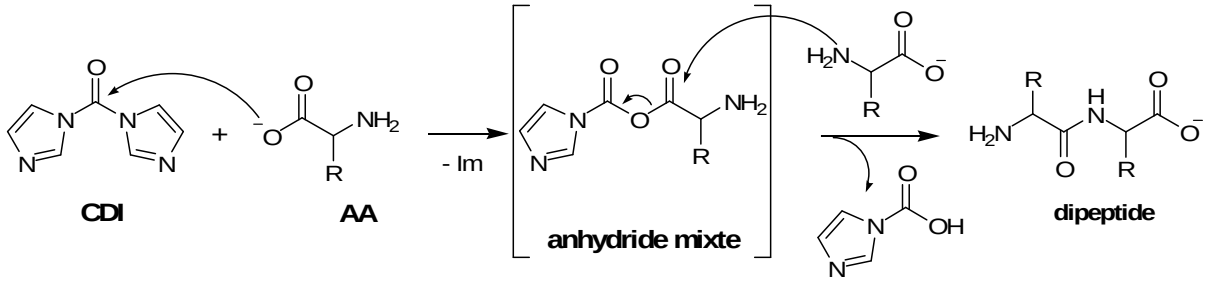


Schéma 19 : Polymérisation via le passage par un anhydride mixte

Un nouvel acide aminé peut alors attaquer cet anhydride pour conduire au dipeptide correspondant. Ce dipeptide peut réagir ensuite soit sur un NCA (Schéma 18) ou soit sur un autre anhydride mixte pour former un tripeptide. Par conséquent, il s'agit là pour nous non plus de polymérisation de NCA proprement dite mais plutôt de réactions de condensation entre des acides aminés ou peptides et des anhydrides mixtes.

Les travaux suivants issus de notre laboratoire[37] portant sur la réactivité du NCA de la valine en phase aqueuse et en milieu légèrement acide (pH 5-6,5) montrent que la réaction de condensation (réaction entre l'amine de l'acide α-aminé et le NCA) est cent fois plus rapide que l'hydrolyse.

Plus récemment, Lahav et ses collaborateurs[38-42] dans le cadre de leurs recherches sur les possibles voies prébiotiques pour la formation d'oligopeptides de séquences homochirales (isotactiques) à partir de précurseurs racémiques, ont étudié la polymérisation des NCA en phase hétérogène et en phase homogène. Pour cela, ils ont observé la polymérisation d'un mélange racémique de cristaux de NCA dans une solution aqueuse contenant une amine primaire pour amorcer la réaction. Les cristaux de NCA de configuration S ont été partiellement deutériés afin de différencier sur les spectres de masse les polypeptides homochiraux R et S. Ils ont utilisé des cristaux de (R,S)-Leu-NCA, (R,S)-Val-NCA et (R,S)-Phe-NCA et comme amorceurs la *n*-butylamine, et des acides aminés énantiopurs. D'après les résultats obtenus, ils ont proposé un mécanisme de polymérisation en trois étapes pour la polymérisation des NCA en phase hétérogène et pour la polymérisation en phase homogène. Les conditions réactionnelles utilisées par Lahav *et al*. étant celles qui se rapprochent le plus de celles que nous avons utilisées pour notre étude, nous détaillerons les travaux réalisés par cette équipe lors de la discussion des résultats.

Ainsi, après avoir exposé les différents mécanismes possibles de polymérisation des NCA, nous allons présenter dans les paragraphes ci-dessous la synthèse des dendrimères de L-lysine développée au laboratoire, basée sur la polymérisation des NCA formés *in situ*.

I.3 Synthèse des dendrimères greffés de L-lysine

La méthode de synthèse de dendrimères greffés de L-lysine (DGL) développée au laboratoire[1,2] est une stratégie multi-étapes partant de la N^{ε}-trifluoroacétyl-L-lysine pour conduire à la poly-L-lysine dite de 1ère génération, en passant par la synthèse et la polymérisation du N^{ε}-TFA-L-lysine-*N*-carboxyanhydride. En utilisant, dans cette stratégie, comme macroamorceur de polymérisation la poly-L-lysine synthétisée, nous pouvons obtenir une nouvelle poly-L-lysine de génération supérieure (2e génération), et ainsi de suite pour former les générations suivantes. Dans un premier temps, nous détaillerons la synthèse de la première génération de poly-L-lysine, puis celle des générations supérieures.

I.3.1 Synthèse de la première génération de DGL

Nous allons tout d'abord présenter d'une manière globale les différentes étapes de la synthèse de la première génération de DGL.

I.3.1.1 Les étapes de synthèse de la 1ère génération de DGL

Le schéma ci-dessous présente les 4 étapes constituant la synthèse de la 1ère génération de poly-L-lysine.

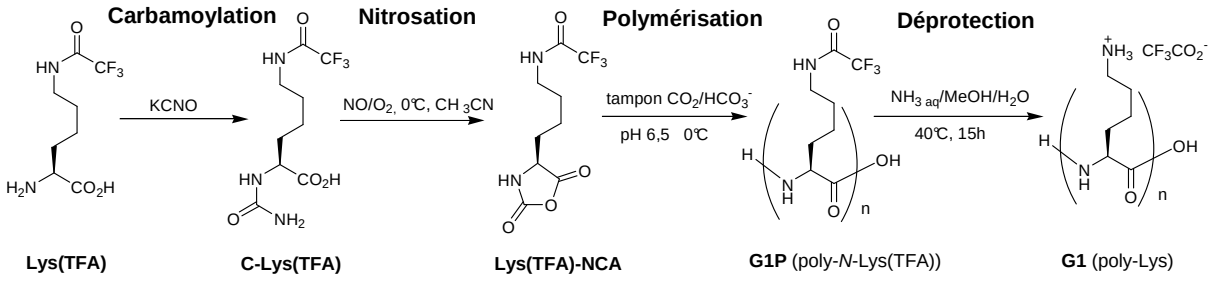


Schéma 20 : Les 4 étapes de la synthèse de la première génération de DGL

- La carbamoylation

Pour commencer, la N^{ε}-TFA-L-lysine est transformée en N^{ε}-TFA-N^{α} carbamoyl-L-lysine, noté **C-Lys(TFA)**, sous l'action du cyanate de potassium dans les conditions décrites par Taillades *et al.*[43].

- La nitrosation

Ensuite, C-Lys(TFA) est mise en réaction avec un mélange gazeux de monoxyde d'azote et d'oxygène selon le processus décrit par Collet *et al.*[7,44] pour conduire à la formation du N^{ε}-TFA-L-lysine-NCA, noté **Lys(TFA)-NCA**.

- La polymérisation

Au brut réactionnel, est rajoutée une solution de $NaHCO_3$ 0,2 M refroidie à 0°C et le milieu réactionnel est maintenu à cette température sous dégagement de CO_2. Le pH est maintenu à 6,5 grâce au tampon CO_2/HCO_3^-. La poly-N^{ε}-TFA-L-lysine (**G1P**) précipite au bout d'un certain temps et est isolée par centrifugation.

- La déprotection

Enfin, le précipité de poly-N^{ε}-TFA-L-lysine est mis en suspension dans une solution ammoniacale en milieu MeOH/H_2O (4/1) à 40°C pendant une nuit.

Ce traitement permet la déprotection des fonctions amines des chaînes latérales et conduit à la formation de poly-L-lysine. La déprotection de ces fonctions entraîne la solubilisation totale de la poly-L-lysine dans l'eau. Ce composé linéaire constituant la première génération, noté **G1**, est obtenu avec un rendement global de 50-60% à partir de **C-Lys(TFA)**, sous forme de sel de trifluoroacétate. En effet, l'analyse élémentaire ainsi que la RMN ^{19}F de **G1** indiquent la présence d'un contre-ion trifluoroacétate au sein de ce DGL. Le calcul du rapport massique C/N, à partir de l'analyse élémentaire, a permis de remonter à la proportion d'un ion trifluoroacétate en moyenne par unité lysine, tandis que le dosage par RMN ^{19}F donne une valeur 0,8 trifluoroacétate par unité lysine.

De nombreuses méthodes ont été utilisées pour caractériser les oligomères **G1P** et **G1**. L'analyse de ces composés par chromatographie d'exclusion stérique (CES) montre une distribution unimodale des masses moléculaires.

Le spectre de masse de **G1P** obtenu par MALDI-TOF montre une distribution périodique de pics, ayant une période de 224 Da qui correspond au motif **Lys(TFA)**. Cette distribution représente des molécules ayant des degrés de polymérisation en nombre (DPn) allant de 5 à 15 avec une intensité maximum autour de 6. Le même profil est observé sur le spectre de masse de **G1**, avec une période de 128 Da (motif **Lys**) et un maximum d'intensité à DPn = 7.

Outre les oligomères linéaires attendus, des produits secondaires ont été détectés à l'état de traces : le dérivé N-carbamoylé sur le N-terminal du peptide (résultant probablement de la réaction entre l'oligopeptide et des traces de cyanates dans le milieu réactionnel), et le dérivé amide sur le côté C-terminal (probablement dû à l'ouverture du NCA soit par un amide α-aminé, soit par l'ammoniaque).

La distribution des masses moléculaires de **G1** a aussi été analysée par électrophorèse capillaire (EC) en présence d'un électrolyte contenant du dextrane permettant ainsi d'avoir une bonne résolution. La comparaison avec les échantillons commerciaux d'oligomères linéaires de L-lysine (Lys_2 à Lys_5) confirme que **G1** est essentiellement composé d'oligomères linéaires comportant de 3 à 20 unités Lys. La bonne résolution de l'électrophérogramme permet de calculer les degrés de polymérisation moyens $\overline{DP_n}$ = 8 et $\overline{DP_w}$ =9,6 (respectivement en nombre et en poids) à partir de l'intensité des pics ainsi que l'indice de polydispersité I = $\overline{DP_w} / \overline{DP_n}$ = 1,2. L'analyse par RMN ^{1}H confirme quant à elle l'indice de polydispersité et suggère un $\overline{DP_n}$ égal à 9 unités Lys.

En comparant, les résultats des différentes analyses entre eux, on note que la spectrométrie de masse MALDI-TOF a tendance à sous-estimer le $\overline{DP_n}$ (les oligomères de faible masse désorbent sans doute plus facilement que les autres) tandis que la RMN ^{1}H et l'électrophorèse capillaire indiquent des $\overline{DP_n}$ similaires qui reflètent certainement mieux la réalité.

Avant de présenter la synthèse des générations suivantes de DGL, nous allons nous arrêter sur une étape-clé du processus de synthèse : l'étape de nitrosation (Schéma 20). En effet, cette étape est importante car elle permet la formation du NCA qui est utilisé directement, sans purification, dans la polymérisation pour conduire au DGL.

I.3.1.2 Synthèse du NCA

La réaction de nitrosation se déroule en milieu hétérogène entre le C-Lys(TFA), insoluble dans l'acétonitrile, et le mélange gazeux NO/O_2 pour conduire au Lys(TFA)-NCA, soluble dans le solvant de réaction (Schéma 21).

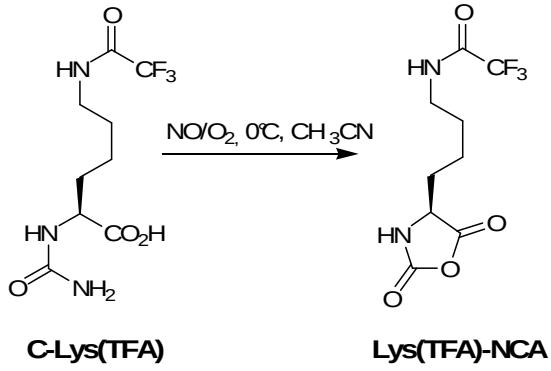


Schéma 21 : Synthèse du Lys(TFA)-NCA par nitrosation

Au sein de ce mélange gazeux, il se forme des oxydes d'azote qui génèrent le cation nitrosyle NO^+ reconnu comme étant l'entité réactive.

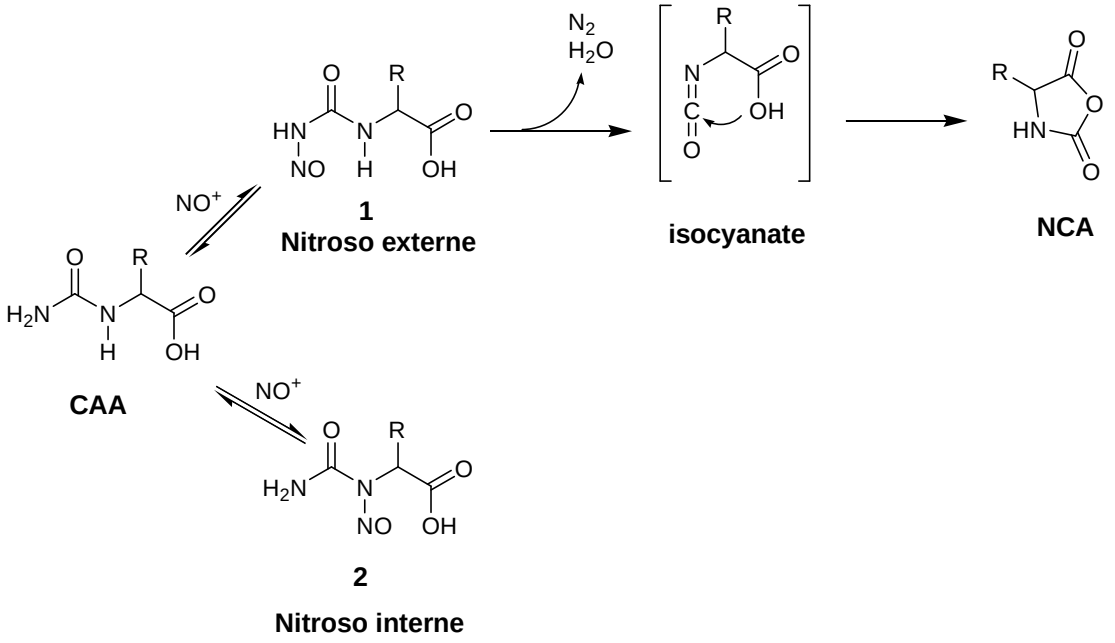


Schéma 22 : Mécanisme supposé de nitrosation des NCA

L'acide aminé carbamoylé CAA subit une nitrosation réversible qui conduit à la formation d'une nitrosourée interne ou externe. Seule la nitrosourée externe, après le départ de N_2 et d'eau, permet d'accéder au NCA en passant par un intermédiaire isocyanate[22] (Schéma 22).
Dans le mélange gazeux NO/O_2, on retrouve un mélange complexe de NO, O_2, NO_2, N_2O_3 et N_2O_4 qui interviennent dans les équations (1), (2) et (3) présentées ci-dessous.

$NO + ½\ O_2 \leftrightarrows NO_2$ **(1)**

$NO + NO_2 \leftrightarrows N_2O_3$ **(2)**

$2\ NO_2 \leftrightarrows N_2O_4$ **(3)**

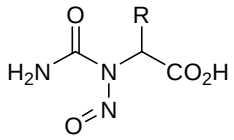
La nitrosation du CAA, insoluble dans le milieu réactionnel, se fait dans un premier temps par l'intermédiaire des espèces N_2O_3 et N_2O_4 à l'interface solide/gaz, selon les équations (4) et (5). Ces réactions génèrent de l'acide nitreux et de l'acide nitrique. L'acidification du milieu réactionnel entraîne l'apparition d'une nouvelle espèce nitrosante très réactive $H_2NO_2^+$ (éq. 6), provenant de la protonation de l'acide nitreux[45].

CAA + $N_2O_3 \rightarrow$ **1** + $H^+ + NO_2^-$ **(4)**

CAA + $N_2O_4 \rightarrow$ **1** + $H^+ + NO_3^-$ **(5)**

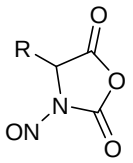
CAA + $H_2NO_2^+ \rightarrow$ **1** + H_3O^+ **(6)**

Selon des études menées au sein de notre laboratoire sur la réaction de nitrosation des acides aminés *N*-carbamoylés, le NCA serait accompagné en fin de réaction du CAA de départ, de quantités variables d'acides inorganiques[45], HNO_2 et HNO_3, d'acide aminé libre provenant de l'hydrolyse du NCA formé, ainsi que des dérivés *N*-nitroso **2** et **3** (identifiés par RMN et spectroscopie UV) respectivement de l'acide aminé *N*-carbamoylé et du NCA[46] (Figure 6).



2

N-nitroso CAA



3

N-nitroso NCA

Figure 6 : Produits secondaires identifiés lors de la synthèse du NCA

L'acide nitreux est un composé relativement volatile donc il peut être éliminé facilement lors de l'évaporation à sec finale. Lagrille *et al.*[46] ont réussi à quantifier le taux d'ions nitrates générés lors de la nitrosation du C-Lys(TFA) dans le toluène par électrophorèse capillaire. Ce taux s'élève à 5% massique pour un rendement de 85-90% en NCA. En réalisant une micro-extraction suivie d'une recristallisation en fin de synthèse, ils obtiennent pour la même réaction un pourcentage massique d'ions nitrates inférieur à 0,7% et les dérivés *N*-nitroso **2** et **3** ne sont plus détectables par RMN. Bien évidemment, cette purification entraîne une chute du rendement en NCA à 70-75%.

En plus de la réaction des espèces nitrosantes sur le CAA conduisant à la formation du NCA, qui est la réaction principale, il existe un certain nombre de réactions secondaires compétitives pouvant avoir lieu au sein du milieu réactionnel. En effet, parmi celles-ci, nous retrouvons le *N*-nitroso CAA **2** généré par l'attaque de NO^+ sur le CAA qui peut se décomposer en acide isocyanique et en un composé instable **4** (Schéma 23).

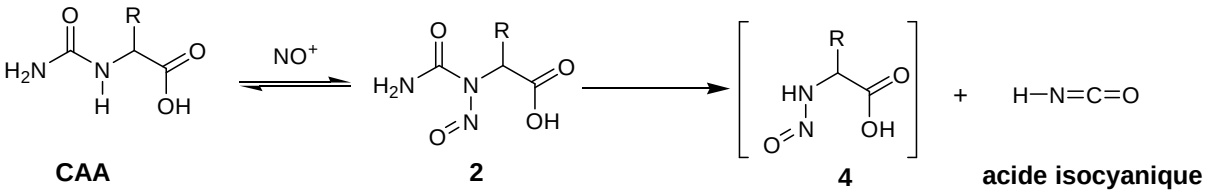


Schéma 23 : Décomposition du *N*-nitroso CAA

Ce composé, en présence d'acide, se décompose à son tour en libérant de l'azote et de l'eau pour conduire à un carbocation. Celui-ci conduit à l'hydroxy-analogue de l'acide aminé, par réaction avec l'eau, ainsi qu'à un composé insaturé (Schéma 24).

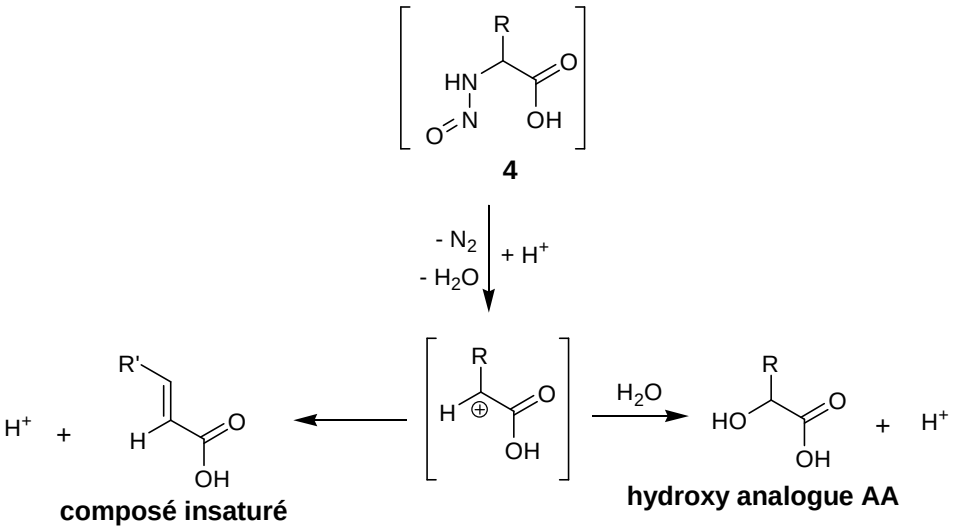


Schéma 24 : Décomposition de **4**

L'acide isocyanique, quant à lui, est hydrolysé très rapidement en milieu acide[47] pour conduire à du dioxyde de carbone et des ions ammoniums (éq. 7).

$$HN=C=O + H_3O^+ \rightarrow NH_4^+ + CO_2 \qquad \textbf{(7)}$$

D'un autre côté, la réaction de nitrosation conduisant à la formation du NCA produit de l'eau (Schéma 22) qui peut hydrolyser le NCA formé en acide aminé (Schéma 25).

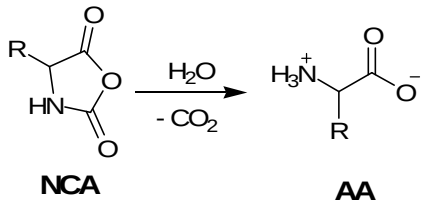


Schéma 25 : Hydrolyse du NCA en acide aminé

Par ailleurs, en plus de la réaction de nitrosation, le CAA de départ peut se cycliser en milieu acide pour conduire à une hydantoïne, comme indiqué dans le schéma ci-dessous.

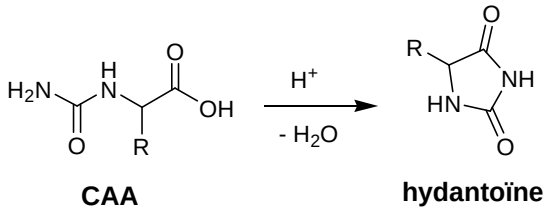


Schéma 26 : Cyclisation en milieu acide du CAA en hydantoïne

Ainsi, nous voyons que la synthèse du NCA par nitrosation ne conduit pas à un composé pur mais à plusieurs produits issus de réactions secondaires compétitives. Néanmoins, il faut bien garder à l'esprit que le NCA reste de produit majoritaire et que les produits secondaires ne représentent tout au plus que 10% du produit final.

Le NCA, ainsi synthétisé, est utilisé en l'état pour la polymérisation en milieu aqueux pour conduire au DGL de 1ère génération. Nous avons fait analyser le précipité obtenu en fin de polymérisation et isolé par centrifugation, ainsi que la solution surnageante, afin de déterminer le devenir du NCA et des produits secondaires qui l'accompagnent au sein des oligomères que l'on récupère en fin de polymérisation. Dans un premier temps nous présenterons les résultats des analyses effectuées et dans un second temps, nous essaierons d'expliciter d'un point de vue réactionnel la provenance des produits identifiés.

I.3.1.3 Réactivité du NCA et des produits secondaires

Le précipité obtenu en fin de polymérisation (poly-*N*$^{\varepsilon}$-trifluoroacétyl-L-lysine ou **G1P**) a été analysé par EC/MS (électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse). La technique de spectrométrie de masse utilisée est le MALDI-Tof. Les résultats des analyses du précipité proviennent d'un rapport de stage effectué par Sarah Catherine Jantzi[48] sur le couplage EC/MS, fourni gracieusement par le Pr. Hervé Cottet. La figure 7 ci-après

représente l'électrophérogramme obtenu lors de l'analyse du précipité. Les structures des produits figurants sur cet électrophérogramme ont été établies à partir des masses obtenues par la spectrométrie de masse.

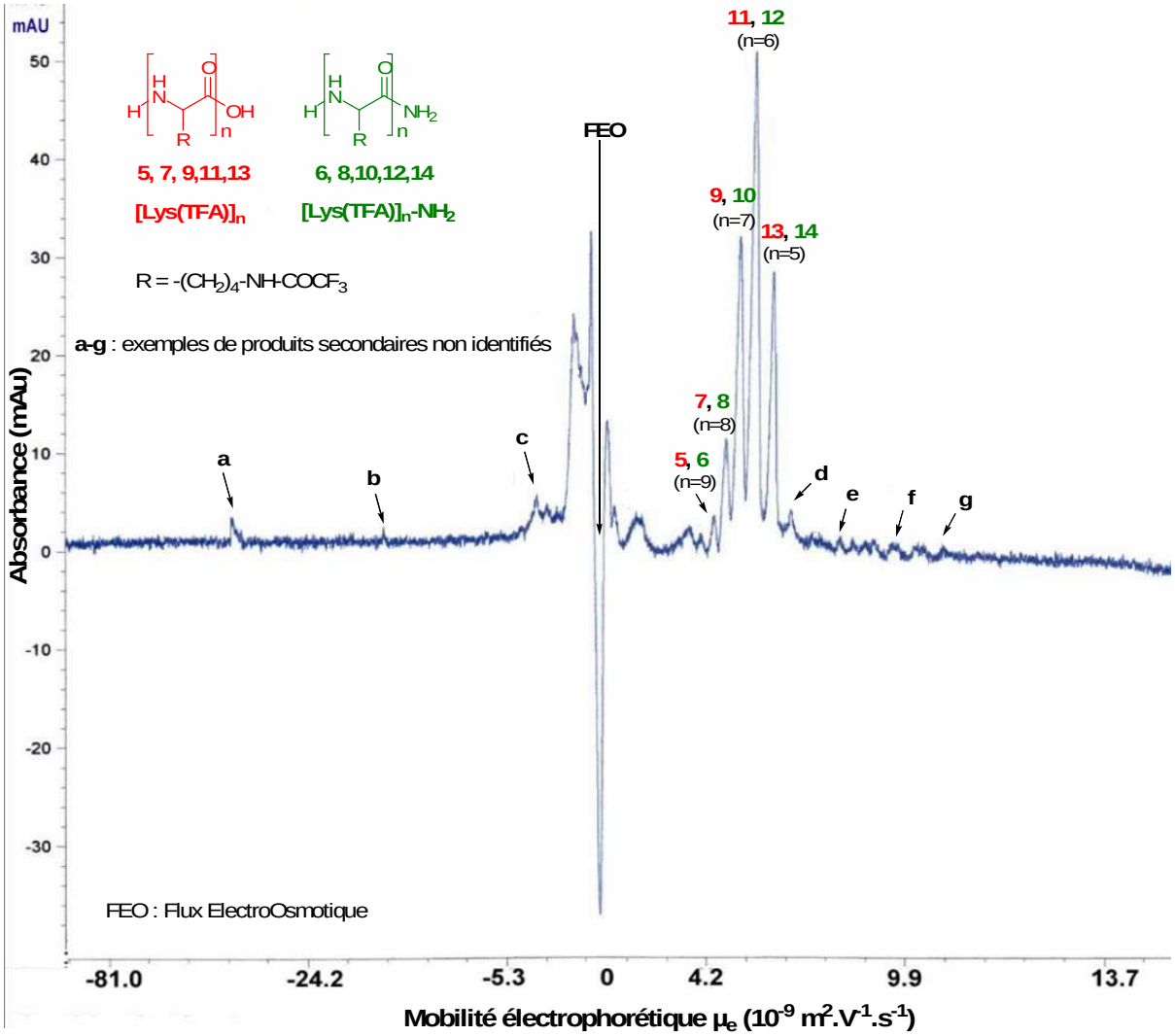


Figure 7 : Electrophérogramme du précipité (oligomères sous forme protégée). Conditions électrophorétiques : capillaire en silice vierge, 50 cm (41,5 cm à la fenêtre de détection) x 50 µm. L'électrolyte est préparé à partir d'une solution MeOH/CH_3CN (87,5: 12,5 ; v/v). Electrolyte : 1 M CH_3CO_2H, 20 mM $CH_3CO_2NH_4$. Concentration de l'échantillon : 5 g/L dans une solution MeOH/CH_3CN (3/1). Tension appliquée : -30 kV. Détection UV à 200 nm.

Sur cet électrophérogramme, l'absorbance est exprimée en fonction la mobilité électrophorétique μ_e des espèces analysées. La mobilité électrophorétique est inversement proportionnelle au temps de migration des espèces dans le capillaire et elle permet de comparer des analyses réalisées dans des conditions différentes. Les espèces anioniques ont une mobilité électrophorétique négative et les espèces cationiques ont une mobilité positive. Les espèces neutres sont aux alentours du flux électroosmotique. Parmi les composés

cationiques, nous avons identifié les oligomères de lysine attendus, en rouge, c'est-à-dire des oligomères de lysine avec une extrémité amine et une extrémité acide. La longueur de ces oligomères varie entre 5 et 9 résidus lysine avec un maximum à 6. Il s'agit là du produit majoritaire de la synthèse. Cependant, dans cette distribution, nous avons pu identifier aussi une autre famille de polylysine, en vert, ayant une extrémité amine et une extrémité amide. La différence de masse entre ces deux familles n'est que d'une unité par conséquent, il est très difficile de les séparer dans les conditions électrophorétiques utilisées et donc d'estimer la proportion de l'une par rapport l'autre. En plus de ces deux familles, nous voyons sur l'électrophérogramme un certain nombre de produits secondaires à l'état de traces que nous n'avons pas pu identifier. Afin d'en apprendre plus sur les produits secondaires, le surnageant a été analysé.

L'analyse a été réalisée par LC/MS par le service central d'analyse du CNRS. La figure 8 ci-dessous représente le chromatogramme obtenu lors de l'analyse du surnageant. La structure des produits identifiés a été établie en fonction des masses fournies par la spectrométrie de masse.

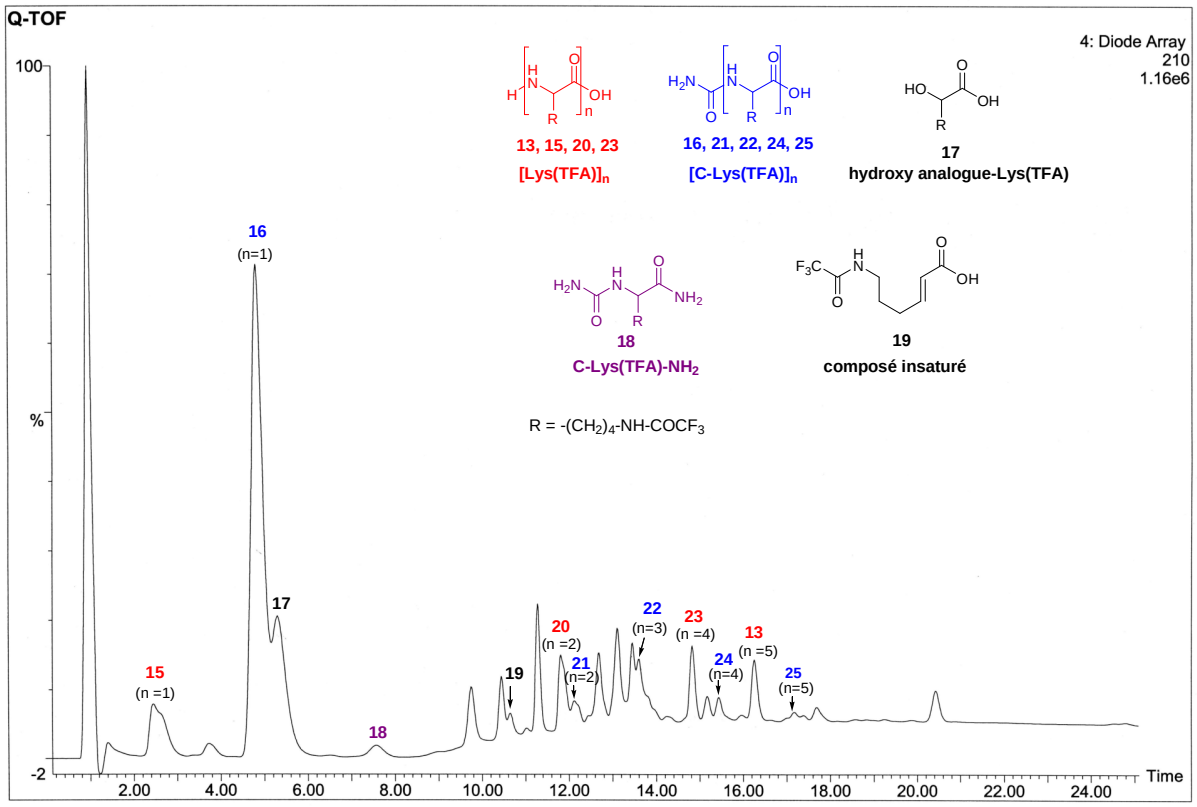


Figure 8 : Chromatogramme du surnageant. Conditions : colonne silice greffée C_{18} ; éluant H_2O/CH_3CN (0,05% TFA dans chaque solvant) ; gradient 80/20 – 50/50 en 35 min. Détection UV à 210 nm.

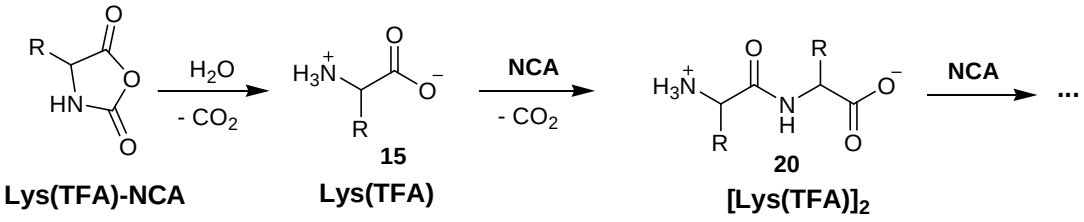
Nous avons pu identifier dans le surnageant la présence de peptides de petites tailles (1 à 5 résidus lysine), en rouge, appartenant à la famille principale de lysine (famille acide aminé). Nous remarquons que le composé **13** est présent aussi bien dans le précipité que dans le surnageant. En dehors de cette famille, nous avons identifié la famille de lysine carbamoylée, en bleu, avec des composés ayant de 1 à 5 résidus lysine. Nous avons aussi mis en évidence la présence de composés isolés comme l'hydroxy-analogue de Lys(TFA) **17**, l'amide aminé carbamoylé **18** et un composé insaturé **19**. Nous nous attendions à retrouver des produits appartenant à la famille des amides aminés de lysine dans le surnageant, famille présente dans le précipité, étant donné que la famille des acides aminés de lysine, elle, est présente dans les deux phases. Toutefois, si l'on considère que l'amide aminé de lysine est plus réactif que l'acide aminé correspondant dans le milieu de polymérisation (pH 6,5), il n'apparaît pas aberrant qu'il soit absent du surnageant.

A la suite des résultats présentés ci-dessus, nous allons, dans le paragraphe suivant, aborder les mécanismes de formation des produits secondaires identifiés.

a. Formation des produits identifiés

Nous avons vu précédemment (§ I.3.1.2) qu'il existe un certain nombre de produits secondaires suite à la réaction de nitrosation conduisant à la formation du NCA. Parmi eux se trouvent des composés que l'on a identifiés dans le surnageant : l'hydroxy-analogue de Lys(TFA) **17** et le composé insaturé **19** qui proviennent tous deux de la décomposition du *N*-nitroso C-Lys(TFA) (cf. Schéma 24).

Maintenant, voyons ce qui se passe au niveau de la polymérisation. Avant tout, n'oublions pas qu'à la fin de la synthèse du NCA, nous sommes en milieu acide et que la polymérisation se fait dans un milieu tamponné à un pH de 6,5. La réaction principale qui a lieu dans ce milieu est l'hydrolyse du Lys(TFA)-NCA précédemment formé conduisant à l'acide aminé libre **15**. Cet acide aminé par l'intermédiaire de sa fonction amine, dont un pourcentage non négligeable se trouve sous forme basique, attaque une nouvelle molécule de NCA afin de former le dipeptide $[Lys(TFA)]_2$ **20** (Schéma 27) et ainsi de suite pour le tripeptide, tétrapeptide, etc…



R = $(CH_2)_4$-NH-$COCF_3$

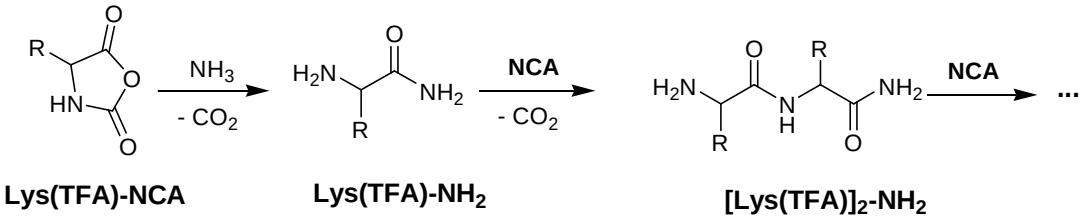
Schéma 27 : Formation du dipeptide de Lys(TFA)

Ainsi se forment les composés de la famille principale acide aminés. Maintenant, intéressons-nous à la formation des composés de la famille amide aminés.

L'acide isocyanique provenant de la décomposition du *N*-nitroso C-Lys(TFA), lui-même généré lors de la synthèse du NCA (Schéma 23), s'hydrolyse pour donner de l'ammoniac et du dioxyde de carbone (éq. 8).

$$HNCO + H_2O \rightarrow NH_3 + CO_2 \qquad \textbf{(8)}$$

L'ammoniac ainsi formé est à même de réagir avec une molécule de NCA pour conduire à un amide aminé, qui peut à son tour réagir avec une autre molécule de NCA par l'intermédiaire de sa fonction amine pour conduire au dipeptide amide et ainsi de suite comme pour un acide aminé classique (Schéma 28).



R = $(CH_2)_4$-NH-$COCF_3$

Schéma 28 : Formation d'un dipeptide amide

Par ailleurs, l'acide isocyanique peut s'additionner sur les amines des acides aminés ou peptides pour les transformer en dérivés carbamoylés[43]. Toutefois, étant donné la propension de l'acide isocyanique à s'hydrolyser rapidement (éq. 8) en milieu aqueux neutre, nous pensons qu'il s'agit plutôt du *N*-nitroso C-Lys(TFA) stable dans le milieu de polymérisation qui serait à l'origine de la cyanatation des acides aminés et peptides. En effet, comme le montre le schéma 29, l'amine d'un acide aminé ou peptide de lysine attaque le *N*-nitroso C-

Lys(TFA) sur le carbonyle en β de la fonction nitroso pour conduire au dérivé *N*-carbamoylé correspondant accompagné de la molécule intermédiaire **4**. Cette molécule se décompose ensuite selon le mécanisme présenté dans le schéma 24.

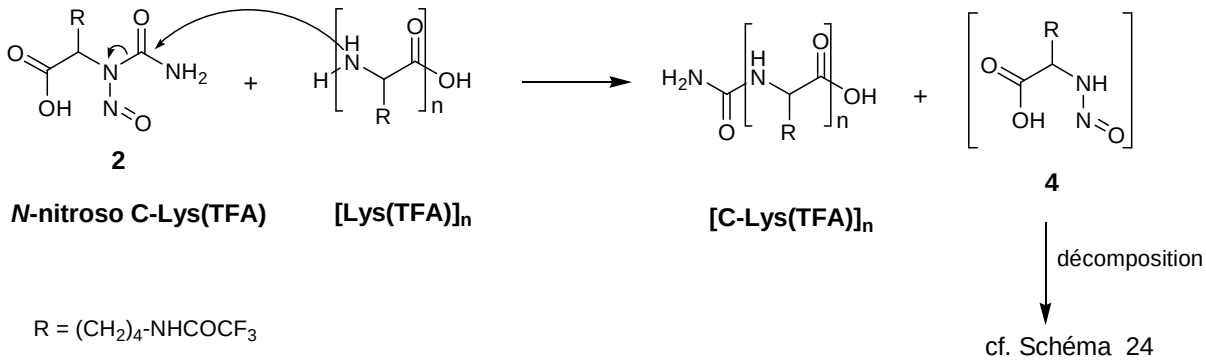


Schéma 29 : Formation des dérivés *N*-carbamoylés

En plus des familles de polylysine identifiées, nous suspectons la présence d'autres familles de polylysine comme les peptides cycliques et les oligomères ayant une urée interne. La famille des oligomères cycliques se forme certainement au cours de la polymérisation. A partir du moment où l'on a au minimum un dipeptide, la fonction carboxylate de cette entité peut attaquer une molécule de NCA (anhydride cyclique) pour conduire à un anhydride linéaire : il s'établit alors un équilibre entre les deux types d'anhydrides (Schéma 30). Une des fonctions amine terminale, celle du côté le plus long, peut attaquer le carbonyle de l'anhydride linéaire et conduire à une cyclisation intramoléculaire. Lorsque la réaction se produit avec un dipeptide, on obtient la dicétopipérazine correspondante.

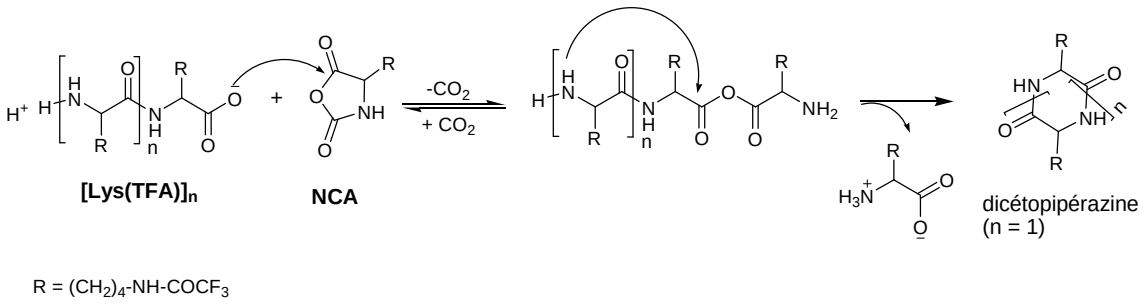


Schéma 30 : Formation d'oligomères cycliques

Les oligomères appartenant à la famille des urées internes apparaîtraient eux aussi au moment de la polymérisation car le mécanisme de formation fait intervenir la réaction d'une amine sur

un carbonyle (Schéma 31), or la réaction de nitrosation se passe en milieu acide. Par conséquent, les amines sont sous forme protonées donc non nucléophiles.

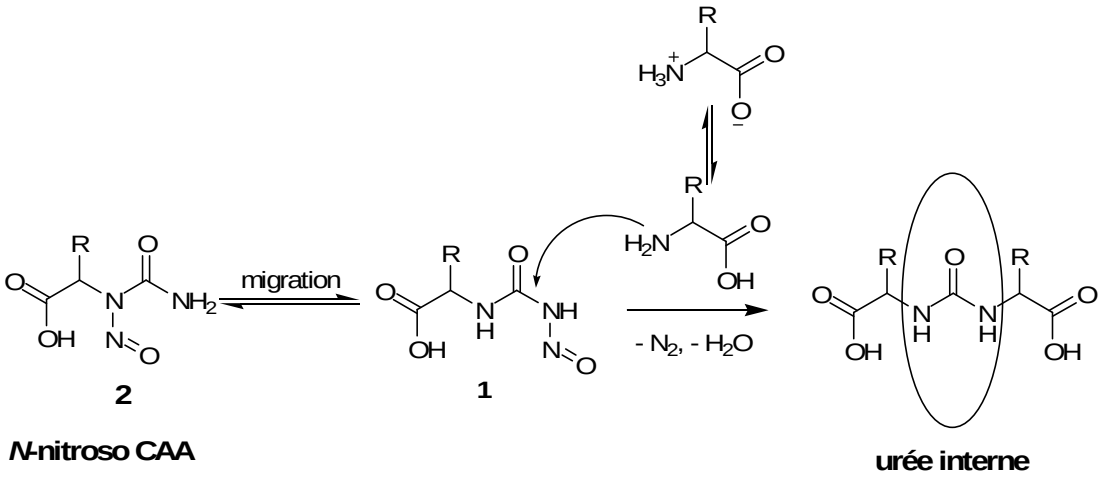


Schéma 31 : Formation d'une urée interne

Le *N*-nitroso CAA **2** formé lors de la nitrosation, étant stable sous sa forme « nitroso interne », peut se retrouver dans le milieu de polymérisation. La fonction nitroso à la possibilité de migrer de l'amide primaire à l'amide secondaire du *N*-nitroso CAA. Celui-ci sous sa forme « nitroso externe » peut subir l'attaque nucléophile de l'amine d'un acide aminé ou d'un peptide pour conduire à un peptide ayant une urée interne et deux fonctions acide carboxyliques terminales.

Dans le but d'avoir une meilleure compréhension des phénomènes qui interviennent lors du processus de synthèse de **G1P**, l'effet de la durée de la nitrosation du C-Lys(TFA) sur la polymérisation a été observé. Pour cela, trois synthèses de **G1P** ont été effectuées au laboratoire en variant la durée de la nitrosation du C-Lys(TFA). Pour la première synthèse, la polymérisation a été réalisée directement après la nitrosation, c'est-à-dire en évaporant le milieu nitrosant tout de suite après le dernier ajout d'O_2 et en ajoutant la solution tampon pour démarrer la polymérisation. Les deux autres synthèses ont été réalisées en attendant respectivement 1h30 et 3h avant l'évaporation du milieu nitrosant. Les surnageants des trois synthèses ont été analysés par LC/MS par le service central d'analyse du CNRS. La figure ci-après présente les trois chromatogrammes obtenus lors de l'analyse des surnageants.

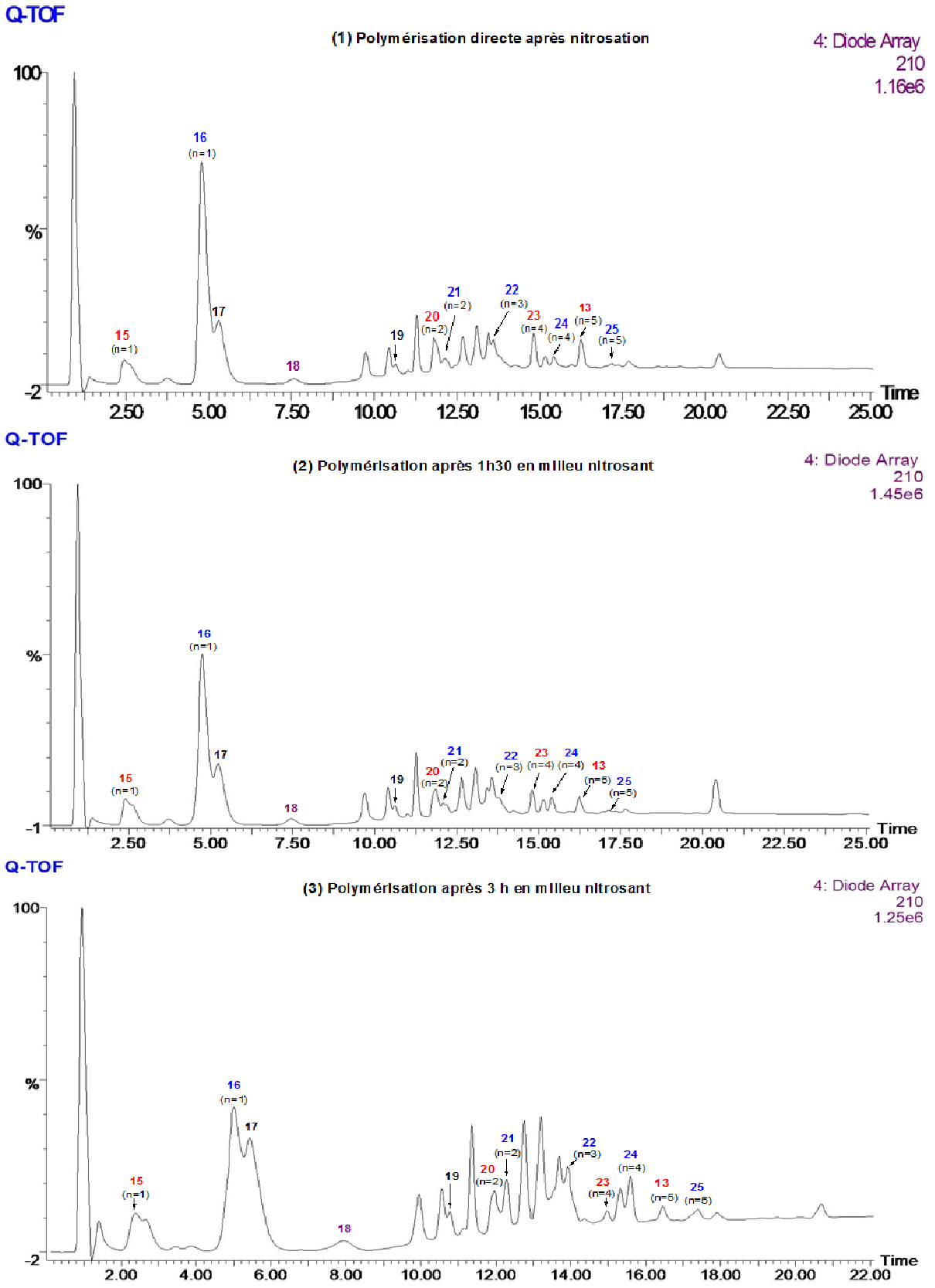


Figure 9 : Chromatogrammes des surnageants. Conditions : colonne silice greffée C_{18} ; éluant H_2O/CH_3CN (0,05% TFA dans chaque solvant) ; gradient 80/20 – 50/50 en 35 min. Détection UV à 210 nm

En comparant ces trois chromatogrammes, nous voyons que les deux premiers sont assez similaires tandis que le dernier présente des différences évidentes avec les précédents. D'un côté, nous observons une diminution de la quantité de C-Lys(TFA) **16**, produit de départ, par rapport aux autres composés lorsque l'on passe du chromatogramme 1 au 3. Et d'un autre côté, si l'on observe attentivement ces chromatogrammes, nous remarquons qu'entre les chromatogrammes 1 et 3, il y a une inversion au niveau de la proportion entre les acides aminés libres en rouge et les acides aminés carbamoylés en bleu, notamment pour les molécules **20** et **21**, et **23** et **24**. Dans le cas de **13** et **25**, même s'il n'y pas inversion, nous voyons que la proportion de **13** par rapport à **25** diminue entre les deux chromatogrammes.
La diminution observée de la quantité de C-Lys(TFA) **16** indique que ce dernier est davantage consommé lorsqu'il reste suffisamment longtemps dans le milieu de nitrosation. Il peut être transformé soit en NCA, soit en *N*-nitroso C-Lys(TFA) (cf. Schéma 22). L'inversion au niveau de la proportion entre les acides aminés libres et les acides aminés carbamoylés indique quant à elle que plus la nitrosation dure longtemps, plus les acides aminés sont carbamoylés. Et nous avons vu que les acides aminés carbamoylés sont formés par réaction des acides aminés sur le *N*-nitroso C-Lys(TFA) lors de la polymérisation (cf. Schéma 29). Par conséquent, nous pouvons penser qu'en intensifiant les conditions de nitrosation, il se forme plus de *N*-nitroso C-Lys(TFA) conduisant ainsi à une plus grande proportion d'acide aminés *N*-carbamoylés en fin de polymérisation.

En conclusion, après avoir détaillé les réactions qui se produisent lors des étapes de nitrosation et de polymérisation au cours du processus de synthèse des DGL de 1ère génération, nous voyons qu'il s'agit là d'un système assez complexe faisant intervenir plusieurs entités réactives, le plus souvent en milieu hétérogène (solide/gaz, solide/liquide), et conduisant à un certain nombre de produits secondaires. Cependant, l'un des principaux avantages de cette synthèse, moyennant un rendement global de 60%, est qu'elle parfaitement reproductible (caractéristiques des oligomères identiques d'une synthèse à l'autre) ce qui permet de s'affranchir d'une purification des NCA ou des oligomères qui pourrait s'avérer longue et fastidieuse. A partir de ces oligomères, nous synthétisons les DGL de générations supérieures.

I.3.2 Synthèse des générations supérieures

Les générations suivantes sont synthétisées selon le même processus que précédemment. La seule différence est que l'amorceur de la polymérisation est introduit avec la solution de $NaHCO_3$ dans un rapport M/A défini (Schéma 32). M désigne le monomère qui est ici le Lys(TFA)-NCA et A l'amorceur qui est le produit de la génération précédente. Ce rapport a été optimisé à 2,8 (mol/mol de monomère) de façon à avoir un matériau avec la plus grande masse moléculaire possible, un bon rendement, une polydispersité la plus faible possible et sans traces de **Gn-1** (amorceur) libre.

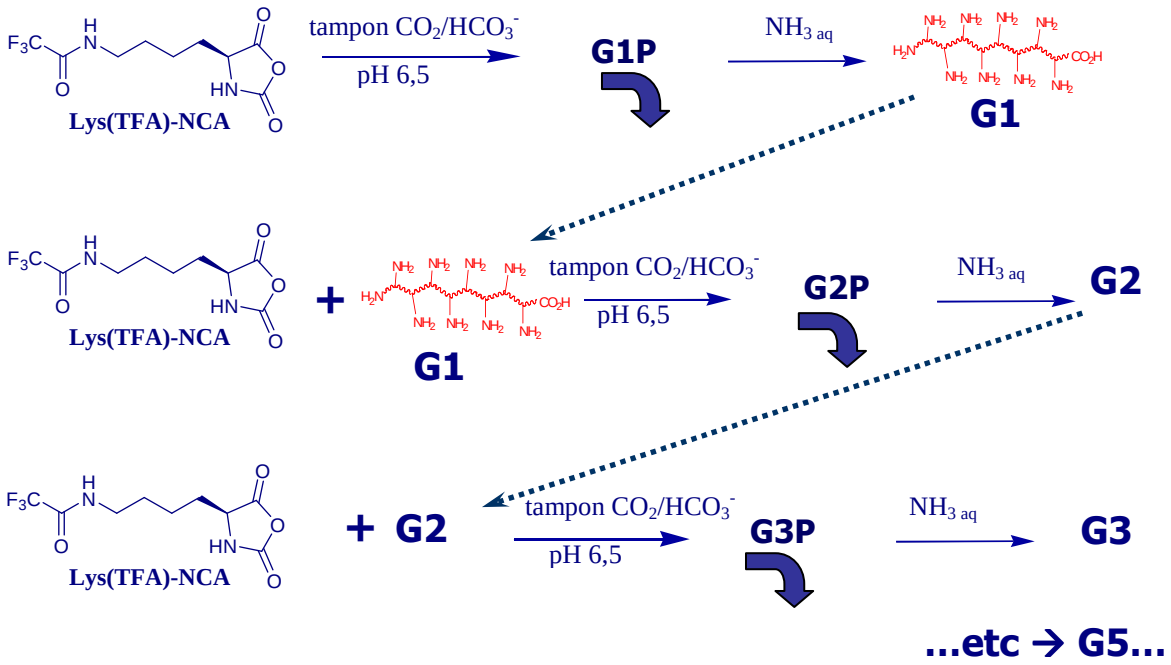


Schéma 32 : Schéma de principe de synthèse des DGL

La structure des 3 premières générations est schématisée dans la figure 10 ci-dessous.

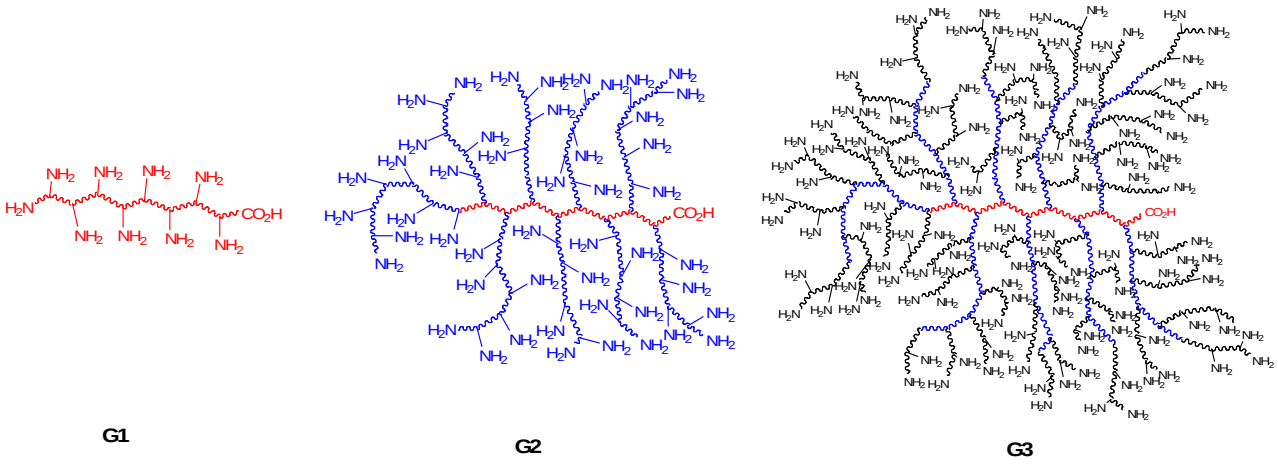


Figure 10 : Représentation de trois générations de DGL

Ces dendrimères greffés ont été caractérisés par RMN ^{1}H, MALDI-TOF, chromatographie d'exclusion stérique (CES) et électrophorèse capillaire (EC)[49].

DGL	G1	G2	G3	G4	G5
$\mathbf{M_w}$ (g/mol)[b]	1 667[a]	11 800	32 100	88 800	249 800
$\mathbf{M_n}$ (g/mol) [b]	1 450[a]	8 600	22 000	65 300	172 300
I[b]	1,2[a]	1,38	1,46	1,36	1,46
$\overline{DP_n}$ [b,c]	8[a]	48	123	365	963
Rendement % (**basé sur A**) [d]	-	23	91	88	101[g]
Rendement % (**basé sur M**)[e]	61	41	50	61	59
Rendement global %[f]	61	37	61	68	70

Tableau 1 : Caractéristiques des 5 premières générations de DGL[2]. **[a]** déterminé par EC. **[b]** déterminé par CES couplée à la détection par diffusion de la lumière statique (LS) et indice de réfraction (RI). Elution avec NaH_2PO_4 50 g/L. **[c]** évalué à partir de M_n en supposant que 51% des résidus Lys sont condensés avec des contre-ions phosphates (éluant de CES) en accord avec la théorie de condensation de Manning[50]. Donc, on compte une masse molaire moyenne de 179 g/mol pour un résidu Lys au lieu de 128. **[d]** rendement basé sur les unités monomères provenant de l'amorceur Gn-1 seulement. **[e]** rendement basé uniquement sur les unités monomères provenant du monomère NCA. **[f]** rendement global basé sur la quantité de monomère totale (amorceur **Gn-1** et monomère NCA). **[g]** dans la marge d'erreur expérimentale acceptable du DP mesuré par CES.

Le tableau ci-dessus regroupe les caractéristiques des dendrimères greffés de L-lysine de la première à la cinquième génération[2]. Nous remarquons que la masse moléculaire moyenne des DGL, tout comme le degré de polymérisation, augmente de façon exponentielle en fonction de la génération, ce qui est une des caractéristiques des dendrimères greffés. L'indice de polydispersité I, quant à lui, est relativement faible et varie assez peu d'une génération à l'autre. Le rendement global pour chaque génération oscille entre 60 et 70%, sauf dans le cas de **G2** où ce rendement chute à 37%. A ce jour, aucune hypothèse satisfaisante n'a pu être avancée pour expliquer cette différence. Les résultats obtenus avec ces composés sont parfaitement reproductibles et les conditions opératoires permettent, en laboratoire, de synthétiser jusqu'à 60g de **G1** en une fois.

Les DGL présentent à leur surface des fonctions amines primaires ($-NH_2$), qui à pH physiologique sont protonées ($-NH_3^+$). A l'état natif, les DGL sont donc des poly-cations. Ils se sont révélés être, au travers de tests biologiques, des agents relativement actifs. L'activité des DGL a été testée sur différents agents pathogènes (bactéries $Gram^+$ et $Gram^-$, champignons). Ces dendrimères greffés présentent donc une activité antibactérienne (en phase homogène ou sur support) et antifongique, les générations 2 et 3 étant les plus actives. Ils sont aussi biocompatibles, car ils ne sont constitués que de lysine, non immunogènes[51,52] et non toxiques[1].

I.4 Conclusion

Le procédé de préparation des DGL développé au sein du laboratoire a fait ses preuves pour la synthèse de DGL natifs de différentes génération tant au niveau de la reproductibilité quantitative que qualitative. Les dendrimères greffés obtenus selon cette méthode sont tous clairement caractérisés et présentent aussi des propriétés biologiques intéressantes (antibactériennes, antifongiques,…). De ce fait, c'est un procédé compétitif par rapport aux méthodes de synthèse de polylysines arborescentes existantes (Denkewalter et Klok), mais surtout par rapport aux méthodes de synthèse de NCA couramment employées (méthode de Fuchs-Farthing). En effet, notre mode de préparation des NCA est une alternative à l'utilisation du phosgène et présente l'avantage de ne pas nécessiter une purification toujours difficile, et synonyme de chute de rendement, de ces composés très réactifs.

Dans le chapitre qui suit, nous allons exposer les enjeux qui concernent l'ajout d'un amorceur de polymérisation lors de la synthèse de la première génération de DGL.

Références bibliographiques

1. Commeyras, A.; Collet, H.; Souaid, E.; Cottet, H.; Romestand, B.; Trambouze, O. In *PCT/FR2006/000952 (extension du brevet FR n° 05/04309)*, **2006**.
2. Collet, H.; Souaid, E.; Cottet, H.; Deratani, A.; Boiteau, L.; Dessalces, G.; Rossi, J.-C.; Commeyras, A.; Pascal, R. *Chemistry - A European Journal* **2010,** *16*, 2309-2316.
3. Fuchs, F. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1922,** *55*, 2943-2943.
4. Brown, C. J.; Coleman, D.; Farthing, A. C. *Nature* **1949,** *163*, 834-835.
5. Farthing, A. C.; Reynolds, R. J. W. *Nature* **1950,** *165*, 647-647.
6. Farthing, A. C. *Journal of the Chemical Society* **1950**, 3213-3217.
7. Collet, H.; Bied, C.; Mion, L.; Taillades, J.; Commeyras, A. *Tetrahedron Letters* **1996,** *37*, 9043-9046.
8. Leuchs, H. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1906,** *39*, 857-861.
9. Kricheldorf, H. R. *Angewandte Chemie International Edition* **2006,** *45*, 5752-5784.
10. Hadjichristidis, N.; Iatrou, H.; Pitsikalis, M.; Sakellariou, G. *Chemical Reviews* **2009,** *109*, 5528-5578.
11. Dvorak, M.; Rypacek, F. *Chemicke Listy* **1995,** *89*, 423-436.
12. Idelson, M.; Blout, E. R. *Journal of the American Chemical Society* **1957,** *79*, 3948-3955.
13. Bamford, C. H.; Block, H.; Imanishi, Y. *Biopolymers* **1966,** *4*, 1067-1072.
14. Peggion, E.; Terbojevich, M.; Cosani, A.; Colombini, C. *Journal of the American Chemical Society* **1966,** *88*, 3630-3632.
15. Goodman, M.; Hutchison, J. *Journal of the American Chemical Society* **1966,** *88*, 3627-3630.
16. Idelson, M.; Blout, E. R. *Journal of the American Chemical Society* **1958,** *80*, 2387-2393.
17. Seeney, C. E.; Harwood, H. J. *Journal of Macromolecular Science-Chemistry* **1975,** *A 9*, 779-795.
18. Ballard, D. G. H.; Bamford, C. H. *Journal of the Chemical Society* **1956**, 381-387.
19. Bamford, C. H.; Block, H. *Journal of the Chemical Society* **1961**, 4989 - 4991.

20. Szwarc, M. In *Fortschritte der Hochpolymeren-Forschung (The kinetics and mechanism of N-carboxy-α-amino-acid anhydride (NCA) polymerisation to poly-amino acids),* **1965**; pp. 1-65.
21. Szwarc, M. *I. Publishers, Editor : New-York.* **1968**.
22. Kricheldorf, H. R. *Springer-Velag, Berlin* **1987**.
23. Deming, T. J. *Nature* **1997,** *390*, 386-389.
24. Deming, T. J. *Journal of the American Chemical Society* **1998,** *120*, 4240-4241.
25. Deming, T. J. *Macromolecules* **1999,** *32*, 4500-4502.
26. Peng, Y.-L.; Lai, S.-L.; Lin, C.-C. *Macromolecules* **2008,** *41*, 3455-3459.
27. Deming, T. J.; Curtin, S. A. *Journal of the American Chemical Society* **2000,** *122*, 5710-5717.
28. Leuchs, H.; Geiger, W. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1908,** *41*, 1721-1726.
29. Bartlett, P. D.; Dittmer, D. C. *Journal of the American Chemical Society* **1957,** *79*, 2159-2160.
30. Bartlett, P. D.; Jones, R. H. *Journal of the American Chemical Society* **1957,** *79*, 2153-2159.
31. Siegfried, M. *Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* **1905,** *44*, 85-96.
32. Miwa, T. K.; Stahmann, M. A. *Polyamino acids, polypeptides and proteins*, M. A. Stahmann ed.; University of Wisconsin Press: Madison, **1962**.
33. Liu, R.; Orgel, L. E. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **1998,** *28*, 47-60.
34. Hitz, T.; Blocher, M.; Walde, P.; Luisi, P. L. *Macromolecules* **2001,** *34*, 2443-2449.
35. Hitz, T.; Luisi, Pier L. *Helvetica Chimica Acta* **2003,** *86*, 1423-1434.
36. Ehler, K. W.; Orgel, L. E. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **1976,** *434*, 233-243.
37. Plasson, R.; Biron, J. P.; Cottet, H.; Commeyras, A.; Taillades, J. *Journal of Chromatography A* **2002,** *952*, 239-248.
38. Nery, J. G.; Eliash, R.; Bolbach, G.; Weissbuch, I.; Lahav, M. *Chirality* **2007,** *19*, 612-624.
39. Eliash, R.; Nery, Jose G.; Rubinstein, I.; Clodic, G.; Bolbach, G.; Weissbuch, I.; Lahav, M. *Chemistry - A European Journal* **2007,** *13*, 10140-10151.
40. Rubinstein, I.; Eliash, R.; Bolbach, G.; Weissbuch, I.; Lahav, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2007,** *46*, 3710-3713.

41. Rubinstein, I.; Clodic, G.; Bolbach, G.; Weissbuch, I.; Lahav, M. *Chemistry - A European Journal* **2008,** *14*, 10999-11009.
42. Weissbuch, I.; Illos, R. A.; Bolbach, G. r.; Lahav, M. *Accounts of Chemical Research* **2009,** *42*, 1128-1140.
43. Taillades, J.; Boiteau, L.; Beuzelin, I.; Lagrille, O.; Biron, J.-P.; Vayaboury, W.; Vandenabeele-Trambouze, O.; Giani, O.; Commeyras, A. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **2001**, 1247 - 1254.
44. Commeyras, A.; Collet, H.; Mion, L.; Benefice-Malouet, S.; Calas, P.; Choukroun, H.; Taillades, J. In *PCT/FR 95/01380*, 1995.
45. Lagrille, O.; Taillades, J.; Boiteau, L.; Commeyras, A. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2007,** *20*, 271-284.
46. Lagrille, O.; Danger, G.; Boiteau, L.; Rossi, J.-C.; Taillades, J. *Amino Acids* **2009,** *36*, 341-347.
47. Vogels, G. D.; Uffink, L.; Vanderdr.C. *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas* **1970,** *89*, 500-508.
48. Jantzi, S. C. In *Rapport de stage Master Analyse et Contrôle*; Université Claude Bernard Lyon 1: Lyon, **2006**.
49. Cottet, H.; Martin, M.; Papillaud, A.; Souaid, E.; Collet, H.; Commeyras, A. *Biomacromolecules* **2007,** *8*, 3235-3243.
50. Manning, G. S. *Journal of Physical Chemistry* **1981,** *85*, 1506-1515.
51. Johannessen, C.; Kapitan, J.; Collet, H.; Commeyras, A.; Hecht, L.; Barron, L. D. *Biomacromolecules* **2009,** *10*, 1662-1664.
52. Romestand, B.; Rolland, J. L.; Commeyras, A.; Coussot, G.; Desvignes, I.; Pascal, R.; Vandenabeele-Trambouze, O. *Biomacromolecules* **2010,** *11*, 1169-1173.

Chapitre II

Polymérisation amorcée des NCA en milieu hétérogène

II. Polymérisation amorcée des NCA en milieu hétérogène

II.1 Introduction

Nous rappelons que l'objectif de cette thèse est d'explorer différents modes de modification des dendrimères greffés de L-lysine et d'en évaluer la faisabilité. Dans cette optique, une des voies que nous avons choisie pour introduire une nouvelle fonctionnalité sur la première génération de DGL passe par la polymérisation du Lys(TFA)-NCA, préparé *in situ*, initiée par un bras de liaison.

Bien que le processus de préparation des DGL mis au point au laboratoire propose une méthode originale et simple de synthèse et de purification de ces composés, il semble primordial de bien comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la polymérisation du Lys(TFA)-NCA, dans les conditions expérimentales décrites dans le brevet, et les facteurs qui la gouvernent. En effet, en modifiant les DGL par l'insertion d'un bras espaceur, nous augmenterons leur valeur ajoutée et de ce fait, nous devrons maximiser les rendements de la polymérisation pour optimiser la synthèse.

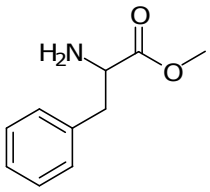
Afin de déterminer et d'optimiser les paramètres réactionnels importants pour la polymérisation du Lys(TFA)-NCA en phase aqueuse, initiée par un amorceur, lors de la synthèse de la première génération de DGL, nous avons réalisés plusieurs polymérisations de Lys(TFA)-NCA en utilisant des amorceurs différents, comportant une amine primaire, certains étant solubles et d'autres très peu solubles dans le milieu de polymérisation. Au cours de ces polymérisations, nous avons fait varier différents paramètres tels que le rapport monomère/amorceur (M/A) ou encore la présence d'un co-solvant, l'acétonitrile.

II.2 Synthèse de DGL de 1ère génération en présence d'un amorceur

II.2.1 Les amorceurs utilisés

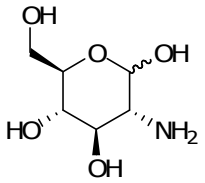
Nous avons utilisé des molécules de nature différente ayant une amine primaire comme amorceurs de polymérisation. Ces molécules sont représentées dans la figure 11 ci-après. Nous avons reporté sur cette figure le pKa ainsi que la solubilité aqueuse des amorceurs utilisés. Ces valeurs sont des estimations calculées à partir du logiciel ALOGPS 2.1[1,2].

Cette figure est reproduite en annexe III sur une double page afin de faciliter la lecture des résultats dans les paragraphes qui suivent.



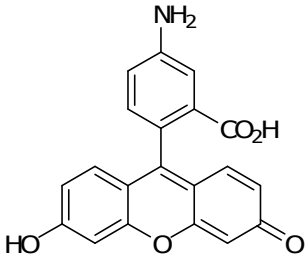
Phe-OMe (**AM1**)

pKa = **7,4**
Solubilité aqueuse = **4,62 g/L**



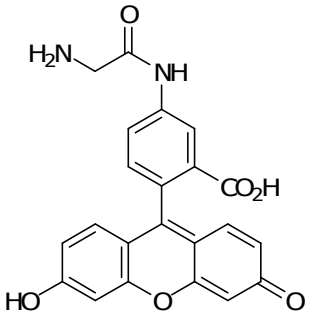
Glucosamine (**AM2**)

pKa amine = **7,8**
Solubilité aqueuse = **270 g/L**



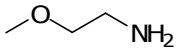
Fluorescéinamine (**AM3**)

pKa amine = **3,3**
Solubilité aqueuse = **0,032 g/L**



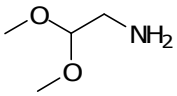
5-(aminoacétamido)fluorescéine (**AM4**)

pKa amine = **7,9**
Solubilité aqueuse = **0,054 g/L**



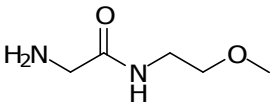
2-méthoxyéthylamine (**AM5**)

pKa = **9,2**
Solubilité aqueuse = **50 g/L**



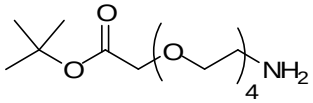
2,2-diméthoxyéthylamine (**AM6**)

pKa = **8**
Solubilité aqueuse = **80 g/L**



2-amino-*N*-(2-méthoxyéthyl)acétamide (**AM7**)

pKa = **8,2**
Solubilité aqueuse = **150 g/L**



14-amino-3,6,9,12-tétraoxatétradécan-1-oate de tert-butyle (**AM8**)

pKa = **9,6**
Solubilité aqueuse = **72,6 g/L**

Figure 11 : Amorceurs utilisés. pKa et solubilité calculés par le logiciel ALOGPS 2.1[1,2]

Nous avons choisi d'utiliser Phe-OMe (**AM1**) comme amorceur car c'est un acide aminé qui permet de mimer comportement de Lys(TFA) lors de l'auto-amorçage. La glucosamine (**AM2**) a été retenue car cela nous permet de démontrer la faisabilité de l'introduction d'un sucre sur la 1ère génération de DGL via la polymérisation. Les sucres permettant éventuellement la complexation du bore, le complexe DGL-sucre-bore pourrait être employé en tant que vecteur de bore. Les molécules fluorescentes **AM3** et **AM4** ont été choisies afin d'introduire via la polymérisation un fluorophore sur la 1ère génération de DGL. Ce fluorophore permettrait d'utiliser les DGL dans des études biologiques via un suivi par fluorescence. Les composés **AM5** à **AM8** sont eux utilisés comme molécules modèles, car ils ont un motif CH_2CH_2O. Ces molécules nous permettrons de prévoir le comportement lors de la polymérisation du bras de liaison de type PEG que nous souhaitons synthétiser par ailleurs.
Dans les paragraphes qui suivent, nous allons aborder la synthèse d'**AM4** et **AM7**. La synthèse d'**AM8** sera détaillée dans la partie expérimentale du chapitre consacré à la synthèse du bras de liaison.

II.2.1.1 Synthèse des amorceurs

a. Synthèse d'AM4

Le fluorescéinylglycinamide (**AM4**) est le produit de couplage entre la fluorescéinamine (**AM3**) et la glycine. Afin de réaliser ce couplage, il est au préalable nécessaire de protéger la fluorescéinamine. En effet, des études sur la fluorescéine[3,4], molécule dont la fluorescéinamine est un des dérivés, ont montrées qu'elle peut se trouver sous différentes formes (équilibre tautomère et ionique) en solution en fonction du pH et du solvant utilisé (Figure 12). Il faut noter que la forme ouverte (quinoïde) est fluorescente tandis que la forme fermée (lactone) ne l'est pas.

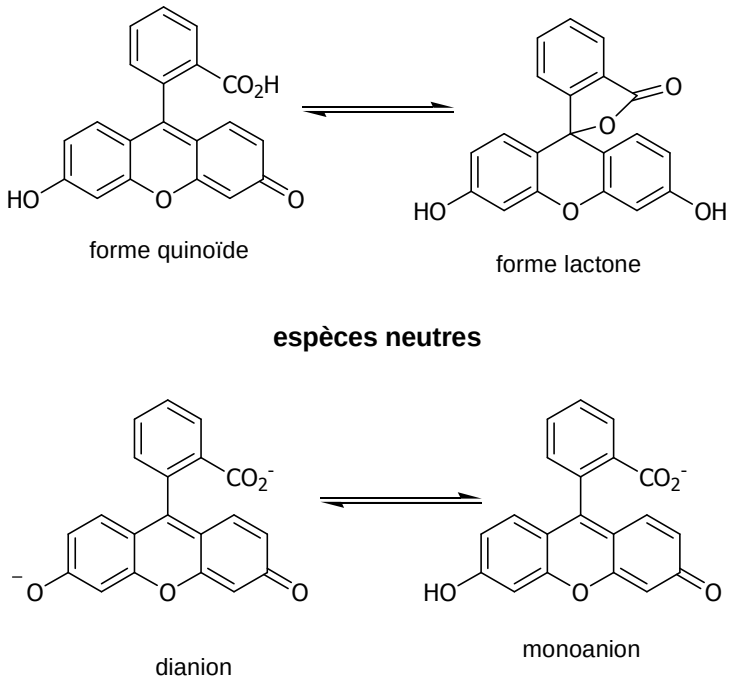
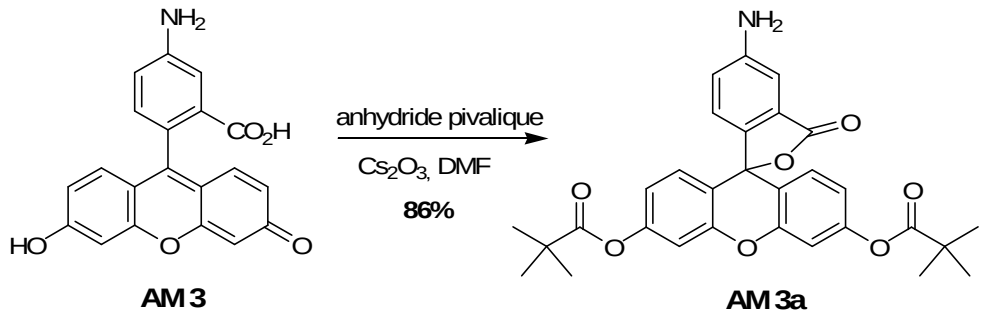


Figure 12 : Différentes formes de la fluorescéine en solution

Ces différentes formes en équilibre peuvent poser des problèmes lors de l'utilisation de ce type composé en tant que réactif. En général, deux méthodes sont utilisées pour pallier le problème de tautomérie : le couplage de la fonction acide carboxylique en 2' avec une amine secondaire[5,6] ou son estérification[7-9]. En ce qui concerne la première méthode, bien que la formation de l'amide secondaire de la rhodamine (molécule fluorescente dont le squelette est analogue à celui de la fluorescéine) N,N,N',N'-tétrasubstituée, comme la rhodamine B par exemple, se fait avec des rendements élevés[6], la réaction est moins efficace avec la fluorescéine et requiert une étape supplémentaire d'activation[5]. D'un autre côté, l'estérification de la fonction acide carboxylique en 2' de la fluorescéine se fait avec d'excellents rendements[8,9]. Cependant, il existe une troisième méthode pour bloquer la fluorescéine sous une des deux formes tautomères : l'estérification des fonctions phénols[10,11]. Cette réaction permet de bloquer la fluorescéine sous forme de lactone. Cela est très utile dans le cas où on utilise la fluorescéinamine car l'estérification masque les phénols et la cyclisation de la fluorescéinamine bloque la fonction acide carboxylique sous forme de lactone laissant ainsi la fonction amine comme étant la seule fonction réactive de la molécule.



AM3 **AM3a**

Schéma 33 : Protection de la fluorescéinamine

Nous avons employé cette méthode pour protéger la fluorescéinamine selon le protocole proposé par Hirano *et al.*[10]. La fluorescéinamine est mise en réaction avec de l'anhydride pivalique en présence de carbonate de césium dans le DMF à température ambiante (Schéma 33). Cette réaction conduit à la formation d'**AM3a** avec un excellent rendement. Nous observons cependant la présence d'un dérivé diprotégé sous forme ouverte (fluorescente). Il s'agit de la fluorescéinamine protégée au niveau d'une seule fonction phénol et sur l'amine par l'anhydride pivalique, ce qui explique qu'il soit sous forme ouverte. Ce composé est difficilement séparable du diprotégé **AM3a**. Néanmoins, sa présence n'est pas gênante pour l'étape suivante, c'est-à-dire le couplage entre **AM3a** et la glycine, car étant protégé sur l'amine, il ne pourra pas réagir avec la glycine et pourra être éliminé plus facilement par chromatographie sur colonne.

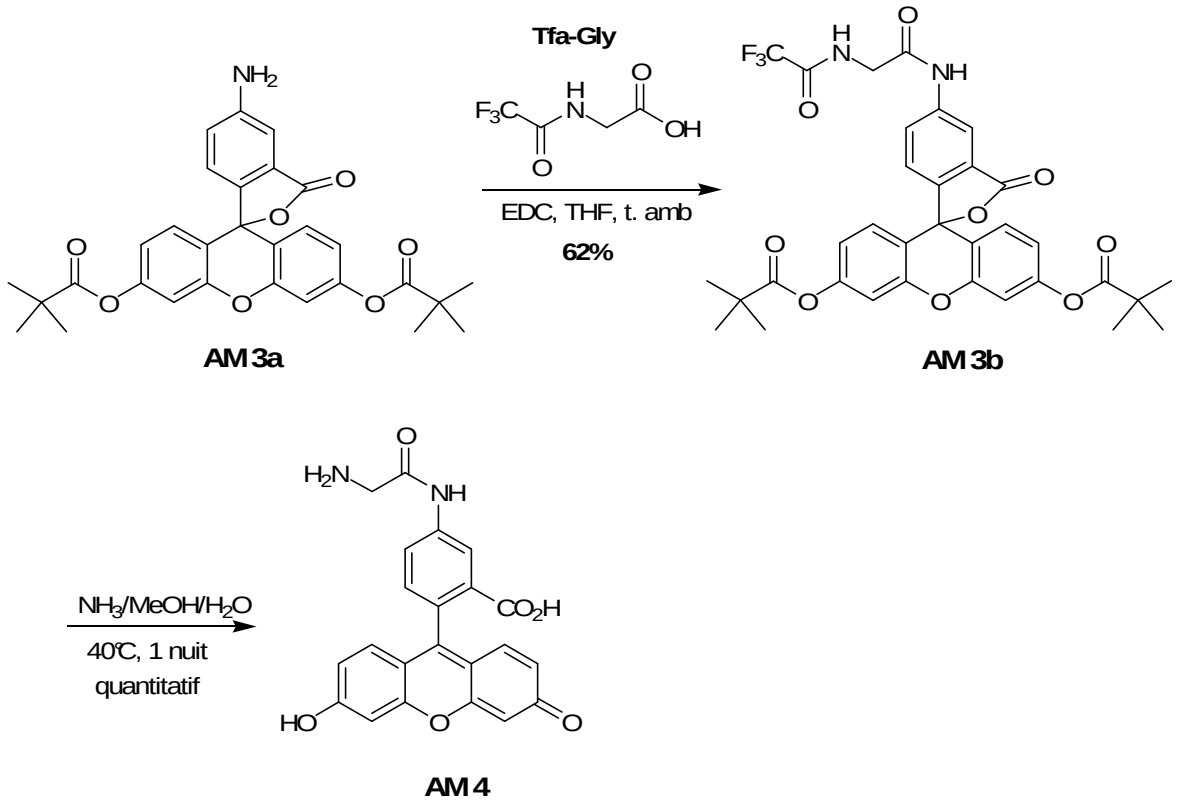


Schéma 34 : Synthèse d'AM4

Nous avons réalisé la réaction de couplage avec le dérivé de la glycine protégé par un groupement trifluoroacétyle sur l'amine α. Le protocole de synthèse de ce composé est décrit dans la partie expérimentale. La N^{α}-trifluoroacétyl-glycine (**TFA-Gly**) est mise en réaction avec **AM3a** en présence d'EDC (N-éthyl-N′-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide) dans le THF à température ambiante. Le produit de couplage est obtenu avec 62% de rendement. Il s'en suit une déprotection en milieu basique qui permet de libérer la fonction amine ainsi que les phénols et de passer de la forme lactone à la forme quinoïde fluorescente (Schéma 34).

b. Synthèse d'AM7

Le glycin(2-méthoxyéthyl)amide (**AM7**) est synthétisé comme indiqué dans le schéma ci-dessous.

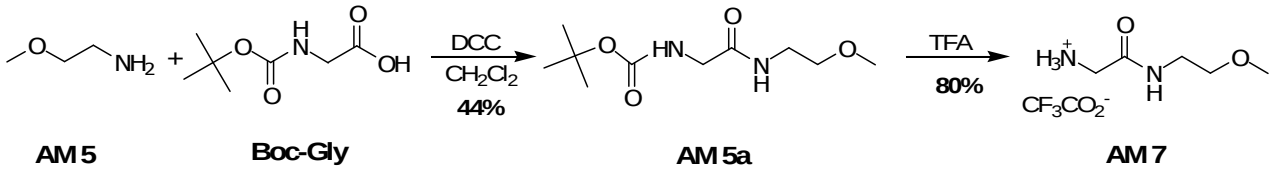


Schéma 35 : Schéma de synthèse d'AM7

Nous effectuons une réaction de couplage entre la 2-méthoxyéthylamine (**AM5**) et la Boc-glycine en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans le dichlorométhane. Le produit de couplage obtenu est déprotégé en milieu acide par l'acide trifluoroacétique (TFA) pour conduire à **AM7** sous forme de sel de trifluoroacétate.

Dans les paragraphes qui suivent, nous allons exposer puis discuter les résultats obtenus avec nos différents amorceurs lors de la polymérisation de Lys(TFA)-NCA.

II.3 Résultats et discussion

Nous avons réalisé plusieurs polymérisations de Lys(TFA)-NCA dans une solution aqueuse tamponnée à pH 6,5 et en présence des amorceurs présentés ci-dessus afin de démontrer la faisabilité du processus d'amorçage et de le généraliser à des amorceurs différents. Tout au long de ce chapitre, chaque fois que nous ferons référence au Lys(TFA)-NCA, il s'agira du NCA de Lys(TFA) préparé par nitrosation[12] et utilisé directement, sans purification, pour la polymérisation.

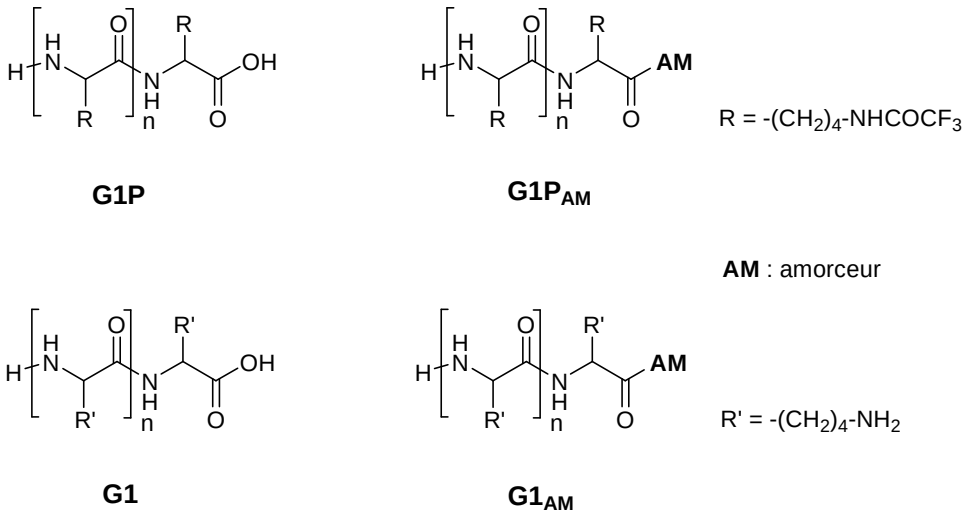


Figure 13 : Désignation des oligomères

Nous désignerons par **G1P** et **G1**, les oligomères issus de l'auto-amorçage de la polymérisation, et par **G1P$_{AM}$** et **G1$_{AM}$**, les oligomères provenant de l'initiation de la polymérisation par un amorceur, **P** faisant référence à la forme protégée de l'oligomère et **AM** à la présence d'un amorceur (Figure 13).

Nous avons consigné dans le tableau 2 ci-après les meilleurs résultats obtenus lors de ces polymérisations. Les conditions expérimentales de toutes les polymérisations sont détaillées dans la partie expérimentale de ce chapitre. Les oligomères obtenus sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF sous forme protégée. Contrairement aux conditions d'analyse par électrophorèse capillaire présentées dans le chapitre précédent (cf. Figure 7 p. 52), les oligomères que nous avons synthétisés ont été analysés par électrophorèse capillaire sous forme déprotégée. Les analyses sont réalisées sur les précipités obtenus après lavage et lyophilisation pour la forme protégée et après évaporation de l'ammoniac et lyophilisation pour la forme libre. Il faut rappeler que le MALDI-TOF a tendance à sous-estimer le degré de polymérisation réel (cf. § I.3.1 p. 45). A l'aide de l'électrophorèse capillaire, nous pouvons avoir une idée de la distribution réelle de nos oligomères car la totalité de l'échantillon introduit dans le capillaire est analysée. Toutefois, il est difficile de séparer **G1** de $\mathbf{G1_{AM}}$ dans le milieu de séparation que nous utilisons lorsque la masse molaire de l'amorceur est faible (< 200 g/mol). Mais, dans le cas des amorceurs fluorescents, **AM3** et **AM4**, non seulement la masse molaire est plus élevée (350-400 g/mol) mais ils sont aussi détectables à 2 longueurs d'ondes différentes : à 200 nm et à 450 nm. Cela permet d'identifier sur l'électrophérogramme sans ambiguïté les pics correspondant à **G1** et ceux correspondant à $\mathbf{G1_{AM}}$ comme le montre la figure 14 ci-dessous. Les échantillons à analyser ont été préparés à une concentration de 5 g/L dans un électrolyte acide à pH 2 et en présence d'imidazole (0,5 g/L) qui est un chromophore servant de marqueur de flux. Toutes les solutions ont été préparées dans l'eau ultra pure.

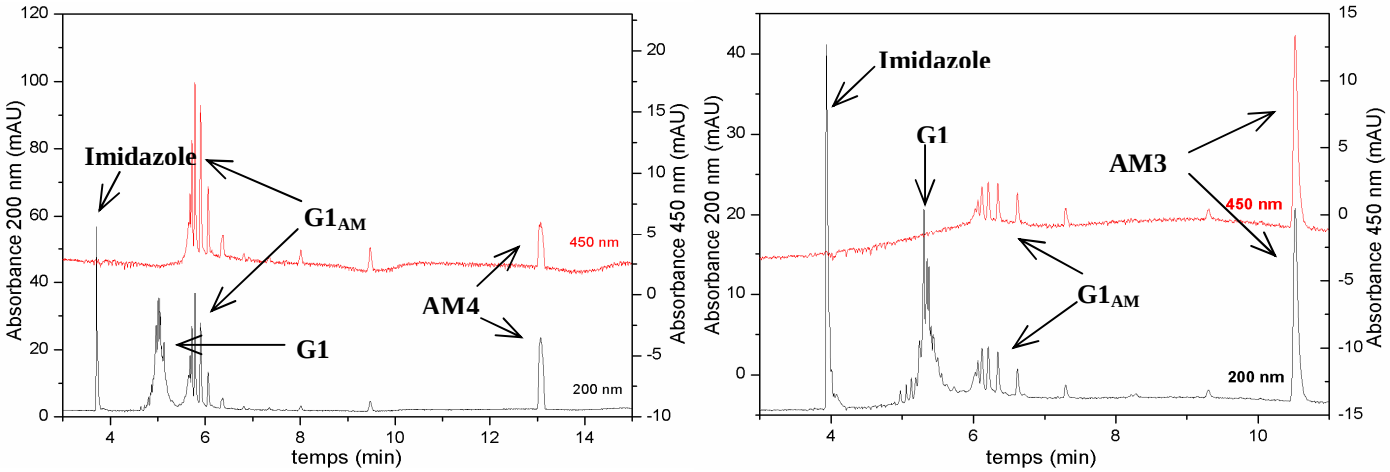


Figure 14 : Analyse par EC du produit issu de la polymérisation en présence d'**AM4** (à gauche) et en présence d'**AM3** (à droite). *Conditions électrophorétiques : capillaire de silice vierge, 50 cm (41,5 cm à la fenêtre de détection) x 50 µm. Electrolyte : tampon 125 mM Tris / 250 mM H_3PO_4 (pH = 2). Tension appliquée : + 20 kV. Détection UV à 200 et 450 nm. Etalon interne : imidazole à 0,5 g/L. Concentration de l'échantillon : 5 g/L.*

Avant d'exposer et de commenter les résultats de ce tableau, nous allons d'abord expliciter les méthodes de calcul employées pour obtenir les résultats qui y figurent. Premièrement, le rapport M/A correspond au rapport molaire n(CAA)/n(amorceur). Deuxièmement, les $\overline{DP_n}$ de **G1P$_{AM}$** et de **G1P** sont calculés, pour chacune des distributions observées sur le spectre de masse, selon la formule suivante :

$$\overline{DP_n} = \frac{\Sigma \text{ (intensité du signal)}}{\Sigma \text{ (intensité du signal/DP)}}$$

Ensuite, le pourcentage d'oligomères amorcés contenus dans le précipité est obtenu, à partir du spectre de masse ou de l'électrophérogramme, en calculant le rapport d'intégration des aires sous la courbe formée par chaque distribution : Aire$_{\mathbf{G1P\ AM}}$/Aire$_{(\mathbf{G1P\ AM}\ +\ \mathbf{G1P})}$. Enfin, les rendements sont calculés en appliquant les formules suivantes :

$$\text{Rdt (précipité)} = \frac{\text{m(précipité)}}{\text{m(CAA)}}$$

$$\text{Rdt (monomère)} = \frac{\text{n(oligo)} \times [\overline{DP_n}\ \mathbf{G1P_{AM}} \times T + \overline{DP_n}\ \mathbf{G1P} \times (1-T)]}{\text{n(CAA)}}$$

$$\text{Rdt (amorceur)} = \frac{\text{n(oligo)} \times T}{\text{n(amorceur)}}$$

où T = pourcentage d'oligomères amorcés contenus dans le précipité

$$\text{n (oligo)} = \frac{\text{m(précipité)}}{\overline{M}_{\text{oligo amorcé}} \times T + \overline{M}_{\text{oligo auto-amorcé}} \times (1- T)}$$

avec $\overline{M}_{\text{oligo amorcé}} = M_{\text{monomère}} \times \overline{DP_n}\ \mathbf{G1P_{AM}} + M_{\text{amorceur}}$

$\overline{M}_{\text{oligo auto-amorcé}} = M_{\text{monomère}} \times \overline{DP_n}\ \mathbf{G1P} + M_{H_2O}$

Pour ces calculs, nous faisons l'approximation que le précipité n'est composé que d'oligomères car nous savons que le précipité, dans le cas de la polymérisation auto-amorcée, ne présente que très peu de produits secondaires (cf. § I.3.1.3, p. 51). Nous utiliserons ces méthodes de calcul tout au long de ce chapitre.

Amorceurs	M/A	$\overline{DP_n}$ **G1P$_{AM}$**	$\overline{DP_n}$ **G1P**	% oligomères amorcés	Rdt (précipité) (%)	Rdt (monomère) (%)	Rdt (amorceur) (%)
AM2	7	6	6	96	24	26	35
AM5	8	5,5	6	92	39	47	65
AM6	8	4	-	100	24	27	52
AM7	8	5,5	6	99	25	28	41
AM1	8	5	-	100	48	52	80
AM3	11	-	-	26[a]	50	-	-
AM4	7	5	7	43[a]	22	25	14
AM8	7	5	6	92[a]	13	14	18

Tableau 2 : Polymérisation de Lys(TFA)-NCA initiée par amorceurs différents. **[a]** déterminé par EC

Nous voyons dans ce tableau que tous les amorceurs ont permis d'initier la polymérisation du Lys(TFA)-NCA mais avec plus ou moins de succès. Nous remarquons aussi que le $\overline{DP_n}$ **G1P$_{AM}$** est quasiment constant d'un amorceur à l'autre : il ne varie que de plus ou moins une unité. Il en est de même pour $\overline{DP_n}$ **G1P**. En observant les rendements, nous constatons qu'ils sont assez variables d'un amorceur à l'autre. Nous rappelons que ce ne sont pas des conditions optimisées mais simplement les meilleurs résultats obtenus. Pour la plupart des polymérisations, le pourcentage d'oligomères amorcés contenus dans le précipité oscille entre 80% et 100%, sauf pour **AM3** et **AM4** où il est respectivement de 26% et 43%. Cependant, malgré la faible solubilité aqueuse de ces amorceurs fluorescents, ils parviennent tout de même à initier la polymérisation du Lys(TFA)-NCA. La différence du pourcentage d'oligomères amorcés observée entre les amorçages par **AM3** et **AM4** peut certainement s'expliquer par la différence de pKa de ces amorceurs. En effet, au pH de la polymérisation (pH 6,5), l'amine d'**AM3** (pKa 3,3) se trouve totalement sous forme libre et peut donc réagir avec une molécule de NCA. Cependant, une amine ayant ce pKa est très peu nucléophile, ce qui explique le faible taux d'oligomères amorcés par **AM3**. D'un autre côté, l'amine d'**AM4** (pKa 7,9) à pH 6,5 se trouve essentiellement sous forme protonée. Toutefois, il existe un faible pourcentage d'amine sous forme libre capable d'amorcer la polymérisation du NCA. Le pourcentage d'amine sous forme libre pour **AM4** est très inférieur à celui de la fluorescéinamine, au pH de la réaction, mais **AM4** est nettement plus nucléophile qu'**AM3**. Si la différence de pKa entre **AM4** et **AM3** permet d'apporter un élément de réponse quant à la

différence de taux d'oligomères amorcés observée, elle n'explique pas le fait que l'initiation de la polymérisation, dans de telles conditions ait lieu. En effet, ces polymérisations se déroulent dans un système où l'amorceur et le NCA sont très peu solubles dans le milieu réactionnel. Cela nous amène à penser que, ces deux entités se trouvant majoritairement en phase solide, l'amorçage de la polymérisation et certainement l'élongation pourraient se faire dans cette phase. Toutefois, il ne faut pas négliger les fractions d'amorceur et de NCA solubles dans le milieu réactionnel qui peuvent aussi être le point de départ de la polymérisation.

Après avoir présenté d'une manière générale les résultats que nous avons obtenus, nous allons sélectionner, parmi l'ensemble de nos résultats, les expériences qui ont été réalisées dans des conditions expérimentales similaires et les comparer afin de mieux comprendre le processus de polymérisation du Lys-TFA(NCA).

Avant de nous lancer dans cette étude, nous avons commencé par adapter les paramètres expérimentaux de la synthèse sans amorceur réalisée à l'échelle préparative (100 g), pour une synthèse à l'échelle du laboratoire (500 mg). En effet, nous avons choisi, pour des raisons de commodité évidentes, de réaliser nos synthèses en partant d'une masse de 500 mg de C-Lys(TFA). Le procédé de synthèse de la première génération de DGL étant un processus long et faisant intervenir un grand nombre de paramètres, il nous paraît nécessaire, dans le cadre d'un changement d'échelle aussi important, de s'assurer de l'adaptabilité de ce procédé. Pour cela, nous avons réalisé la polymérisation auto-amorcée du Lys(TFA)-NCA en partant de 500 mg de C-Lys(TFA) et en calquant au mieux les paramètres utilisés pour la synthèse à grande échelle. Dans le tableau ci-dessous, nous avons reporté les conditions expérimentales utilisées et les résultats obtenus pour notre synthèse. Les informations concernant la synthèse à grande échelle sont indiquées en référence.

Le rendement en monomère, est calculé en appliquant la formule suivante :

$$\text{Rdt monomère} = \frac{n(\text{oligo})}{n(\text{CAA})} \quad \text{avec} \quad n(\text{oligo}) = \frac{m(\text{précipité})}{M_{\text{monomère}} \times \overline{DP_n}\ \mathbf{G1P} + M_{H_2O}}$$

m CAA (g)	Rapport NO/CAA	Rapport NO/O_2	Durée nitrosation	Vtampon (mL)	Durée polymérisation (h)	m précipité (g)	$\overline{DP_n}$ **G1P**	Rdt (monomère) (%)
100	2,55	5	1h45	1500	15	47,5	7	60
0,5	1,8	4,5	1h55	10	15	0,15	7	38

Tableau 3 : Comparaison des conditions expérimentales de la polymérisation sans amorceur de Lys(TFA)-NCA

Dans ce tableau, nous observons que les conditions expérimentales employées pour les deux synthèses sont quasiment identiques. Le rapport NO/CAA que nous avons adopté est inférieur à celui utilisé pour la synthèse à grande échelle, cependant, cela n'affecte pas la qualité des oligomères obtenus en fin de réaction. En effet, l'analyse des oligomères par spectrométrie de masse MALDI-TOF donne des résultats identiques pour les deux synthèses : le degré de polymérisation moyen en nombre, caractéristique principale des oligomères, est le même dans les deux cas et il y a très peu de produits secondaires. La principale différence entre ces deux synthèses vient du rendement en monomère : 60% pour la synthèse à grande échelle et 38% pour l'autre. Toutefois, une telle différence de rendement peut être expliquée par deux facteurs. D'une part, l'étape de lavage des oligomères synthétisés, effectuée en fin de protocole, peut conduire à une chute plus ou moins importante du rendement. Cette étape est délicate car lorsqu'un trop grand volume d'eau est utilisé pour laver le précipité, cela entraîne la dissolution d'une partie de ce dernier (les oligomères les plus courts sont dissous) donc une perte de masse plus ou moins importante. Cet effet a déjà été observé lors de synthèses à grande échelle. D'autre part, lors de la récupération du produit, la quantité de solide irrécupérable restant accrochée sur les parois du ballon affecte beaucoup moins le rendement pour une synthèse sur 100 g que pour une synthèse sur 500 mg.

Pour conclure, à travers l'analyse des résultats obtenus pour la synthèse partant de 500 mg de C-Lys(TFA), nous pouvons dire que le changement d'échelle est probant car nous obtenons des oligomères avec les mêmes caractéristiques que ceux obtenus à grande échelle. Cependant, le rendement est un peu plus faible mais suffisant pour réaliser nos expériences.

Partant de cette synthèse auto-amorcée comme référence, nous allons aborder l'étude de la polymérisation du Lys(TFA)-NCA en présence d'un amorceur dans les paragraphes qui suivent.

II.3.1 Polymérisation en phase aqueuse du Lys(TFA)-NCA initiée par des divers amorceurs

II.3.1.1 Résultats

Nous avons réalisé plusieurs amorçages avec des amorceurs de natures différentes dans le milieu de polymérisation. Les synthèses ont été réalisées avec des conditions de nitrosation et de polymérisation similaires.

Les résultats de l'analyse des produits issus des différentes polymérisations sont consignés dans le tableau 4 ci-dessous. Les informations concernant la polymérisation auto-amorcée sont ajoutées pour servir de référence. Nous retrouvons dans ce tableau des données concernant les paramètres expérimentaux comme le nombre de moles de C-Lys(TFA) de départ, le nombre de moles d'amorceur engagé, le rapport M/A (monomère/amorceur) utilisé, le volume de solution tampon CO_2/$NaHCO_3$ 0,2 M utilisé, et des données concernant les oligomères obtenus en fin de réaction comme, le $\overline{DP_n}$ des oligomères amorcés **$G1P_{AM}$** et auto-amorcés **G1P** dans le précipité, le pourcentage d'oligomères amorcés contenus dans le précipité ainsi que les rendements en précipité, en monomère et en amorceur.

Amorceur	n CAA (mmol)	n amorceur (mmol)	M/A	V tampon (mL)	$\overline{DP_n}$ **$G1P_{AM}$**	$\overline{DP_n}$ **G1P**	% oligomères amorcés	Rdt précipité (%)	Rdt monomère (%)	Rdt amorceur (%)
-	1,75	-	-	10	-	7	-	30	38	-
AM5	1,75	0,45	4	10	5	6	97	18	21	20
AM7	1,77	0,43	4	10	5	-	100	9	10	9
AM8	1,76	0,43	4	10	5	6	90[a]	16	16	12
AM8	1,79	0,25	7	10	5	6	92[a]	14	14	18
AM1	1,76	0,23	8	8	5	-	100	48	52	80
AM6	1,75	0,23	8	8	4	-	100	24	27	52

Tableau 4 : Polymérisation du Lys(TFA)-NCA en phase aqueuse en présence d'un amorceur soluble dans l'eau. [a] déterminé par EC

En analysant le contenu de ce tableau, nous pouvons classer ces expériences en deux groupes en fonction du rapport M/A, le premier groupe incluant les synthèses pour lesquelles M/A = 4

et le second celles pour lesquelles M/A = 7-8. Si nous observons le premier groupe (M/A = 4), nous observons qu'avec des conditions expérimentales identiques mais des amorceurs différents, le $\overline{DP_n}$ de **G1P$_{AM}$** est quasiment constant. De plus, le $\overline{DP_n}$ de **G1P** est lui aussi constant et similaire à celui observé lors de la polymérisation auto-amorcée. Le pourcentage d'oligomères amorcés contenus dans le précipité est au minimum de 80% et atteint 100% pour la polymérisation réalisée avec **AM7**. Toutefois, en regardant le rendement en amorceur et en monomère, nous voyons que les oligomères obtenus avec **AM7** ne contiennent que 9% d'amorceur et 10% de monomère. Dans le cas de l'amorçage par **AM5**, qui a un pourcentage d'oligomères amorcés de 97%, nous observons aussi que le rendement en amorceur reste faible, avec 20% d'amorceur dans le précipité. **AM8** se trouve aussi dans la même situation, avec un pourcentage d'oligomères amorcés de 90% et un rendement en amorceur de 12%. Dans le second groupe (M/A = 7-8), nous retrouvons un amorçage avec **AM8** qui conduit à des résultats similaires à ceux observés avec ce même amorceur mais dans un rapport monomère/amorceur différent. D'après ces résultats, le rapport M/A n'aurait vraisemblablement pas d'effet sur la nature des oligomères isolés en fin de réaction. Les synthèses réalisées avec **AM6** et **AM1** ont conduits à des amorçages totaux. Néanmoins, comparativement aux rendements observés pour les amorceurs du premier groupe, les rendements en amorceur et en monomère sont bien meilleurs pour **AM6** et **AM1**.

Nous avons effectué l'analyse du surnageant recueilli lors de la polymérisation du Lys(TFA)-NCA en présence d'**AM1**. Cette analyse par LC/MS montre que ce surnageant contient de la Lys(TFA), du di- et du tétra-peptide Lys(TFA), du dipeptide Lys(TFA) sous forme amide (à la place de la fonction acide carboxylique), du tripeptide Lys(TFA) sous forme carbamoylée, du C-Lys(TFA) et **AM1** couplé à C-Lys(TFA). Nous retrouvons aussi les produits de dégradation du *N*-nitroso-C-Lys(TFA) : la Lys(TFA) insaturée et l'hydroxy-analogue de Lys(TFA) tout comme lors de l'analyse du surnageant issu de la polymérisation auto-amorcée (cf. § I.3.1.2, p.47). L'analyse de ce surnageant nous révèle que l'amorceur et le monomère manquant dans le précipité se retrouve bien dans le surnageant.

Á travers ces résultats, nous voyons que d'une part que le rapport M/A utilisé pour réaliser la polymérisation du Lys(TFA)-NCA n'influe pas sur la nature des oligomères obtenus en fin de réaction. D'autre part, il s'avère que l'amorceur a une efficacité remarquable puisque dans toutes les synthèses, il réagit avec le NCA. Dans certains cas, comme avec **AM6**, **AM1** et **AM7**, l'amorçage de la réaction par l'amine de l'amorceur est si efficace que les réactions d'auto-amorçage sont inexistantes.

II.3.1.2 Discussion

a. Rappel des travaux de Lahav

Afin de mieux comprendre l'ensemble des résultats présentés, nous allons tout d'abord revenir un peu plus en détail sur les travaux de Lahav *et al.*[13-17]. En 2007, Lahav et ses collaborateurs[13,14] réalisent la polymérisation de cristaux racémiques de NCA dans l'eau en présence d'un amorceur. Leur but est de démontrer, dans le cadre de la compréhension de l'émergence de l'homochiralité dans le monde peptidique prébiotique, qu'il est possible d'obtenir des oligopeptides isotactiques (homochiraux) allant jusqu'à 25 unités monomères en partant d'un mélange racémique de cristaux de NCA par polymérisation dans l'eau. Cette polymérisation a lieu en phase hétérogène puisque le cristal de NCA est directement mis en suspension dans une solution aqueuse contenant l'amorceur. Les oligomères, obtenus après 24 à 72h de polymérisation, sont lyophilisés et analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ils utilisent des NCA énantiosélectivement deutériés afin de différencier sur le spectre de masse les oligopeptides homochiraux R des oligopeptides homochiraux S. Nous avons reporté dans le tableau suivant les conditions expérimentales employées pour réaliser ces synthèses et les résultats obtenus.

NCA	$[NCA]_0$ (mM)	amorceur	$[amorceur]_0$ (mM)	M/A	$\overline{DP_n}$	**G1P$_{AM}$**
(R,S)-Phe-NCA [a]	60	n-butylamine	100	0,6	5
	60	(S)-Phe-OMe	60	1	5
(R,S)-Val-NCA [b]	8,8	n-butylamine	7,48	1,2	3
	8,8	(S)-Phe-OMe	7,48	1,2	4
(R,S)-Leu-NCA [b]	7,96	n-butylamine	6,77	1,2	4

Tableau 5 : Polymérisation de cristaux racémiques de NCA dans l'eau en présence d'un amorceur en phase hétérogène. [a] Nery *et al.*[13]. [b] Eliash *et al.*[14].

Nous voyons dans ce tableau qu'ils utilisent trois NCA d'acides aminés différents et deux types d'amorceurs, un ester d'acide aminé et une amine aliphatique, pour initier la polymérisation. En comparaison avec nos conditions expérimentales, les concentrations initiales en NCA utilisées ici sont beaucoup plus faibles que les nôtres (175 – 220 mM). Il en est de même pour les rapports monomère/amorceur et pour les concentrations initiales en amorceur, sauf dans le cas de la polymérisation de Phe-NCA où les concentrations en amorceur sont supérieures aux nôtres. Dans la description de leurs travaux, Lahav *et al.* se

sont focalisés sur la présence ou non de polypeptides homochiraux, et de ce fait, les rendements des polymérisations ne sont pas détaillés. De même, la présence d'oligomères auto-amorcés n'est pas clairement explicitée. Leur présence est simplement mentionnée sur un spectre de masse concernant la polymérisation de Phe-NCA amorcée par Phe-OMe mais cet élément n'est pas pris en compte dans la discussion. En ce qui concerne le $\overline{DP_n}$ de **G1P$_{AM}$**, nous remarquons que malgré des conditions expérimentales différentes, il y a peu de variations de ce dernier d'une synthèse à l'autre. Il est intéressant de noter que nous obtenons des $\overline{DP_n}$ similaires pour les oligomères amorcés que nous avons synthétisés. D'après les résultats obtenus, ces auteurs ont proposé un mécanisme de polymérisation en trois étapes qui passe par un contrôle de la réaction par le réseau cristallin, au début de la polymérisation, et par un contrôle exercé par la phase polymérique formée, dans la dernière étape.

(i) Plus précisément, en première étape, il se produit une réaction hétérogène à l'interface cristal/eau entre l'amorceur et le NCA. Ce processus est contrôlé dans une certaine mesure par les surfaces qui délimitent le cristal de NCA.

(ii) Une fois la réaction initiée, les étapes de propagation rapide pourraient avoir lieu selon deux voies. Soit via un contrôle stéréospécifique de la condensation par le réseau cristallin du NCA où la fonction amine terminale du peptide en croissance se retrouve à bonne distance et dans l'orientation appropriée par rapport au carbonyle d'une molécule de monomère de son proche entourage. Soit par un phénomène de diffusion des monomères vers les chaînes peptidiques en croissance selon un chemin dicté par la structure du cristal de NCA. L'émergence d'oligopeptides courts, plus denses que le monomère cristallin, entraîne une destruction du réseau cristallin au niveau des sites d'élongation des chaînes. De plus, les molécules de CO_2 libérées lors de la condensation entre l'amine terminale du peptide et les molécules de NCA influent certainement aussi sur la déstructuration du réseau cristallin du NCA.

(iii) Une fois les tétra- à penta-peptides isotactiques générés dans les étapes de propagation rapide, ils s'auto-assemblent pour engendrer des architectures supramoléculaires tels que les feuillets β par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes. La formation de feuillets β a été démontrée par des analyses de FTIR et de diffraction des rayons X réalisées sur les oligomères obtenus en fin de réaction. Les amines terminales des peptides en feuillets β sont hydratées au travers de liaisons hydrogène avec des molécules d'eau et réagissent avec les molécules de monomère elles aussi hydratées à l'interface feuillet β/cristal. Ces architectures devraient fonctionner, dans le processus d'élongation, en tant que modèles de base exerçant

un contrôle stéréochimique de l'allongement de la chaîne pour conduire à des peptides isotactiques plus longs. Toutefois, dans ce système, il y a aussi une petite partie des oligopeptides isotactiques qui se forment en solution du fait de la dissolution partielle du monomère dans l'eau.

Toujours dans le but de comprendre l'émergence de l'homochiralité dans des conditions prébiotiques, Lahav et ses collaborateurs se sont placés dans des conditions de polymérisation d'un cristal racémique de NCA dans l'eau en présence d'un amorceur mais cette fois en phase homogène[15,16]. Pour ce faire, au lieu de mettre le cristal de NCA en suspension dans une solution aqueuse contenant un amorceur, ils ont d'abord dissous ce cristal dans l'eau (pH 6,5-7) puis l'amorceur a été ajouté au système. Ils ont utilisés des cristaux racémiques de Val-NCA et Leu-NCA pour réaliser ces polymérisations. Il est important de noter que les quantités de NCA utilisées étant faibles (environ 10 mg), les temps de solubilisation sont assez courts (1 min pour Val-NCA et 5 min pour Leu-NCA). Comme précédemment, les oligopeptides, obtenus après 24h de polymérisation, sont analysés par MALDI-TOF et les NCA utilisés sont énantiosélectivement deutériés. Nous avons reporté dans le tableau suivant les conditions expérimentales employées pour réaliser ces synthèses et les résultats obtenus.

NCA	$[NCA]_0$ (mM)	amorceur	$[amorceur]_0$ (mM)	M/A	$\overline{DP_n}$	**G1P$_{AM}$**
(R,S)-Val-NCA	66	n-Butylamine	16,6	4	4	
			6,6	10	4	
			3,3	20	4	
		(S)-Val-OMe	16,6	4	3	
			6,6	10	4	
			3,3	20	3	
(R,S)-Leu-NCA	60	n-Butylamine	15	4	4	
			6	10	5	
		(S)-Leu-OMe	6	10	5	
			3	20	4	

Tableau 6 : Polymérisation de cristaux racémiques de NCA dans l'eau en présence d'un amorceur en phase homogène[15,16].

Dans ce tableau, comparativement au système précédent, nous remarquons que les concentrations initiales en monomère et les rapports monomère /amorceur sont plus élevés.

Ensuite, bien que la polymérisation se déroule dans un milieu homogène et que les rapports monomère/amorceur soient différents, nous voyons que les $\overline{DP_n}$ des oligomères amorcés restent à peu près constants et qu'ils sont comparables à ceux que nous obtenons. En fonction de ces résultats, Lahav *et al.* ont proposé un mécanisme pour cette polymérisation en phase homogène. Au début, la polymérisation se déroule dans l'eau : l'amine de l'amorceur réagit avec une molécule de NCA, avec une vitesse de réaction nettement supérieure à celle de l'eau sur le NCA, pour conduire à un amide aminé qui pourra réagir à son tour sur une autre molécule de NCA, et ainsi de suite pour conduire à des oligopeptides courts. Les tétramères et les pentamères homochiraux ainsi formés sont relativement insolubles dans l'eau comparé à leurs homologues hétérochiraux plus solubles. Par conséquent, ils précipitent pour former des feuillets β, qui serviront de modèles de base exerçant un contrôle stéréochimique de l'allongement de la chaîne pour conduire à des peptides homochiraux plus longs. L'élongation se poursuit donc à l'interface feuillet β/solution aqueuse.

b. Discussion des travaux personnels

Maintenant, en considérant nos conditions réactionnelles, nous constatons que nous sommes dans une situation de polymérisation de NCA en phase hétérogène où le Lys(TFA)-NCA est quasiment insoluble dans la solution aqueuse. Par conséquent, le mécanisme de polymérisation qui correspondrait à ce qui se produit lors des expériences que nous avons réalisées serait le premier mécanisme proposé par Lahav *et al.* [13,14]. En examinant ce mécanisme, nous nous apercevons qu'il peut se diviser en trois phases. La superposition de ces phases avec une courbe représentant la répartition des DPn des oligomères obtenus en fin de réaction telle qu'on la retrouve sur un spectre de masse, permet d'expliquer l'obtention systématique du même $\overline{DP_n}$ quel que soit l'amorceur (Figure 15).

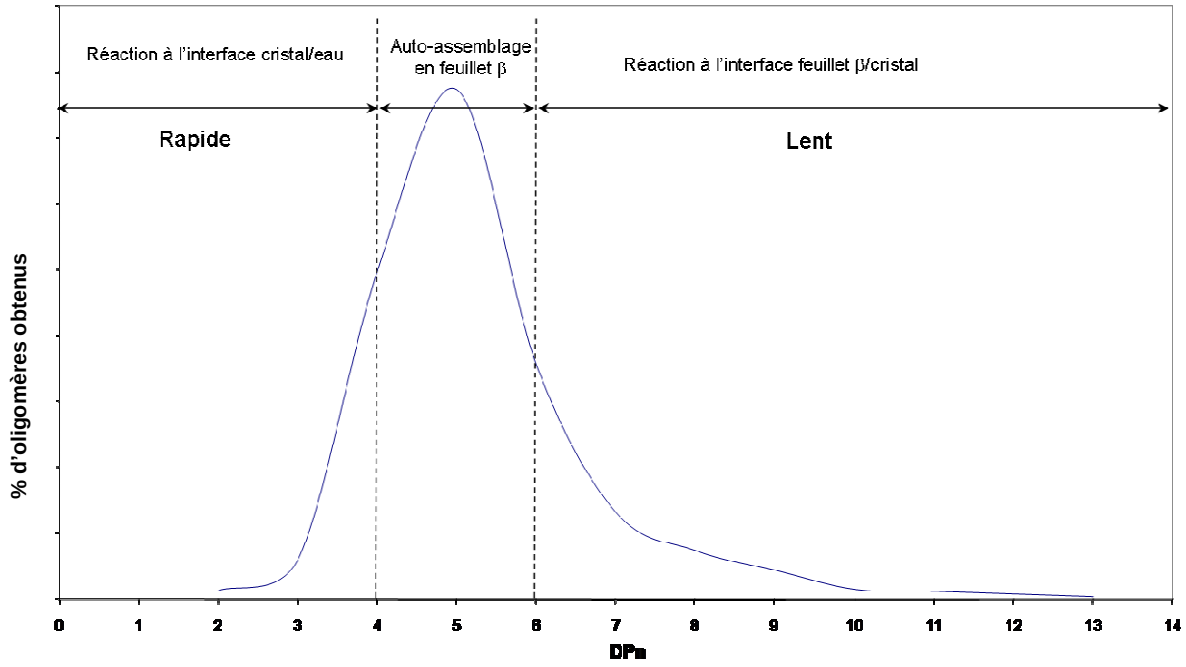


Figure 15 : Les trois phases du mécanisme de polymérisation du NCA en phase hétérogène

Nous avons divisé la figure ci-dessus en trois parties. La première partie correspond à l'étape d'amorçage de la polymérisation et au début de la propagation de celle-ci. C'est une étape rapide qui se déroule à l'interface entre le cristal et l'eau. Lorsque les chaînes en croissance atteignent un $\overline{DP_n}$ entre 4 et 6, elles s'auto-assemblent pour former des feuillets β : c'est la deuxième phase. Enfin, dans la dernière phase, la propagation de la polymérisation reprend son cours mais cette fois à l'interface feuillet β/cristal. Si l'on considère que la réaction de condensation conduisant à la formation d'une liaison peptidique est beaucoup plus lente à l'interface feuillet β/cristal qu'à l'interface eau/cristal, il vient qu'au début de la polymérisation, très rapidement, la majorité des chaînes peptidiques en croissance atteint la longueur nécessaire pour s'auto-assembler en feuillet β, mais ensuite la vitesse de la réaction de condensation diminuant, l'élongation des chaînes peptidiques, sous forme de feuillet β, se fait plus lentement et par conséquent en fin de polymérisation les oligopeptides se trouvent principalement sous forme de feuillets β avec un $\overline{DP_n}$ allant de 4 à 6. Nous comprenons donc pourquoi ce phénomène est indépendant de l'amorceur utilisé.

Toutefois, pour décrire ce processus de polymérisation dans sa globalité, il nous faut aussi parler de la compétition, au moment de l'amorçage de la polymérisation, entre l'eau et l'amine de l'amorceur. Bien que les polymérisations soient réalisées en milieu relativement dilué en amorceur (25 à 50 mM), nous avons vu que le pourcentage d'oligomères contenus

dans le précipité est, dans presque tous les cas, au moins de 80% et peut atteindre jusqu'à 100%. Cela sous-entend, en tenant compte de la faible concentration en amorceur, que la vitesse de réaction entre l'amine de l'amorceur et le NCA est nettement supérieure à celle entre l'eau et le NCA. L'amorceur, lorsqu'il rencontre le NCA réagit extrêmement rapidement avec ce dernier pour conduire à l'amide aminé correspondant. Celui-ci réagit avec une autre molécule de NCA pour conduire au dipeptide correspondant et ainsi de suite jusqu'à ce que l'oligopeptide se structure en feuillet β. Une fois les oligopeptides **G1P$_{AM}$** sous cette forme, la condensation étant plus lente, l'eau peut alors hydrolyser les molécules de NCA non consommées pour conduire à l'acide aminé correspondant qui pourra ensuite réagir avec une autre molécule de NCA pour conduire *in fine* aux oligopeptides **G1P**.

Nous avons voulu initier la polymérisation du Lys(TFA)-NCA en milieu homogène. Contrairement aux NCA utilisés par Lahav *et al*., le Lys(TFA)-NCA est très peu soluble dans l'eau. Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser un co-solvant comme l'acétonitrile car c'est un bon solvant du Lys(TFA)-NCA, qui est par ailleurs utilisé dans le processus de synthèse de ce dernier.

II.3.2 Polymérisation du Lys(TFA)-NCA en présence d'acétonitrile

Comme nous l'avons vu précédemment, au cours de la polymérisation du Lys(TFA)-NCA dans l'eau à pH 6,5 telle qu'elle est réalisée au laboratoire, nous obtenons systématiquement des oligomères qui précipitent hors du milieu réactionnel. Les chaînes peptidiques en croissance deviennent de plus en plus insolubles dans le milieu réactionnel au fur et à mesure des unités lysines ajoutées puis se structurent en feuillet β. Ce précipité, d'une synthèse à l'autre, présente toujours les mêmes caractéristiques physico-chimiques, entre autres le même nombre moyen d'unités lysine et le même indice de polydispersité.

Nous sommes partis du principe que la précipitation du peptide assure le contrôle de la masse moléculaire du DGL obtenu, et qu'elle est due en partie au caractère hydrophobe des chaînes latérales du peptide. Sur cette base, si l'on rend le milieu réactionnel moins polaire par l'ajout d'un co-solvant, non seulement le NCA pourra se solubiliser dans ce milieu réactionnel, mais aussi, le produit obtenu devrait rester plus longtemps en solution avant de précipiter et par conséquent sa masse moléculaire devrait augmenter.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à plusieurs polymérisations de Lys(TFA)-NCA, en se limitant à la synthèse de la 1ère génération de DGL, en utilisant des taux variables d'acétonitrile dans le milieu réactionnel. Nous préparons le Lys(TFA)-NCA *in situ* par nitrosation du C-Lys(TFA) puis nous effectuons la polymérisation de ce dernier en milieu tamponné à pH 6,5 en présence d'acétonitrile à 0°C. Enfin, le produit précipité **G1P** est déprotégé en milieu ammoniacal pour donner **G1**.

Nous avons réalisés les polymérisations avec 0, 18, 50 et 62 % d'acétonitrile. Les analyses sont réalisées sur les précipités obtenus après lavage et lyophilisation pour la forme protégée **G1P** (MALDI) et après évaporation de l'ammoniac et lyophilisation pour la forme libre **G1** (EC).

Le tableau ci-dessous présente les conditions réactionnelles et les résultats des analyses effectuées sur les oligomères obtenus en fin de polymérisation, à savoir, le nombre de moles de C-Lys(TFA) engagés, le pourcentage d'acétonitrile présent lors de la polymérisation, le $\overline{DP_n}$ des oligomères synthétisés et le rendement en monomère de chaque réaction. Le $\overline{DP_n}$ **G1** (EC) a été calculé à partir des électrophérogrammes en utilisant la même formule que pour le calcul de $\overline{DP_n}$ **G1P** (MALDI), c'est-à-dire :

$$\overline{DP_n} = \frac{\Sigma \text{ (intensité du signal)}}{\Sigma \text{ (intensité du signal/DP)}}$$

nCAA (mmol)	% CH_3CN	$\overline{DP_n}$ **G1P** (MALDI)	$\overline{DP_n}$ **G1** (EC)	Rdt monomère (%)
1,75	0	7	7	38
1,75	18	7	7	75
1,81	50	8	8	49
0,88	62	10	9	76

Tableau 7 : Evolution du DP en fonction du taux d'acétonitrile dans le milieu réactionnel.

Dans ce tableau, nous observons que, conformément à ce que nous attendions, le $\overline{DP_n}$ des oligomères obtenus augmente avec le pourcentage d'acétonitrile. Nous constatons aussi que les $\overline{DP_n}$ calculés en fonction des spectres de masse et ceux calculés en fonction des électrophérogrammes sont en accord. L'effet de l'acétonitrile sur la taille des oligomères n'est visible qu'à partir de la polymérisation réalisée avec 50% d'acétonitrile. En dessous de cette valeur, soit à 18% d'acétonitrile, le $\overline{DP_n}$ observé est identique à celui d'une polymérisation

sans acétonitrile. Lorsque l'on passe d'un milieu réactionnel contenant 50% de CH_3CN à un milieu contenant 62% de ce solvant, nous voyons que le $\overline{DP_n}$ des oligomères augmente encore et passe de 8 à 10. La précipitation du bicarbonate de sodium dans le milieu réactionnel a rendu la polymérisation en présence de 90% d'acétonitrile impossible.

Lors des polymérisations que nous avons réalisées, nous avons constaté une dissolution plus ou moins rapide de notre NCA dans les milieux réactionnels contenant de l'acétonitrile. Toutefois, le milieu réactionnel contenant 50% d'acétonitrile et celui contenant 62% d'acétonitrile sont en réalité des systèmes biphasiques à 0°C. A température ambiante, les solutions aqueuses de bicarbonate de sodium 0,2 M contenant 18%, 50% et 62% d'acétonitrile sont parfaitement homogènes. Par contre, lorsque ces mélanges sont refroidis à 0°C, température à laquelle se déroule la polymérisation, nous observons l'apparition de deux phases uniquement pour les solutions contenant 50% et 62% d'acétonitrile. En effet, les travaux de plusieurs équipes[18-20] sur le système eau/acétonitrile s'accordent pour dire que ce mélange homogène à température ambiante devient biphasique à des températures inférieures à 0°C, pouvant aller jusqu'à -20°C, pour des mélanges ayant une fraction molaire en acétonitrile comprise entre 0,12 et 0,77. Ce phénomène n'est observable au minimum qu'à partir de -1,3°C[18,19] et pour un mélange eau/acétonitrile ayant une fraction molaire en acétonitrile de 0,35. La présence de bicarbonate de sodium à 0,2 M dans notre cas, augmente la température à laquelle intervient la démixtion par effet de sel. Chaque phase est ainsi composée d'un mélange des deux solvants : la phase supérieure est riche en acétonitrile et la phase inférieure est riche en eau.

D'autre part, l'analyse de nos échantillons par EC apporte de nouveaux éléments comme le montre la figure 16. Les échantillons à analyser ont été préparés à une concentration de 5 g/L dans un électrolyte acide à pH 2 et en présence d'imidazole (0,5 g/L) qui est un chromophore servant de marqueur. Du dextrane est rajouté à l'électrolyte afin d'améliorer la séparation des espèces. Le dextrane crée un gel dans le capillaire qui a pour effet d'accentuer la différence de mobilité électrophorétique entre les molécules de charges et de tailles différentes. Toutes les solutions ont été préparées dans l'eau ultra pure.

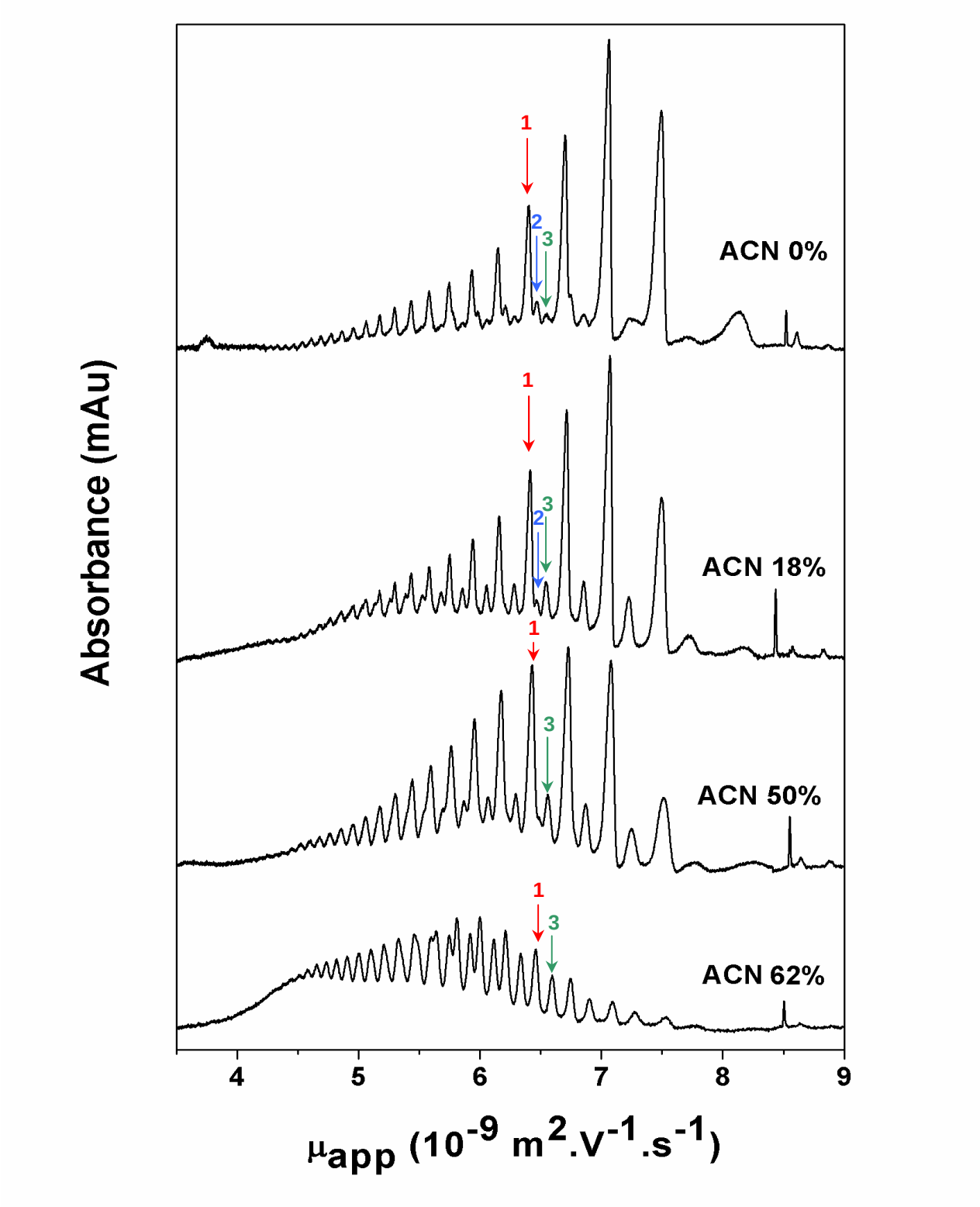


Figure 16 : Analyse par EC des oligomères déprotégés obtenus par polymérisation du Lys(TFA)-NCA en présence de 0, 18, 50 et 62 % d'acétonitrile. *Conditions électrophorétiques : capillaire de silice vierge, 50 cm (41,5 cm à la fenêtre de détection) x 50 µm. Electrolyte : tampon 125 mM NaH_2PO_4 / 125 mM H_3PO_4 (pH = 2) + 30 % Dextrane 40 000 Da. Tension appliquée : + 10 kV. Détection UV à 200 nm. Etalon interne : imidazole à 0,5 g/L.. Concentration de l'échantillon : 5 g/L.*

Dans la figure ci-dessus, nous avons superposé les électrophérogrammes correspondant à l'analyse des produits issus des polymérisations effectuées en présence d'acétonitrile. Sur ces électrophérogrammes, chaque pic correspond à un oligomère ayant une masse et une structure donnée. Plus un oligomère a un nombre important de motifs Lys, plus il est chargé et plus sa mobilité apparente (μ_{app}) est faible. Nous observons sur le premier électrophérogramme, correspondant à la polymérisation réalisée dans des conditions classiques, que trois familles d'oligomères sont présentes (chacune indiquées par une flèche). La famille 1, identifiée comme correspondant aux oligomères de lysine attendus $[Lys]_n$, est celle qui prédomine. La famille 2 est presque imbriquée dans la 1ère famille et très minoritaire, ce qui rend son identification extrêmement délicate. Enfin, la dernière famille d'oligomère est présente à l'état de traces. Lorsque le milieu réactionnel contient de l'acétonitrile, nous voyons qu'il ne reste plus que les oligomères de lysine (famille 1) et la 3e famille d'oligomères. Grâce à l'analyse par spectrométrie de masse des précipités déprotégés issus de ces polymérisations, nous avons pu identifier les oligomères correspondants à cette famille : ce sont des oligomères de lysine-amide. Ce type d'oligomères a par ailleurs été observé lors de l'analyse par EC/MS des oligomères issus de la polymérisation dans les conditions standards (cf. Figure 7, p.52). Nous rappelons que lors de la synthèse du NCA par nitrosation, il se forme une certaine quantité de *N*-nitroso CAA interne qui se dégrade dans l'étape de polymérisation du NCA. Ce composé en se dégradant forme notamment de l'acide isocyanique qui s'hydrolyse rapidement pour donner de l'ammoniac et du dioxyde de carbone (Schéma 36).

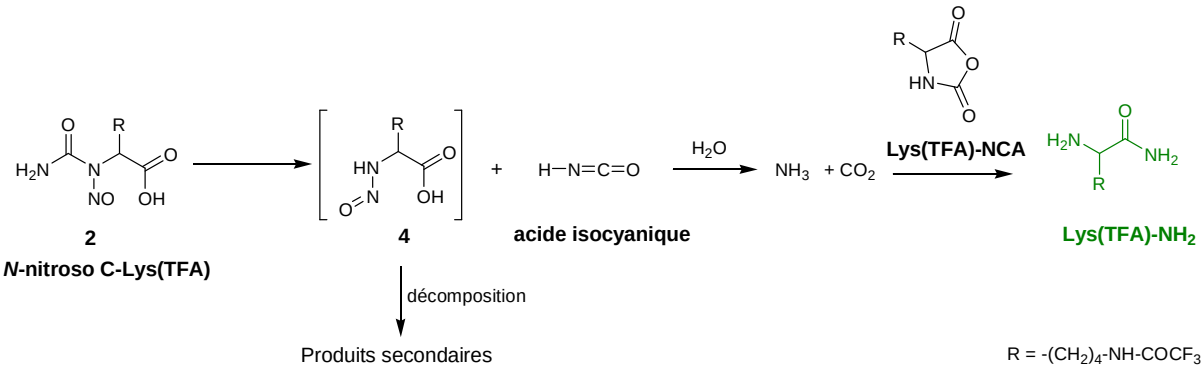


Schéma 36 : Dégradation du *N*-nitroso C-Lys(TFA) au cours de la polymérisation

Les oligomères lysine-amide proviennent vraisemblablement de l'attaque de l'ammoniac formé sur une molécule de NCA conduisant à un amide aminé (≤ 5%) qui peut réagir à son tour sur une autre molécule de NCA et ainsi de suite. Il y a une compétition entre l'amorçage

de la polymérisation par l'eau et par l'ammoniac (Schéma 37) qui est accrue par la présence d'acétonitrile.

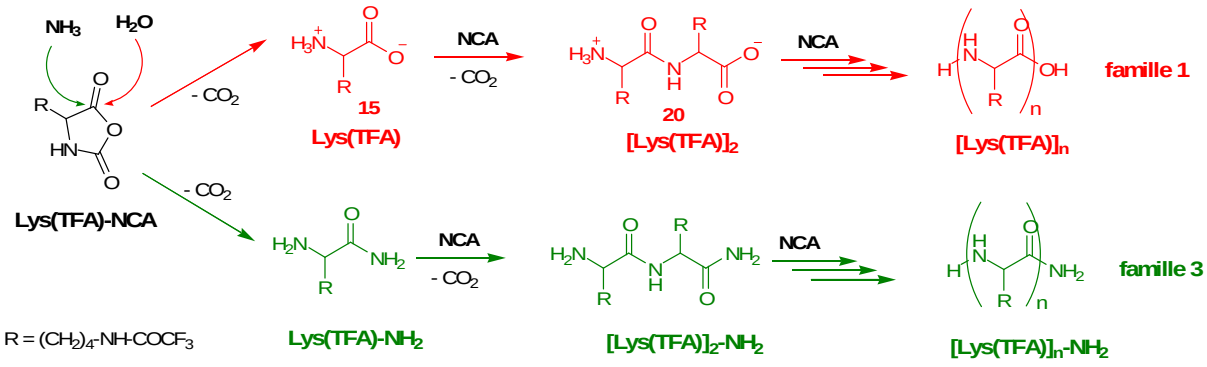


Schéma 37 : Initiation de la polymérisation par H_2O et NH_3

Dans un milieu de polymérisation aqueux, les oligomères lysine-amide sont presque inexistants mais dès lors que ce milieu contient un solvant organique, ils sont présents en plus grande proportion dans les précipités recueillis. L'explication vient du fait que lorsque la polymérisation est réalisée en présence d'acétonitrile, l'amide aminé de Lys(TFA) se retrouve dans un milieu où il est plus soluble par rapport au milieu réactionnel standard. De ce fait, il est plus à même de réagir avec d'autres molécules de NCA. Toutefois, en regardant attentivement les chromatogrammes correspondant aux polymérisations en présence d'acétonitrile, nous remarquons que l'intensité des pics des oligomères lysine-amide est quasiment constante. Nous constatons aussi, d'un chromatogramme à l'autre, qu'il y a un décalage du maximum des distributions des oligomères vers la gauche, c'est-à-dire vers les oligomères de degré de polymérisation plus importants. Ce décalage rejoint les résultats obtenus par MALDI où l'on voit le $\overline{DP_n}$ des oligomères évoluer dans le même sens que le taux d'acétonitrile présent dans le milieu de polymérisation (cf. Tableau 7). Ce phénomène s'accompagne aussi d'un élargissement des distributions. En effet, nous voyons que plus on augmente le taux d'acétonitrile, plus la distribution s'élargit. Cela se vérifie surtout entre 50% et 62% d'acétonitrile : le $\overline{DP_n}$ des oligomères augmente ainsi que la polydispersité. Par ailleurs, en observant le dernier chromatogramme, nous remarquons que les pics des distributions des oligomères sont de plus faibles intensités que ceux des chromatogrammes précédents. En calculant l'aire sous les pics pour chaque chromatogramme, nous nous apercevons que l'aire du dernier chromatogramme est nettement inférieure aux autres. Or, nous avons calculé, pour la polymérisation correspondante, un rendement en monomère équivalent à celui de la polymérisation avec 18% d'acétonitrile, soit 76% (cf. Tableau 7). Nous

pensons que ce rendement est très certainement surestimé compte tenu des aires calculés pour les chromatogrammes correspondants.

En somme, à travers nos expériences, nous avons vu que l'ajout d'acétonitrile dans le milieu de polymérisation induit une augmentation du $\overline{DP_n}$ des oligomères obtenus. Toutefois, cette augmentation n'est réellement visible, dans notre cas, qu'à partir de 50% d'acétonitrile dans le milieu réactionnel. Nous avons aussi vu que l'augmentation du $\overline{DP_n}$ s'accompagne d'une augmentation de la polydispersité des oligomères. L'électrophorèse capillaire a permis de mettre en évidence la présence d'oligomères de lysine-amide en plus des oligomères de lysine contenus dans les précipités recueillis. Si l'on considère l'ensemble des observations faites et des explications apportées, nous remarquons qu'à aucun moment, nous n'avons fait intervenir le fait que les milieux réactionnels contenant 50% et 62% d'acétonitrile à 0°C, sont biphasiques. Il semblerait qu'il y ait une continuité dans l'évolution du système en fonction du pourcentage d'acétonitrile, indépendamment de la démixtion du milieu de polymérisation. Cependant comme nous allons le voir, cette démixtion s'avère primordiale dans le cas de la polymérisation du Lys(TFA)-NCA dans un milieu contenant 50% d'acétonitrile avec une molécule fluorescente, **AM4**, comme amorceur.

II.3.2.1 Initiation de la polymérisation par AM4 en présence de 50% d'acétonitrile

Avant de réaliser la polymérisation, nous avons déterminé expérimentalement la solubilité de **AM4** dans les conditions de polymérisation c'est-à-dire dans une solution tampon CO_2/HCO_3^- 0,2 M contenant 50% d'acétonitrile à pH 6,5 et à 0°C. Dans de telles conditions, **AM4** a une solubilité de 2,5 g/L. Nous avons réalisé trois polymérisations dans le milieu réactionnel contenant 50% d'acétonitrile en utilisant **AM4** comme amorceur. Dans les deux premières, **AM4** est présent à des concentrations où il est très peu soluble dans le milieu réactionnel. Et, dans la dernière polymérisation, le milieu réactionnel est dilué de façon à ce qu'**AM4** soit soluble.

Dans le tableau ci-dessous, nous avons reporté les résultats obtenus avec **AM4** dans un milieu sans acétonitrile (cf. Tableau 2) en plus de ceux obtenus dans le milieu de polymérisation contenant 50% d'acétonitrile.

% CH_3CN	M/A	Facteur de dilution	$\overline{DP_n}$ **$G1P_{AM}$**	$\overline{DP_n}$ **G1P**	% d'oligomères amorcés[c]		Rdt monomère (%)	Rdt amorceur (%)
					MALDI	EC		
0	7	1	5	7	38	43	25	14
50	4	1	0	7	0	0	69	0
50	7	1	0	8	0	0	44	0
50	*7*	*4,8*	*7*	*7*	*76*	*45*	*8*	*1*

Tableau 8 : Amorçage de la polymérisation du Lys(TFA)-NCA par **AM4** avec et sans acétonitrile. Solubilité aqueuse = 0,054 g/L, calculée par le logiciel ALOGPS 2.1[1,2] ;solubilité dans une solution aqueuse de$NaHCO_3$ 0,2 M à 0°C contenant 50% d'acétonitrile = 2,5 g/L, déterminée expérimentalement.

Les résultats indiqués dans le tableau proviennent de l'analyse des précipités obtenus en fin de synthèse après un traitement classique c'est-à-dire après lavage et lyophilisation pour le MALDI et après déprotection des amines ε pour l'EC, sauf dans le dernier cas. En effet, la dilution du milieu réactionnel a rendu la récupération des oligomères plus difficile d'où le faible rendement.

Nous savons déjà qu'**AM4**, en dépit de sa très faible solubilité dans le milieu de polymérisation exempt d'acétonitrile, est capable d'amorcer la polymérisation du Lys(TFA)-NCA avec un pourcentage d'oligomères amorcés contenus dans le précipité d'environ 40% et un rendement en monomère de 25%. Lorsque le milieu réactionnel contient 50% d'acétonitrile et qu'il est suffisamment dilué, **AM4** est totalement en solution et se retrouve presque exclusivement dans la phase riche en eau. Dans ce système, il parvient à initier la polymérisation mais avec un très faible rendement. Par contre, dans la situation intermédiaire, c'est-à-dire dans un milieu réactionnel contenant 50% d'acétonitrile mais dans lequel **AM4** est très peu soluble, seule la réaction d'auto-amorçage se produit, et avec des rendements en monomère respectivement de 69% et 44%. Les résultats provenant du MALDI et de l'EC concernant ces expériences sont parfaitement en accord. Dans ce système, **AM4** se trouve en majeure partie sous forme de dépôt solide et le peu d'**AM4** solubilisé se trouve principalement dans la phase riche en eau. Il n'y a qu'extrêmement peu d'**AM4** dans la phase riche en acétonitrile contenant majoritairement du NCA. Cette répartition d'**AM4** dans le milieu réactionnel explique le fait que dans ce cas, les oligomères obtenus en fin de réaction sont tous des oligomères provenant de l'auto-amorçage de la réaction. Tandis que lorsque **AM4** est soluble dans le milieu réactionnel, il se retrouve principalement dans la phase riche en eau, mais il y est en plus grande quantité que dans la situation précédente. De ce fait, même

s'il n'est pas dans la même phase que le NCA, il est à même d'initier la polymérisation à l'interface eau/acétonitrile mais en très faible proportion.
Nous voyons à travers cet exemple, l'importance que revêt la démixtion du milieu réactionnel sur l'amorçage de la polymérisation. Selon la répartition amorceur/NCA dans le système biphasique, un amorceur est en mesure d'initier ou non la polymérisation.

II.4 Conclusion

Au travers du travail que nous avons réalisé, nous avons montré, dans un premier temps, que la polymérisation de Lys(TFA)-NCA en milieu aqueux peut être initiée par des amines primaires de différents types avec plus ou moins de succès, conduisant ainsi à des oligomères ayant toujours le même de degré de polymérisation moyen en nombre, et ce, quel que soit le rapport monomère/amorceur employé. Ensuite, à la lumière des travaux réalisés par Lahav *et al*., nous avons apporté une explication quant au mécanisme que suit cette polymérisation, en mettant en rapport la structuration secondaire des oligopeptides en croissance, la précipitation et le $\overline{DP_n}$ observé en fin de polymérisation. Toujours en relation avec ces travaux, nous avons effectué la polymérisation de Lys(TFA)-NCA en présence de taux variables d'acétonitrile, sans ajout d'amorceur, afin de solubiliser le NCA. Nous avons montré que l'ajout d'acétonitrile induit une augmentation du $\overline{DP_n}$ des oligomères ainsi qu'un élargissement de la distribution des masses moléculaires. Dans ces conditions, nous avons aussi mis en évidence l'influence des impuretés contenues dans le NCA préparé *in situ* par nitrosation, capables d'initier la polymérisation et conduisant à des oligomères de type lysine-amide. Enfin, à travers l'initiation de la polymérisation par un fluorophore très peu soluble dans l'eau, nous avons établit l'importance du phénomène de démixtion intervenant dans un milieu de polymérisation contenant 50% d'acétonitrile, à basse température. Dans ce milieu, Lys(TFA)-NCA et l'amorceur ne sont pas majoritairement dans la même phase, ce qui a pour conséquence de limiter fortement l'initiation de la polymérisation par le fluorophore, au profit de l'auto-amorçage.
En somme, le travail que nous avons mené autour de la modification de la 1ère génération via l'amorçage de la polymérisation nous a permis de démontrer que c'est une voie originale de synthèse qui nécessite, malgré tout, quelques améliorations.

Face aux résultats que nous avons obtenus, notamment avec l'acétonitrile, une optimisation du procédé de préparation des DGL pourrait être envisagée, en ajoutant une étape de purification du NCA, bien qu'elle soit toujours une étape délicate, ou en assurant un meilleur contrôle de la nitrosation (limiter les produits secondaires) conduisant à l'obtention du NCA.

Il reste aussi quelques questions en suspens comme la cinétique de formation des oligomères initiés par une amine primaire par rapport à celle des oligomères auto-amorcés : la formation de ces deux types d'oligomères se fait-elle de façon consécutive (les oligomères amorcés par une amine primaire puis les oligomères auto-amorcés) ou de manière simultanée, avec des vitesse différentes ?

L'étude cinétique de la polymérisation de Lys(TFA)-NCA en milieu aqueux, initiée par une amine primaire, permettrait d'assurer un meilleur contrôle de la polymérisation. D'autre part, l'insertion sur le DGL de composés très peu solubles dans le milieu de polymérisation comme les fluorophores est à approfondir. Une étude plus poussée permettrait d'élucider le mécanisme particulier que suit cette réaction du fait de la faible solubilité de l'initiateur. La polymérisation des NCA en milieu hydro-organique pourrait être un bon compromis permettant d'améliorer l'initiation de la polymérisation par ce type de composé.

Références bibliographiques

1. Tetko, I.; Gasteiger, J.; Todeschini, R.; Mauri, A.; Livingstone, D.; Ertl, P.; Palyulin, V.; Radchenko, E.; Zefirov, N.; Makarenko, A.; Tanchuk, V.; Prokopenko, V. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2005,** *19*, 453-463.
2. VCCLAB. *Virtual Computational Chemistry Laboratory, http://www.vcclab.org* **2005**.
3. Klonis, N.; Sawyer, W. H. *Journal of Fluorescence* **1996,** *6*, 147-157.
4. Klonis, N.; Sawyer, W. H. *Photochemistry and Photobiology* **2000,** *72*, 179-185.
5. Gao, J.; Wang, P.; Giese, R. W. *Analytical Chemistry* **2002,** *74*, 6397-6401.
6. Nguyen, T.; Francis, M. B. *Organic Letters* **2003,** *5*, 3245-3248.
7. Lohse, J.; Nielsen, P. E.; Harrit, N.; Dahl, O. *Bioconjugate Chemistry* **1997,** *8*, 503-509.
8. Adamczyk, M.; Grote, J.; Moore, J. A. *Bioconjugate Chemistry* **1999,** *10*, 544-547.
9. Burchak, O. N.; Mugherli, L.; Chatelain, F.; Balakirev, M. Y. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006,** *14*, 2559-2568.
10. Hirano, T.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Higuchi, T.; Nagano, T. *Journal of the American Chemical Society* **2000,** *122*, 12399-12400.
11. Kim, T. W.; Yoon, H. Y.; Park, J.-h.; Kwon, O.-H.; Jang, D.-J.; Hong, J.-I. *Organic Letters* **2005,** *7*, 111-114.
12. Collet, H.; Bied, C.; Mion, L.; Taillades, J.; Commeyras, A. *Tetrahedron Letters* **1996,** *37*, 9043-9046.
13. Nery, J. G.; Eliash, R.; Bolbach, G.; Weissbuch, I.; Lahav, M. *Chirality* **2007,** *19*, 612-624.
14. Eliash, R.; Nery, Jose G.; Rubinstein, I.; Clodic, G.; Bolbach, G.; Weissbuch, I.; Lahav, M. *Chemistry - A European Journal* **2007,** *13*, 10140-10151.
15. Rubinstein, I.; Eliash, R.; Bolbach, G.; Weissbuch, I.; Lahav, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2007,** *46*, 3710-3713.
16. Rubinstein, I.; Clodic, G.; Bolbach, G.; Weissbuch, I.; Lahav, M. *Chemistry - A European Journal* **2008,** *14*, 10999-11009.
17. Weissbuch, I.; Illos, R. A.; Bolbach, G. r.; Lahav, M. *Accounts of Chemical Research* **2009,** *42*, 1128-1140.

18. Hürth, M.; Woermann, D. *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics* **1987,** *91*, 614-616.

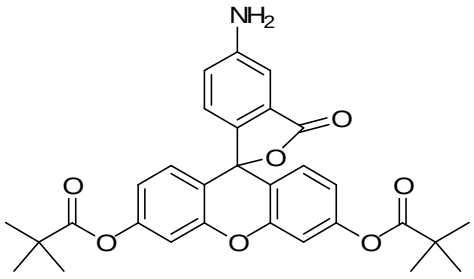
19. Pence, D. N.; Gu, T. *Separations Technology* **1996,** *6*, 261-264.

20. Szydlowski, J.; Szykula, M. *Fluid Phase Equilibria* **1999,** *154*, 79-87.

Partie expérimentale

Les spectres RMN ^{1}H ont été enregistrés à 200 MHz sur appareil BRUKER DPX 200 et à 300 MHz sur un appareil Bruker Avance 300. Les spectres RMN ^{13}C et ^{19}F ont aussi été enregistrés sur ce dernier. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm. Les spectres de masse ESI ont été effectués sur un appareil Microman Q-Tof et les spectres de masses MALDI-TOF sur un BRUKER Ultraflex. Les analyses par électrophorèse capillaire ont été réalisées sur un appareil Agilent EC muni d'un détecteur UV à barette de diodes. Les analyses par LC/MS ont été effectuées sur un appareil Waters 2790 Separations Module muni d'un détecteur UV Waters 996 Photodiode Array Detector. La colonne utilisée est une Hypersil C18 50x2,1 mm 3µm.

2-(3,6-bis(pivaloyloxy))-5-aminofluorescéine (AM3a)



MM = 515,55 g/mol

Dans un monocol de 50 mL, sont introduits la fluorescéinamine **AM3** (540 mg, 1,57 mmol) dissoute dans 11 mL de DMF ainsi que du carbonate de césium (1,125 g, 3,45 mmol) suivi d'anhydride pivalique (0,69 mL, 3,4 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante (suivi CCM : CH_2Cl_2/MeOH 95/5). Au bout d'1h, on ajoute dans le milieu 172,5 µL (0,85 mmol) d'anhydride pivalique supplémentaire pour consommer la fluorescéinamine qui n'a pas réagit. Après 15 min d'agitation, les sels de césium sont filtrés et le filtrat est concentré sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice. Eluant : CH_2Cl_2/MeOH (100/0 – 98/2). Nous obtenons un mélange contenant le produit recherché ainsi que 5% de fluorescéinamine sous forme ouverte (fluorescente) protégée sur un phénol et sur l'amine par l'anhydride pivalique.

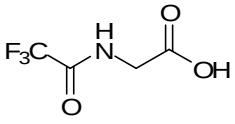
Rendement : 86 % (696 mg), pureté : 95%

ESI-MS (+) : $[M+H]^+$: 516,3 ; $[M+H]^+$: fluo forme ouverte diprotégée : 600,4

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 1,24 (18H, s, CH_3); 5,9 (2H, s large, NH_2); 6,65-7,09 (9H, m, $H_{aromatiques}$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 26,02 (CH_3); 38,14 ($\underline{C}(CH_3)_3$); 80,66; 107,33; 109,12; 116,09 (fluo forme ouverte); 116,60 (fluo forme ouverte); 121,52; 123,44; 126,59; 128,03; 140,91; 148,13; 150,70; 151,42; 161,95 (C=O lactone); 168,72 ($(CH_3)_3C\underline{C}$=O); 175,58 (NHC=O); 181,90 (C=O fluo forme ouverte).

<u>*N*-trifluoroacétyl-glycine</u> (TFA-Gly)



MM = 171,07 g/mol

Dans un monocol de 50 mL, sont introduits de la glycine (1,21g, 16 mmol) dissoute dans 6 mL de MeOH, puis une solution méthanolique de méthanolate de sodium à 1,025 M (12,7 mL, 13 mmol) et enfin du trifluoroacétate d'éthyle (3,1 mL, 26 mmol). Le milieu est chauffé à 40°C sous agitation pendant 2h (suivi CCM : CH_2Cl_2/MeOH (70/30) + 1% d'acide acétique, révélateur : ninhydrine). Le mélange réactionnel est ensuite évaporé à sec et repris avec 20 mL de $KHSO_4$ 10%. La phase aqueuse est extraite avec 4x50 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées puis lavées avec 2x20 mL de saumure, séchées avec du Na_2SO_4 anhydre et enfin concentrées sous vide pour donner la glycine *N*-trifluoroacétylée.

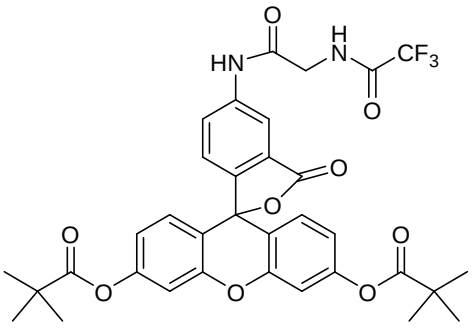
Rendement : 92 % (2,52 g)

RMN ^{1}H ($DMSO_{d6}$, 300 MHz) δ = 3,95 (2H, d, J = 5,95 Hz, CH_2); 9,85 (1H, t, J = 5,2 Hz, NH); 13 (1H, s large, CO_2H).

RMN ^{13}C ($DMSO_{d6}$, 75 MHz) δ = 40,77 (CH_2); 115 (q, CF_3); 156,73 (q, $CF_3\underline{C}$=O); 169,54 (C=O)

RMN ^{19}F ($DMSO_{d6}$, 282 MHz) δ = -74,46

2-(3,6-bis(pivaloyloxy))-5-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)acetamido)fluorescéine (AM3b)



MM = 668,61 g/mol

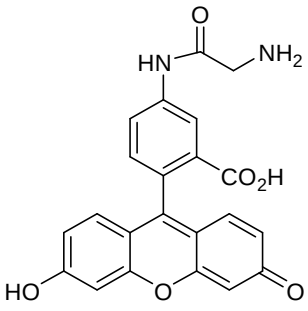
Dans un monocol de 50 mL, sont introduits **AM3a** (360 mg, 0,7 mmol) dissout dans 5,4 mL de THF ainsi que la *N*-trifluoroacétyl-glycine (144 mg, 0,84 mmol), suivi d'EDC (228 mg, 1,19 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante (suivi CCM : CH_2Cl_2/MeOH (95/5) + 1% d'acide acétique). Au bout de 17h de réaction, 20 mL AcOEt sont ajoutés au milieu réactionnel. La phase organique est alors lavée avec 3x10 mL de $KHSO_4$ 5% puis 10 mL de saumure. La phase organique est séchée avec du Na_2SO_4 anhydre et concentrée sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice. Eluant : AcOEt/hexane (30/70 – 95/5)

Rendement : 62 % (290 mg)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 200 MHz) δ = 1,26 (18H, s, CH_3); 4,11 (2H, m, CH_2); 6,70-7,04 (7H, m, $H_{aromatiques}$); 7,77-7,80 (2H, m, $H_{aromatiques}$); 8,19 (1H, s, NH); 9,27 (1H, s, NH).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 26,02 (CH_3); 38,19 ($\underline{C}(CH_3)_3$); 42,38 (CH_2); 81,48; 107,33; 109,12; 115 (q, CF_3); 121,52; 123,44; 126,59; 128,03; 140,91; 148,13; 150,67; 151,69; 156,73 (q, $CF_3\underline{C}$=O); 161,95 (C=O lactone); 164,58 ($(CH_3)_3C\underline{C}$=O); 175,70 (NHC=O).

5-(aminoacétamido)fluorescéine (AM4)



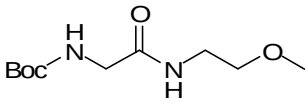
MM = 404,38 g/mol

Dans un ballon de 25 mL, sont introduits le **AM3b** (200 mg; 0,43 mmol) et 5 mL d'une solution de NH_3 28%/H_2O/MeOH (28/56/16). Le mélange est chauffé à 40°C et maintenu sous agitation pendant une nuit. Le brut réactionnel est concentré partiellement sous vide pour chasser l'ammoniac puis le résidu est lyophilisé. Rendement quantitatif (174 mg).

ESI-MS (+) : $[M+H]^+$: 405,1

RMN ^{1}H ($DMSO_{d6}$, 300 MHz) δ = 3,6 (2H, m, CH_2); 5,15 (2H, s large, NH_2); 6,57-7,01 (7H, m, $H_{aromatiques}$); 7,72-7,81 (2H, m, $H_{aromatiques}$)7,98 (1H, s, OH); 8,08 (1H, s, NH); 10,99 (1H, s large, CO_2H).

2-(2-méthoxyéthylamino)-2-oxoéthylcarbamate de *tert*-butyle (AM5a)



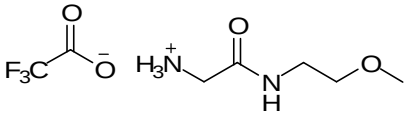
MM = 232,28 g/mol

Dans un monocol de 100 mL, sont introduits la Boc-glycine (1,52 g ; 8,48 mmol) et la DCC (1,84 g ; 8,92 mmol) en solution dans 5 mL de dichlorométhane. Puis, la 2-méthoxyéthylamine **AM5** (0,82 mL ; 9,43 mmol) est ajoutée au mélange. Le milieu réactionnel est agité pendant 4h à température ambiante. La suspension est alors filtrée et le filtrat est concentré sous pression réduite. Le brut réactionnel est repris avec 50 mL d'AcOEt et la solution est lavée avec 10 mL de $KHSO_4$ 10%, puis 10 mL de Na_2CO_3 10% et enfin 10 mL d'eau. Chaque phase aqueuse est extraite avec 50 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, séchées avec Na_2SO_4 anhydre et filtrées. Le filtrat est alors concentré sous vide. Le résidu purifié par chromatographie sur colonne de silice. Eluant : CH_2Cl_2/MeOH (10/0,5) + quelques gouttes d'acide acétique glacial.

Rendement : 44% (867 mg)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 200 MHz) δ = 1,4 (9H, s, CH_3); 3,27 (3H, s, O-CH_3); 3,35 (4H, m, O-CH_2CH_2); 3,72 (2H, d, CH_2C=O); 5,51 (1H, s, NH); 6,78 (1H, s, NH)
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 26,03 (C-$\underline{C}H_3$); 38,67 (CH_2NH); 40,26 ($\underline{C}H_2C$=O); 58,62 (CH_3); 69,98 (CH_2O); 79,4 ($\underline{C}$-CH_3); 155,9 (OC=O); 167,07 (C=O)

2,2,2-trifluoroacétate de 2-(2-méthoxyéthylamino)-2-oxoéthanammonium AM7



MM = 246,18 g/mol

Dans un ballon de 50 mL, sont introduits **AM5a** (840 mg, 3,62 mmol) et 8 mL de d'acide trifluoroacétique. Le milieu est placé sous agitation pendant quelques heures. 10 mL d'eau sont alors ajoutés au mélange et cette solution est extraite avec 50 mL d'Et_2O. La phase aqueuse est extraite plusieurs fois avec 20 mL d'Et_2O jusqu'à ce qu'elle ne contienne plus de TFA (suivi CCM : CH_2Cl_2/MeOH/NH_3 28% 5/3/1, révélateur : ninhydrine). Après le dernier lavage, la phase aqueuse est concentrée sous vide pour conduire au composé déprotégé.
RMN ^{1}H (D_2O, 300 MHz) δ = 3,21 (3H, s, CH_3); 3,29 (2H, t, J = 5,14 Hz, OCH_2); 3,42 (2H, t, J = 5,26 Hz, $C\underline{H}_2NH$); 3,66 (2H, s, CH_2C=O)
RMN ^{13}C (D_2O, 75 MHz) δ = 38,88 (CH_2NH); 40,41 ($\underline{C}H_2C$=O); 57,92 (CH_3); 70,13 (CH_2O); 116,14 (q, CF_3); 162,76 (q, $CF_3\underline{C}$=O); 166,98 (C=O)

Analyses par EC

- Electrolyte 1 : tampon Tris 125 mM / H_3PO_4 250 mM, pH 2

Préparation : 3,79 g (31,29 mmol) de Tris (ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol) ainsi que 7,3 g (62,57 mmol) d'H_3PO_4 84% sont introduits dans une fiole jaugée de 250 mL. La fiole est complétée avec de l'eau ultra-pure jusqu'au trait de jauge.

- Electrolyte 2 : tampon phosphate 250 mM, pH 2

Préparation : 868 µL (12,5 mmol) d'H_3PO_4 84% ainsi que 1,5 g (12,5 mmol) de NaH_2PO_4,H_2O dans une fiole jaugée de 100 mL. La fiole est complétée avec de l'eau ultra-pure jusqu'au trait de jauge.

- Electrolyte 3 : tampon phosphate 250 mM, pH 2 + 30% de Dextrane 40 000 Da

Préparation : 3 g de Dextrane 40 000 Da sont ajoutés à 10 mL de l'électrolyte 2.

A ces électrolytes, est ajouté 0,5 g/L d'imidazole (5 mg pour 10 mL d'électrolyte) comme marqueur de position.

Les échantillons à analyser sont préparés à une concentration de 5 g/L (5 mg dans 1 mL d'électrolyte).

Conditions expérimentales :

Capillaire utilisé : silice vierge 50 cm (41,5 cm jusqu'au détecteur) x 50 µm d.i

Tension appliquée : + 20kV (électrolyte sans Dextrane) ou + 10 kV (électrolyte avec Dextrane)

Injection hydrodynamique : 50 mbar, 16 s

Détection UV : 200 nm pour $\mathbf{G1_{AM5\text{-}8}}$, 200 nm et 254 nm pour $\mathbf{G1_{AM1}}$, 200 nm et 450 nm pour $\mathbf{G1_{AM3\text{-}4}}$.

Température : 25°C.

Rinçage du capillaire entre les analyses :

Séparation en milieu libre (sans Dextrane) : 5 min avec électrolyte 1

Séparation sur gel : 5 avec électrolyte 2, puis 30 min avec électrolyte 3

Tous les échantillons sont analysés en milieu libre avec l'électrolyte 1. Seuls les échantillons provenant des polymérisations en milieu acétonitrile/eau sans **AM4** sont analysés sur gel avec l'électrolyte 3.

Analyse par MALDI-TOF des oligomères déprotégés

Les échantillons sont préparés dans une matrice CHCA (acide α-cyano-4-hydroxycinnamique) à une concentration de 10 g/L dans CH_3CN/H_2O.

Analyse par LC/MS des surnageants

Éluant H_2O/CH_3CN (0,05% TFA dans chaque solvant) ; gradient 80/20 – 50/50 en 35 min. Détection UV à 214 nm.

Procédure générale de synthèse de DGL amorcés par une amine

Etape 1 : Le N^{ε}-TFA-N^{α}-carbamoyl-L-lysine, (**C-Lys(TFA)**), fourni gracieusement par COLCOM, est introduit dans un ballon bicol qui est ensuite mis sous vide à l'aide d'une

pompe à palette puis refroidi à 0°C par un bain de glace. Cette température est maintenue tout au long du processus de synthèse.

Etape 2 : L'acétonitrile, solvant de la réaction (1 mL/250 mg **C-Lys(TFA)**), est introduit dans le ballon à l'aide d'une seringue. Le **C-Lys(TFA)** est insoluble dans ce solvant.

Etape 3 : Le monoxyde d'azote est additionné à son tour par une seringue dans le milieu réactionnel sous agitation.

Etape 4 : De petites fractions d'oxygène, de volumes décroissants, sont ajoutées dans le ballon toutes les 5 minutes pendant 1h : le NCA de N^{ε}-TFA-N^{α}-carbamoyl-L-lysine, (**Lys(TFA)-NCA**), soluble dans l'acétonitrile, se forme au fur et à mesure des ajouts d'O_2.

Etape 5 : Après le dernier ajout d'oxygène, le milieu réactionnel reste sous agitation encore 45 minutes puis il est évaporé à sec pour donner le Lys(TFA)-NCA sous forme solide.

Etape 6 : À ce résidu, est ajoutée rapidement une solution de $NaHCO_3$ 0,2 M contenant l'amorceur **AM**, refroidie à 0°C et dans laquelle on a fait buller du CO_2 pour avoir un pH de 6,5. Au bout de 10 min, il apparaît une émulsion blanchâtre.

Etape 7 : La polymérisation se poursuit dans le bicol bouché hermétiquement pendant une nuit à basse température.

Etape 8 : Après une nuit de réaction, le milieu réactionnel est centrifugé. Le surnageant est mis de côté et le précipité est lavé plusieurs fois avec de le minimum d'eau. Enfin, le solide est transvasé dans un ballon puis lyophilisé. Ce solide est composé de $\mathbf{G1_{AM}P}$ si un amorceur a été utilisé et/ou de **G1P**.

Etape 9 : Une fois sec, le résidu est mis en suspension dans une solution ammoniacale de MeOH/H_2O (4/1) à 40°C pendant une nuit afin de déprotéger les amines des chaînes latérales des oligomères (1,25 mL/50 mg de précipité).

Etape 10 : Au bout d'une nuit, le milieu devient limpide. Il est partiellement évaporé sous vide afin d'éliminer l'ammoniac, puis lyophilisé.

Nous obtenons au final un solide blanc soluble dans l'eau, composé de $\mathbf{G1_{AM}}$ si un amorceur a été utilisé et/ou de **G1**.

- Polymérisation de Lys(TFA)-NCA avec et sans amorceur

Liste des amorceurs utilisés : **AM1** : sel de chlorure de l'ester méthylique de phénylalanine ; **AM2** : sel de chlorure de glucosamine ; **AM3** : fluorescéinamine ; **AM4** : 5-(aminoacétamido)fluorescéine ; **AM5** : 2-méthoxyéthylamine ; **AM6** : 2,2-

diméthoxyéthylamine ; **AM7** : sel de trifluoroacétate de 2-amino-*N*-(2-méthoxyéthyl)acétamide ; **AM8** : 14-amino-3,6,9,12-tétraoxatétradécan-1-oate de *tert*-butyle.

Amorçage 1

C-Lys(TFA) (500 mg, 1,75 mmol); NO (72 mL, 3,21 mmol); O_2 (16 mL, 0,71 mmol); $NaHCO_3$ 0,2M (10 mL); durée de nitrosation 70 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 150 mg; masse de surnageant : 380 mg ; $\overline{DP_n}$ **G1P** = 7; rendement précipité: 30%; rendement monomère: 38%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): $2Na^+$, $[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 5 à 14) m/z = 1183,3 ; 1407,4 ; 1631,5 ; 1855,5 ; 2079,6 ; 2303,7 ; 2527,8 ; 2751,8 ; 2976,0 ; 3200,1.

Amorçage 2

C-Lys(TFA) (502 mg, 1,76 mmol); NO (100 mL, 4,46 mmol); O_2 (19 mL, 0,85 mmol); **AM1** (49 mg, 0,23 mmol, M/A = 8) ; $NaHCO_3$ 0,2M (8 mL); durée de nitrosation 60 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 240 mg; masse de surnageant : 150 mg ; $\overline{DP_n}$ $\mathbf{G1}_{AM1}P$ = 5; % oligomères amorcés (MALDI) : 100 ; rendement précipité: 48%; rendement monomère: 52% ; rendement amorceur : 80%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): Na^+, **AM1**-$[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 3 à 13) m/z = 874,3 ; 1098,4 ; 1322,4 ; 1546,5 ; 1770,6 ; 1994,6 ; 2218,7 ; 2442,8 ; 2666,9 ; 2891,0 ; 3115,1

Analyse surnageant par LC/MS Produits identifiés : hydroxy-Lys(TFA), Lys(TFA) insaturée, $[Lys(Tfa)]_n$ (n = 1, 2, 4), $[Lys(Tfa)]_n$ amide (n = 2), $[C\text{-}Lys(Tfa)]_n$ (n = 1, 3), **AM1**-$[C\text{-}Lys(Tfa)]_n$ (n = 1).

Amorçage 3

C-Lys(TFA) (1250 mg, 4,39 mmol); NO (180 mL, 8,04 mmol); O_2 (40 mL, 1,79 mmol); **AM2** (253 mg, 1,17 mmol, M/A = 4) ; $NaHCO_3$ 0,2M (25 mL); durée de nitrosation 70 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 310 mg; $\overline{DP_n}$ **G1P** = 5 ; $\overline{DP_n}$ $\mathbf{G1_{AM2}P}$ = 6; % oligomères amorcés (MALDI) : 96 ; rendement précipité: 25%; rendement monomère: 27% ; rendement amorceur : 19%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): Na^+, **AM2**-$[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 4 à 10) m/z = 1098,4 ; 1322,5 ; 1546,6 ; 1770,6 ; 1994,7 ; 2218,8 ; 2442,8. $[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 5 à 7) m/z = 1161,4 ; 1385,5 ;1609,5.

Amorçage 4

C-Lys(TFA) (250 mg, 0,88 mmol); NO (36 mL, 1,61 mmol); O_2 (8 mL, 0,36); **AM2** (27 mg, 0,125 mmol, M/A = 7) ; $NaHCO_3$ 0,2M (5 mL); durée de nitrosation 60 min; durée polymérisation 4h.

masse précipité: 60 mg; masse surnageant : 90 mg ; $\overline{DP_n}$ **G1P** = 6 ; $\overline{DP_n}$ $\mathbf{G1_{AM2}P}$ = 6; % oligomères amorcés (MALDI) : 96 ; rendement précipité: 24%; rendement monomère: 26% ; rendement amorceur : 35%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): Na^+, **AM2**-$[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 3 à 12) m/z = 874,3 ; 1098,4 ; 1322,5 ; 1546,6 ; 1770,6 ; 1994,7 ; 2218,8 ; 2442,8 ; 2666,9 ; 2891,0. $[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 5 à 7) m/z = 1161,4 ; 1385,5 ;1609,5.

Amorçage 5

C-Lys(TFA) (540 mg, 1,89 mmol); NO (72 mL, 3,21 mmol); O_2 (16 mL, 0,71 mmol); **AM2** (38 mg, 0,176 mmol, M/A = 11) ; $NaHCO_3$ 0,2M (10 mL); durée de nitrosation 70 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 180 mg; masse surnageant : 300 mg ; $\overline{DP_n}$ **G1P** = 7 ; $\overline{DP_n}$ $\mathbf{G1_{AM2}P}$ = 6; % oligomères amorcés (MALDI) : 72 ; rendement précipité: 33%; rendement monomère: 39% ; rendement amorceur : 48%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): Na^+, **AM2**-$[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 4 à 11) m/z = 1098,4 ; 1322,5 ; 1546,6 ; 1770,6 ; 1994,7 ; 2218,8 ; 2442,8 ; 2666,9. $[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 6 à 9) m/z = 1385,5 ;1609,5 ; 1833,6 ;2057,7.

Amorçage 6

C-Lys(TFA) (5000 mg, 17,54 mmol); NO (1000 mL, 44,6 mmol); O_2 (190 mL, 8,48 mmol); **AM3** (573 mg, 1,65 mmol, M/A = 11) ; $NaHCO_3$ 0,2M (80 mL); durée de nitrosation 60 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 2480 mg; % oligomères amorcés (EC) : 26 ; rendement précipité: 50%; rendement monomère: 39% ; rendement amorceur : 48%

Amorçage 7

C-Lys(TFA) (125 mg, 0,44 mmol); NO (18 mL, 0,8 mmol); O_2 (4 mL, 0,18 mmol); **AM4** (25 mg, 0,062 mmol, M/A = 7) ; $NaHCO_3$ 0,2M (2,5 mL); durée de nitrosation 70 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 28 mg; masse surnageant : 14 mg ; $\overline{DP_n}$ **G1P** = 6 ; $\overline{DP_n}$ $\mathbf{G1_{AM4}P}$ = 5; % oligomères amorcés (EC) : 43 ; rendement précipité: 22%; rendement monomère: 25% ; rendement amorceur : 14%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): Na^+, **AM4**-$[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 3 à 9) m/z = 1099,3 ; 1323,4 ; 1547,4 ; 1771,5 ; 1995,6 ; 2219,7 ; 2443,7. $[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 5 à 13) m/z = 1161,4 ; 1385,5 ;1609,5 ;1833,6 ; 2056,6 ; 2280,7 ; 2504,8 ; 2728,9 ; 2954,0.

Amorçage 8

C-Lys(TFA) (500 mg, 1,75 mmol); NO (72 mL, 3,21 mmol); O_2 (16 mL, 0,71 mmol); **AM5** (40 µL, 0,45 mmol, M/A = 4) ; $NaHCO_3$ 0,2M (10 mL); durée de nitrosation 70 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 90 mg; masse surnageant : 510 mg ; $\overline{DP_n}$ **G1P** = 6 ; $\overline{DP_n}$ $\mathbf{G1_{AM5}P}$ = 4; % oligomères amorcés (MALDI) : 97 ; rendement précipité: 18%; rendement monomère: 21% ; rendement amorceur : 20%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): Na^+, **AM5**-$[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 3 à 12) m/z = 770,3 ; 994,4 ; 1218,5 ; 1442,6 ; 1666,6 ; 1890,7 ; 2114,8 ; 2338,8 ; 2562,9 ; 2787,0. Na^+, $[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 6 à 10) m/z = 1385,5 ;1609,5 ;1833,6 ; 2057,6 ; 2281,8.

Amorçage 9

C-Lys(TFA) (500 mg, 1,75 mmol); NO (72 mL, 3,21 mmol); O_2 (16 mL, 0,71 mmol); **AM5** (20 µL, 0,23 mmol, M/A = 8) ; $NaHCO_3$ 0,2M (10 mL); durée de nitrosation 70 min; durée polymérisation 36h.

masse précipité: 196 mg; masse surnageant : 249 mg ; $\overline{DP_n}$ **G1P** = 6 ; $\overline{DP_n}$ $\mathbf{G1_{AM5}P}$ = 5,5; % oligomères amorcés (MALDI) : 92 ; rendement précipité: 39%; rendement monomère: 47% ; rendement amorceur : 65%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): Na^+, **AM5**-$[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 3 à 11) m/z = 770,3 ; 994,4 ; 1218,5 ; 1442,6 ; 1666,6 ; 1890,7 ; 2114,8 ; 2338,8 ; 2562,9. Na^+, $[C\text{-}Lys(Tfa)]_n$ (de n = 5 à 8) m/z = 1204,4 ; 1428,5 ; 1652,5 ; 1876,6.

Analyse surnageant par LC/MS Produits identifiés : Lys(Tfa) insaturée, $[Lys(Tfa)]_n$ (n = 1, 2, 3, 4), $[Lys(Tfa)]_n$ amide (n = 2), $[C\text{-}Lys(Tfa)]_n$ (n = 2, 4, 5), $[C\text{-}Lys(Tfa)]_n$ amide (n = 4), **AM5**-$[Lys(Tfa)]_n$ (n = 2, 4), **AM5**-$[C\text{-}Lys(Tfa)]_n$ (n = 2, 5)

Amorçage 10

C-Lys(TFA) (500 mg, 1,75 mmol); NO (100 mL, 4,46 mmol); O_2 (19 mL, 0,85 mmol); **AM6** (25 µL, 0,23 mmol, M/A = 8) ; $NaHCO_3$ 0,2M (8 mL); durée de nitrosation 60 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 120 mg; $\overline{DP_n}$ **G1$_{AM6}$P** = 4; % oligomères amorcés (MALDI) : 100 ; rendement précipité: 24%; rendement monomère: 27% ; rendement amorceur : 52%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): Na^+, **AM6**-$[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 2 à 9) m/z = 576,1 ; 800,3 ; 1024,4 ; 1248,4 ; 1472,5 ; 1696,6 ; 1921,7 ; 2144,7

Amorçage 11

C-Lys(TFA) (504 mg, 1,77 mmol); NO (72 mL, 3,21 mmol); O_2 (16 mL, 0,71 mmol); **AM7** (107 mg, 0,43 mmol, M/A = 4) ; $NaHCO_3$ 0,2M (10 mL); durée de nitrosation 70 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 43 mg; masse surnageant : 470 mg ; $\overline{DP_n}$ **G1$_{AM7}$P** = 4,5; % oligomères amorcés (MALDI) : 100 ; rendement précipité: 9%; rendement monomère: 10% ; rendement amorceur : 9%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): Na^+, **AM7**-$[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 3 à 9) m/z = 827,3 ;1051,4 ; 1275,4 ; 1499,5 ; 1723,6 ; 1947,7 ; 2171,7.

Analyse surnageant par LC/MS Produits identifiés : $[Lys(Tfa)]_n$ (n = 2), $[C\text{-}Lys(Tfa)]_n$ (n = 1, 4), **AM7**-$[Lys(Tfa)]_n$ (n = 2, 3), **AM7**-$[C\text{-}Lys(Tfa)]_n$ (n = 1, 2, 3)

Amorçage 12

C-Lys(TFA) (509 mg, 1,79 mmol); NO (72 mL, 3,21 mmol); O_2 (16 mL, 0,71 mmol); **AM7** (60 mg, 0,24 mmol, M/A = 8) ; $NaHCO_3$ 0,2M (10 mL); durée de nitrosation 70 min; durée polymérisation 48h.

masse précipité: 125 mg; masse surnageant : 266 mg ; $\overline{DP_n}$ **G1P** = 6 ; $\overline{DP_n}$ **G1$_{AM7}$P** = 5; % oligomères amorcés (MALDI) : 99 ; rendement précipité: 25%; rendement monomère: 28% ; rendement amorceur : 41%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): Na^+, **AM7**-$[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 3 à 11) m/z = 827,3 ;1051,4 ; 1275,4 ; 1499,5 ; 1723,6 ; 1947,7 ; 2171,7 ; 2395,8 ; 2619,9. $2Na^+$, $[Lys(Tfa)]_n$ (n = 6) m/z = 1407,4.

Analyse surnageant par LC/MS_Produits identifiés : $[Lys(Tfa)]_n$ (n = 2, 3), $[Lys(Tfa)]_n$ amide (n = 3), $[C\text{-}Lys(Tfa)]_n$ (n = 3), **AM7**-$[Lys(Tfa)]_n$ (n = 6)

Amorçage 13

C-Lys(TFA) (501 mg, 1,76 mmol); NO (72 mL, 3,21 mmol); O_2 (16 mL, 0,71 mmol); **AM8** (132 mg, 0,43 mmol, M/A = 4) ; $NaHCO_3$ 0,2M (10 mL); durée de nitrosation 70 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 79 mg; masse surnageant : 160 mg ; $\overline{DP_n}$ **G1P** = 6 ; $\overline{DP_n}$ $\mathbf{G1_{AM8}P}$ = 5; % oligomères amorcés (EC) : 90 ; rendement précipité: 16%; rendement monomère: 16% ; rendement amorceur : 12%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): Na^+, **AM8**-$[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 4 à 7) m/z = 1226,5 ; 1450,6 ; 1674,7 ; 1898,8. K^+, $[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 5 à 12) m/z = 1177,0 ; 1401,0 ; 1625,1 ; 1849,1 ; 2073,1 ; 2297,1 ; 2521,2 ; 2745,3.

Amorçage 14

C-Lys(TFA) (510 mg, 1,79 mmol); NO (72 mL, 3,21 mmol); O_2 (16 mL, 0,71 mmol); **AM8** (77 mg, 0,25 mmol, M/A = 8) ; $NaHCO_3$ 0,2M (10 mL); durée de nitrosation 70 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 68 mg; masse surnageant : 340 mg ; $\overline{DP_n}$ **G1P** = 6 ; $\overline{DP_n}$ $\mathbf{G1_{AM8}P}$ = 5; % oligomères amorcés (EC) : 92 ; rendement précipité: 13%; rendement monomère: 14% ; rendement amorceur : 18%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): Na^+, **AM8**-$[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 4 à 7) m/z = 1226,5 ; 1450,6 ; 1674,7 ; 1898,7. K^+, $[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 5 à 10) m/z = 1177,0 ; 1401,0 ; 1625,1 ; 1849,1 ; 2073,1 ; 2297,2.

➢ Polymérisation de Lys(TFA)-NCA en présence d'acétonitrile

- sans amorceur

Amorçage 15 : 18% d'acétonitrile

C-Lys(TFA) (500 mg, 1,75 mmol); NO (100 mL, 4,46 mmol); O_2 (19 mL, 0,85 mmol); $NaHCO_3$ 0,2M (11,5 mL); CH_3CN (2,5 mL) ; durée de nitrosation 60 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 150 mg; $\overline{DP_n}$ **G1P** (MALDI) = 7; $\overline{DP_n}$ **G1P** (EC) = 7 ; rendement précipité: 60%; rendement monomère: 75%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): Na^+, $[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 5 à 12) m/z = 1160,4 ; 1385,5 ;1609,5 ;1833,6 ; 2057,6 ; 2280,7 ; 2504,8 ; 2729,2. Na^+, $[Lys(Tfa)]_n$ amide (de n = 6 à 8) m/z = 1384,5 ; 1608,6 ; 1832,6.

Amorçage 16 : 50% d'acétonitrile

C-Lys(TFA) (516 mg, 1,81 mmol); NO (72 mL, 3,21 mmol); O_2 (16 mL, 0,71 mmol); $NaHCO_3$ 0,2M (5 mL); CH_3CN (5 mL) ; durée de nitrosation 70 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 50 mg; masse surnageant : 200 mg ; $\overline{DP_n}$ **G1P** (MALDI) = 8; $\overline{DP_n}$ **G1P** (EC) = 8 ; rendement précipité: 39%; rendement monomère: 49%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): K^+, $[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 5 à 16) m/z = 1177,3 ; 1401,4 ; 1625,4 ;1849,5 ; 2073,6 ; 2297,6 ; 2521,7 ; 2745,8 ; 2969,9 ; 3194,0 ; 3418,1 ; 3642,2. Na^+, $[Lys(Tfa)]_n$ amide (de n = 7 à 8) m/z = 1624,4 ; 1848,5.

Amorçage 17 : 62% d'acétonitrile

C-Lys(TFA) (250 mg, 0,88 mmol); NO (50 mL, 2,23 mmol); O_2 (9,5 mL, 0,42 mmol); $NaHCO_3$ 0,2M (3,75 mL); CH_3CN (6 mL) ; durée de nitrosation 60 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 300 mg; $\overline{DP_n}$ **G1P** (MALDI) = 10; $\overline{DP_n}$ **G1P** (EC) = 9 ; rendement précipité: 60%; rendement monomère: 76%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): Na^+, $[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 4 à 20) m/z = 936,9 ; 1384,4 ;1608,5 ;1832,6 ; 2056,6 ; 2280,7 ; 2504,8 ; 2728,9 ; 2953,0 ; 3177,1 ; 3401,2 ; 3625,3 ; 3849,5 ; 4073,6 ; 4297,7 ; 4521,9.

- en présence d'**AM4** avec 50% d'acétonitrile

Amorçage 18

C-Lys(TFA) (127 mg, 0,45 mmol); NO (18 mL, 0,8 mmol); O_2 (4 mL, 0,18 mmol); **AM4** (47,25 mg, 0,12 mmol, M/A = 4) ; $NaHCO_3$ 0,2M (1,25 mL); CH_3CN (1,25 mL) ; durée de nitrosation 70 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 70 mg; masse du surnageant : 10 mg ; $\overline{DP_n}$ **G1P** (MALDI) = 7; % oligomères amorcés : 0 ; rendement précipité: 55%; rendement monomère: 69%

Amorçage 19

C-Lys(TFA) (252 mg, 0,88 mmol); NO (36 mL, 1,61 mmol); O_2 (8 mL, 0,36 mmol); **AM4** (48,7 mg, 0,12 mmol, M/A = 7) ; $NaHCO_3$ 0,2M (2,5 mL); CH_3CN (2,5 mL) ; durée de nitrosation 70 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 110 mg; masse du surnageant : 17 mg ; $\overline{DP_n}$ **G1P** (MALDI) = 8; % oligomères amorcés : 0 ; rendement précipité: 44%; rendement monomère: 44%

Amorçage 20

C-Lys(TFA) (126 mg, 0,44 mmol); NO (18 mL, 0,8 mmol); O_2 (4 mL, 0,18 mmol); **AM4** (24,7 mg, 0,06 mmol, M/A = 7) ; $NaHCO_3$ 0,2M (6 mL); CH_3CN (6 mL) ; durée de nitrosation 70 min; durée polymérisation 15h.

Etape 8 du protocole modifiée : le milieu réactionnel est lyophilisé, puis le minimum d'eau est ajouté au résidu. La suspension est alors filtrée et le solide lavé avec quelques mL d'eau. Celui-ci est lyophilisé.

masse précipité: 10 mg; masse du surnageant : 19 mg ; $\overline{DP_n}$ **G1P** = 7 ; $\overline{DP_n}$ $\mathbf{G1_{AM4}P}$ = 7; % oligomères amorcés (MALDI/EC) : 76/45 ; rendement précipité: 55%; rendement monomère: 69%.

Chapitre III

Synthèse de DGL fonctionnalisés au cœur et ligation

III. Synthèse de DGL fonctionnalisés au cœur et ligation

III.1 Introduction

Les dendrimères greffés de L-lysine par leur caractère polycationique ont des propriétés intéressantes comme une activité antibactérienne ou encore la capacité d'interagir avec les membranes cellulaires. Selon les travaux réalisés *in vitro* par Paleos et son équipe[4], la guanidylation partielle des DGL de 2e génération augmente leur aptitude à traverser les membranes cellulaires et liposomales. Ces propriétés associées à leur biocompatibilité font des DGL des candidats prometteurs pour de multiples applications biologiques[5], aussi bien sous forme native, qu'après dérivation totale ou partielle. Partant de cela et tirant partie du procédé de synthèse des DGL, nous avons envisagé la préparation d'un bioconjugué constitué d'un DGL, d'un bras espaceur et d'une molécule biologiquement active telle qu'un anticorps ou une protéine, comme le montre la figure 17 ci-dessous.

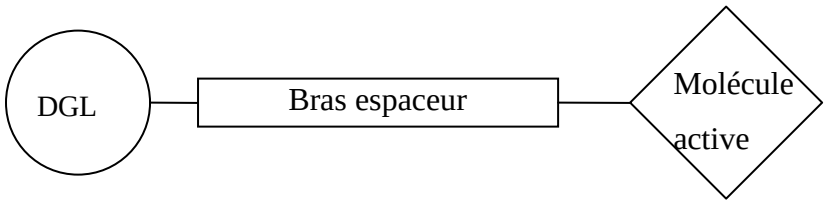


Figure 17: Schéma général du bioconjugué

Notre stratégie consiste donc à synthétiser un amorceur aminé comportant un bras espaceur capable d'interagir avec le type de molécules actives citées ci-dessus dans une réaction de ligation chimique. Ce bras espaceur sera donc incorporé au DGL de façon originale via l'amorçage de la polymérisation de Lys(TFA)-NCA. Dans ce travail, nous nous limiterons à la synthèse de la première (**G1-bras**) et de la deuxième génération (**G2-bras**). Ce conjugué en main, une molécule active pourra alors être accrochée à l'autre extrémité du bras espaceur au moyen d'une ligation chimique. Nous avons choisi d'utiliser une molécule modèle afin de valider la faisabilité de l'aspect ligation (Schéma 38).

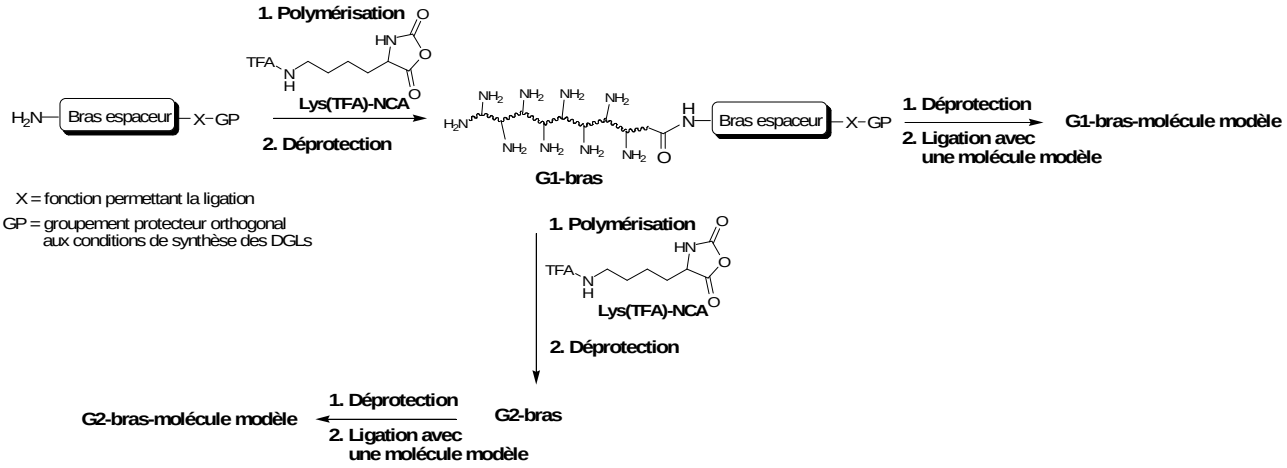


Schéma 38 : Stratégie de formation du bioconjugué

Le choix du bras espaceur s'avère donc primordial. Les conjugués protéine-polymère sont très largement employés pour des applications en médecine, biotechnologie et nanotechnologie. Les polymères employés pour la bioconjugaison peuvent être divisés en 3 catégories[6]:

- les polymères synthétiques : poly(éthylène glycol) ou PEG, copolymères de N-(2-hydroxypropyl)-méthacrylamide ou HMPA, poly(éthylènéimine) ou PEI, poly(acroloylmorpholine) ou PAcM, poly(vinylpyrrolidone) ou PVP, polyamidoamines, polyvinylalcool ou PVA.

- les polymères naturels : dextrane, pullulane, mannane, dextrine, chitosane, acide hyaluronique, protéines.

- les polymères pseudo-synthétiques : poly(acide glutamique) ou PGA, poly(L-lysine), poly(acide malique), poly(aspartamides), poly((N-hydroxyéthyl)-L-glutamine) ou PHEG.

Nous avons sélectionné le polyéthylène glycol comme squelette de notre bras espaceur à cause de ses propriétés remarquables. Le polyéthylène glycol (PEG) est un polyéther diol de structure générale $HO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}CH_2CH_2OH$. Il est disponible dans le commerce dans une large gamme de masse moléculaire avec une faible polydispersité ($M_w/M_n \leq 1,1$)[7]. Le PEG est non immunogène, non toxique, biocompatible, il est très soluble dans l'eau et dans beaucoup d'autres solvants organiques, il possède une grande flexibilité et son squelette polyéther est inerte aussi bien d'un point de vue chimique que biologique. Le PEG a été longtemps utilisé comme excipient pour les formulations pharmaceutiques ou cosmétiques[8] et les études portant

sur son utilisation dans le domaine de la conjugaison n'ont démarré qu'il y a 30 ans environ. Du fait de son utilisation croissante pour la synthèse de bioconjugués, il existe un nombre important de PEG monofonctionnels, homo- et hétéro- bifonctionnels commerciaux mais leurs prix restent relativement élevés, surtout en ce qui concerne les PEG hétérobifonctionnels. Par conséquent, nous avons choisi de synthétiser notre bras espaceur en partant d'un PEG simple, peu coûteux et de longueur définie de façon à maintenir la molécule active à proximité de la sphère représentée par le DGL.

Ce PEG devra être fonctionnalisé par une fonction amine primaire à une de ses extrémités et de l'autre, par une fonction permettant de réaliser une ligation chimique avec une autre molécule du type peptide ou anticorps, etc...

Avant de d'expliciter plus en détail le choix de la fonctionnalité que nous allons introduire sur le bras espaceur pour effectuer la ligation, nous allons faire un rappel bibliographique sur différents types de couplages qui ont été envisagés.

III.2 Rappels bibliographiques sur la ligation chimique

La ligation chimique[9-12]constitue une avancée majeure en chimie des peptides, permettant la synthèse de peptides de taille supérieure à 50 résidus, proposée par Schnölzer et Kent[13] en 1992. C'est une réaction chimiosélective entre deux longs fragments (habituellement des peptides) totalement déprotégés, le plus souvent en solution aqueuse[14] (Figure 18).

« Œuvre non reproduite par respect du droit d'auteur. »

Figure 18 : Principe de la ligation chimique[14]

La ligation peut-être divisée en deux classes : les ligations natives ou avec transfert d'acyle et les ligations non-natives. Les réactions de transfert d'acyle comme la ligation de type pseudo-proline, ou la ligation de Staudinger sont effectuées en général par une réaction de ligation suivie d'un transfert d'acyle intramoléculaire[15] pour former une liaison amide. Les ligations non-natives comme les liaisons hydrazone, oxime, thioester ou thioéther ont la particularité d'avoir une réactivité unique qui est absente des protéines.

III.2.1 La ligation par transfert d'acyle ou ligation native

III.2.1.1 Par un peptide thioester

La ligation chimique native génère une liaison amide[16] au site de ligation. Cette stratégie est basée sur la labilité de la liaison thioester et sa capacité d'acylation intramoléculaire. Le mécanisme repose sur la réaction chimiosélective entre un peptide A totalement déprotégé C-terminal thioester et une cystéine N-terminale d'un autre fragment peptidique B (Schéma 39). Après la transthioesterification, suit un réarrangement intramoléculaire irréversible : une S→N transacylation. Cette réaction irréversible en deux étapes conduit à la formation d'une liaison amide.

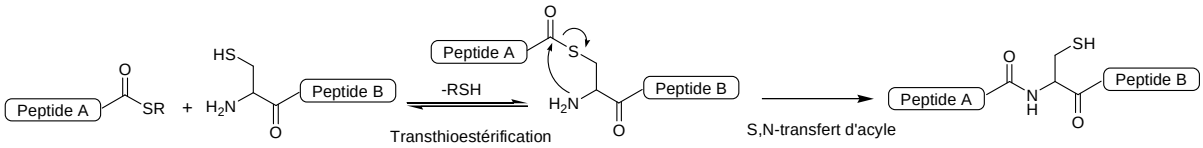


Schéma 39: Ligation native via un peptide thioester[16]

Dawson *et al*.[16] ont utilisés cette ligation pour la synthèse d'une protéine de 72 acides aminés, l'interleukine 8, à partir de deux fragments peptidiques synthétiques.

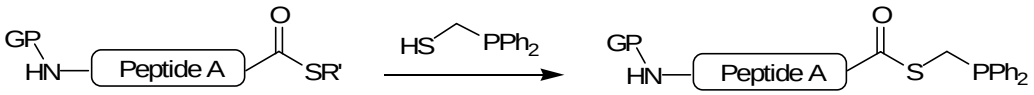
III.2.1.2 Par la ligation de Staudinger

Une méthode alternative permettant d'obtenir une ligation native a été développée indépendamment par deux équipes de recherche Raines[17-19] et Bertozzi[20,21] basée sur la réaction de Staudinger. La réaction de Staudinger a été reportée dans la littérature pour la première fois en 1919[22]. Il s'agit de la réaction entre une phosphine et un azoture conduisant à la formation d'un iminophosphorane. Cette entité intermédiaire peut alors être piégée par différents électrophiles (Schéma 40).

« Œuvre non reproduite par respect du droit d'auteur. »

Schéma 40 : Réaction de Staudinger[23]

Cette réaction peut être appliquée au couplage de deux fragments peptidiques, l'un portant en C-terminal un groupe phosphinothioester et l'autre un groupe azido en N-terminal. Le phosphinothioester est obtenu par réaction entre un peptide thioester et un phosphinothiol (Schéma 41).



PG = Groupement Protecteur

Schéma 41 : Formation du phosphinothioester

Dans la première étape de la ligation de Staudinger, le phosphinothioester réagit avec l'azoture pour former un iminophosphorane qui subit un transfert S-N intramoléculaire conduisant à un sel d'amidophosphonium. Ce sel est ensuite hydrolysé pour conduire à l'amide recherché et à un oxyde de phosphine (Schéma 42).

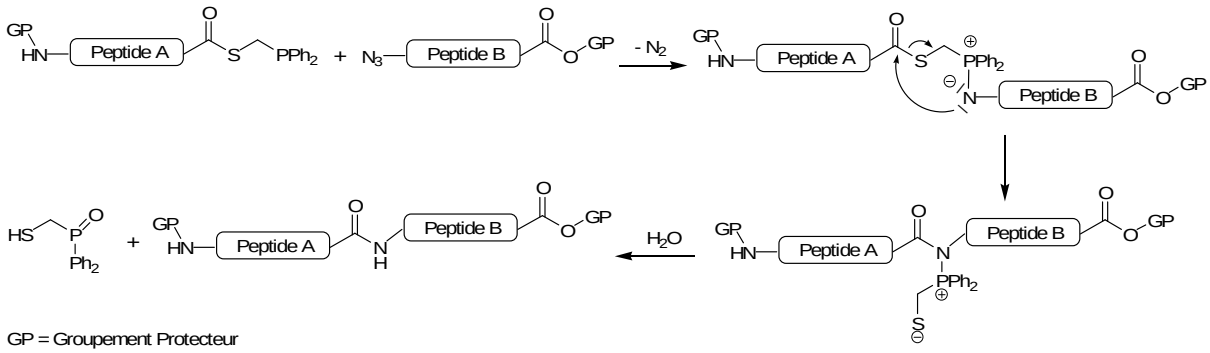


Schéma 42 : Ligation de Staudinger entre 2 fragments peptidiques totalement protégés[23]

Cependant, la grande réactivité de l'aza-ylure ne permet pas la présence de chaîne latérale non-protégée. La ligation de Staudinger est donc limitée au couplage de fragments peptidiques totalement protégés.

III.2.2 La ligation non-native

La ligation non-native, selon la nature des fonctions introduites sur chaque fragment peptidique, conduit à la formation de liaisons différentes de celles des peptides. Nous détaillerons les différents types de ligation existants dans les paragraphes qui suivent.

III.2.2.1 La ligation thioéther et thioester

Dans ces ligations, la liaison peptidique classique est remplacée par une liaison thioéther ou thioester. Ces deux types de ligation font intervenir un bromoacétate N-terminal et un acide thiocarboxylique ou un thiol pour obtenir respectivement une liaison thioester ou thioéther (Schéma 43). Le brome du bromoacétate peut être remplacé par un chlore ou un iode.

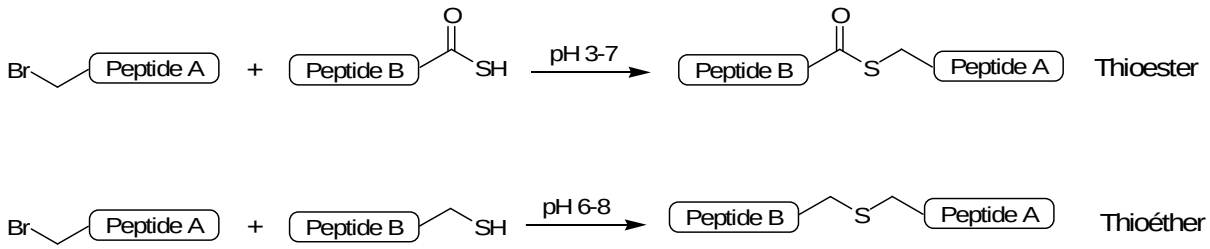


Schéma 43 : Ligation par liaison thioester et thioéther

La formation de la liaison thioester par cette méthode est compatible avec la présence de groupements cystéine libres dans les fragments peptidiques : le pKa de l'acide thiocarboxylique est de l'ordre de 3 contre 9 pour le thiol de la cystéine. Au pH de la réaction, soit entre 3 et 7, cette différence de pKa permet de faire réagir les acides thiocarboxyliques

sans faire réagir les thiols. Il en est de même pour les amines, car elles sont protonées à ce pH. La ligation thioester a été utilisée par exemple par Schnölzer *et al.*[13] pour la préparation d'un analogue synthétique de la protéase HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus).

La ligation thioéther qui s'effectue à pH neutre ou basique est quant à elle incompatible avec la présence de résidus cystéine. Cette ligation est une méthode de choix pour préparer des conjugués peptides-oligonucléotides[12].

Une liaison thioéther peut également être obtenue par addition de Michael entre un peptide thiol et un peptide maléimide (Schéma 44).

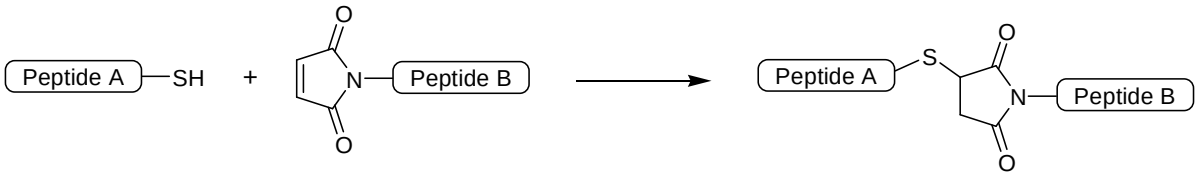


Schéma 44 : Formation d'une liaison thioéther via une conjugaison thiol-maléimide

Ce type de ligation a été utilisé par exemple pour introduire une sonde fluorescente sur un peptide[24] ou pour immobiliser une protéine sur une surface[25].

III.2.2.2 La ligation imine avec insertion d'une thiazolidine ou d'une pseudo-proline

La ligation imine avec l'insertion d'une thiazolidine ou d'une pseudo-proline a été développée par Tam *et al.*[26,27].

a. La ligation imine avec insertion d'une thiazolidine

Il s'agit de la condensation, à pH acide (2 à 5), d'un méthylaldéhyde avec une cystéine en N-terminal d'un peptide, suivie d'un réarrangement intramoléculaire comme le montre le schéma 45.

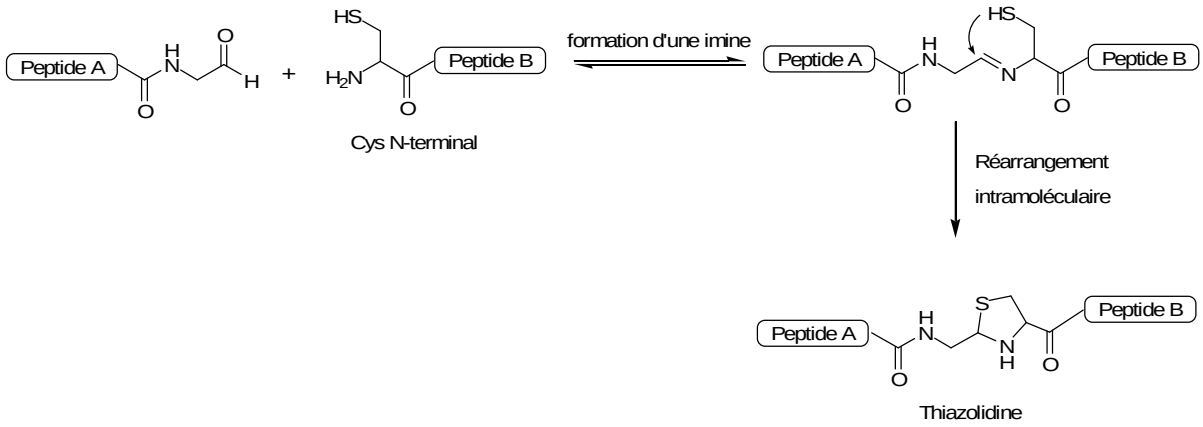


Schéma 45 : Formation d'une thiazolidine

Cette ligation présente deux inconvénients :

- l'utilisation d'un peptide comportant une cystéine libre du côté N-terminal peut poser problème. Les effets de dimérisation avec formation de ponts disulfures sont importants même lorsqu'un réducteur est présent dans le milieu.
- la faible gamme de pH autorisée (pH 2 à 5) pour obtenir la thiazolidine ne pourra pas être utilisée en stratégie orthogonale, avec des groupes protecteurs acidolabiles.

b. La ligation imine avec insertion d'une pseudo-proline

Dans le cas d'une fonction ester en β de la fonction aldéhyde, contrairement à une fonction amide (Schéma 45), la thiazolidine obtenue peut subir à pH plus élevé (6 à 9) un O,N - transfert d'acyle pour former une pseudo-proline substituée par un hydroxyméthylène (Schéma 46).

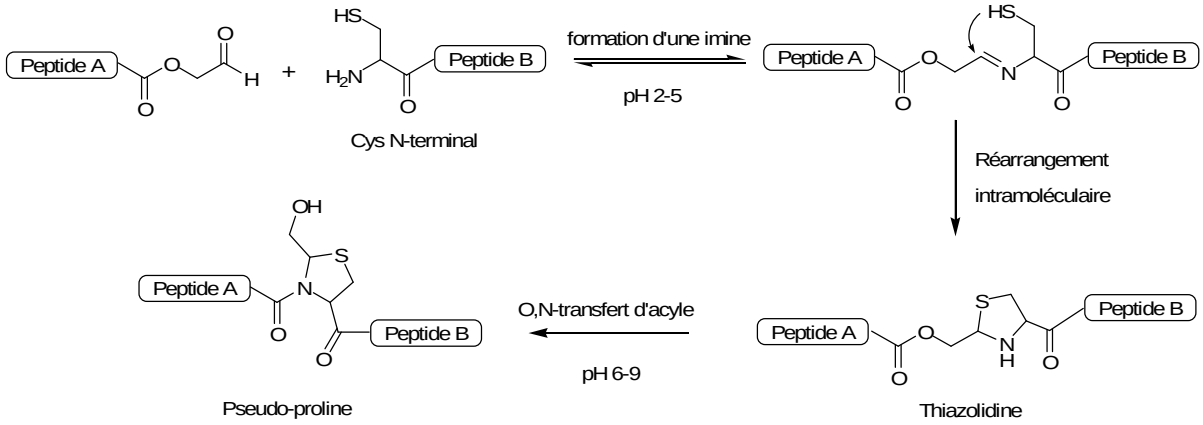


Schéma 46 : Formation d'une pseudo-proline

La ligation imine peut être réalisée avec une sérine ou une thréonine à la place de la cystéine.

III.2.2.3 Les ligations hydrazone et oxime

Dans ce type de ligations, s'apparentant à une ligation imine, les aldéhydes réagissent avec les groupes aminooxy, hydrazide ou hydrazine selon une réaction de condensation catalysée en milieu acide pour former des liaisons oximes ou hydrazones (Schéma 47). Les aminooxy, hydrazide ou hydrazine sont beaucoup plus nucléophiles que les thiols ou les amines des chaînes latérales car ce sont des nucléophiles à effet α. De plus, au pH de la réaction, ces groupements sont déprotonés (pKa ~3,5 à 5) tandis que les fonctions des chaînes latérales sont protonées.

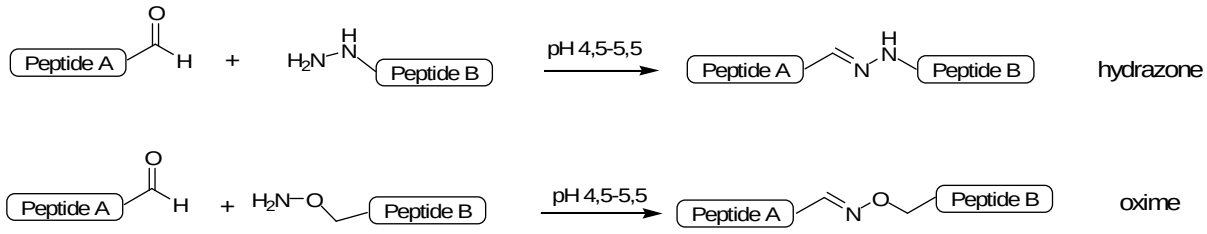


Schéma 47 : Principe de la ligation par liaison hydrazone et oxime

Très récemment, Brunel et ses collaborateur[28] ont décrit la synthèse d'une nanoparticule virale en utilisant le virus de la mosaïque jaune du niébé (CPMV : Cowpea Mosaic Virus). Comme le montre le schéma ci-après, les chaînes latérales des lysines présentent à la surface de ce virus sont dérivatisées de façon à générer des fonctions aldéhydes.

« Œuvre non reproduite par respect du droit d'auteur. »

Schéma 48: Synthèse d'une nanoparticule virale multifonctionnelle[28]

Deux réactions de ligation successives sont alors réalisées sur cette entité pour coupler, par l'intermédiaire d'un lien hydrazone, un ligand peptidique, doté d'un fluorophore, spécifique d'un récepteur exprimé au niveau des cellules tumorales, et un tripeptide modifié par un polyéthylène glycol et un composé fluorescent.

La ligation oxime, mise au point par Rose *et al.*[29], a été utilisée entre autre pour synthétiser des conjugués peptides-oligonucléotides[30] ou encore pour immobiliser des peptides fluorescents sur des supports en silice[31].

III.2.2.4 La ligation triazole : la chimie « Click »

La ligation triazole[32], couramment appelée réaction « click »[33], découverte indépendamment par les groupes de recherches de Sharpless[34] et Meldal[35], est basée sur une réaction de cycloaddition [3+2] catalysée par des métaux de transition comme le cuivre (I) entre des alcynes terminaux et des azotures organiques (Schéma 49).

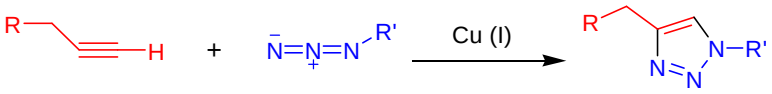


Schéma 49 : Ligation triazole

Ce type de ligation suscite beaucoup d'intérêt car les fonctions alcynes et azotures présentent une assez bonne inertie en l'absence de catalyseur, et le cycle triazole formé est lui aussi relativement inerte vis-à-vis des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse[33].

Cependant, l'inconvénient est l'élimination du Cu(I) qui est toxique *in vivo* et qui peut générer d'autres réactions non désirées comme l'oxydation de la cystéine ou de la méthionine. Toutefois, des méthodes permettant d'effectuer une ligation triazole en absence de catalyse au cuivre ont été développées récemment[36-38].

III.2.2.5 La ligation via la réaction de Diels-Alder

La réaction de Diels-Alder est une réaction hautement sélective qui peut être réalisée dans l'eau avec une vitesse de réaction plus élevée et une sélectivité plus grande que dans les solvants organiques[39]. Sa compatibilité avec les biomolécules a été exploitée pour la bioconjugaison et/ou pour l'immobilisation d'oligonucléotides[40] et d'autres biomolécules[41,42]. Récemment, Waldmann et son équipe[43,44] ont utilisé cette cycloaddition [4+2], en faisant intervenir le groupe maléimide, pour la conjugaison de peptides et la fonctionnalisation des protéines.

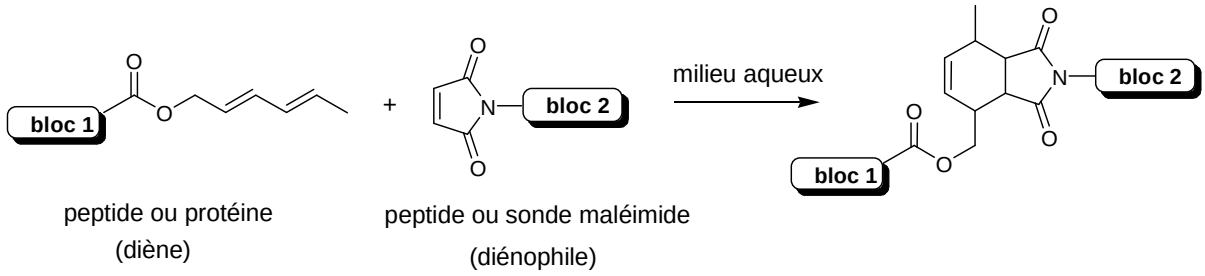


Schéma 50 : Principe de la ligation de Diels-Alder

Le fragment peptidique contenant la fonction maléimide en N-terminal réagit comme un diénophile avec un peptide contenant un diène en C-terminal pour former le produit endo-Diels-Alder (Schéma 50). Le diène peut être introduit dans le peptide de synthèse en utilisant des méthodes habituellement appliquées à la synthèse de thioesters. La réaction de Diels-Alder doit être effectuée dans des conditions légèrement acides pour être chimiosélective (pH 5,5-6,5), évitant ainsi des réactions non désirées avec les amines à pH neutre.

Cette ligation peut aussi être utilisée pour l'immobilisation des protéines sur un support[44].

Les différents types de ligation décrits dans les paragraphes précédents sont résumés dans le tableau 9 ci-après.

Type de ligation	Electrophile	Nucléophile	Conditions de pH
Native	Thioester	Cystéine N-terminale	7-8
Thioéther	Bromoacétyle	Thiol	6-8
Thioester	Bromoacétyle	Thioacide	3-7
Thiazolidine	Aldéhyde	Cystéine N-terminale	2-5
Pseudo-proline	Réarrangement thiazolidine		6-9
Hydrazone	Aldéhyde	Hydrazide/Hydrazine	4,5-5,5
Oxime	Aldéhyde	Aminooxy	4,5-5,5

Tableau 9 : Différents types de ligation[14]

Nous avons choisis de réaliser une ligation de type oxime car il existe un grand nombre de biomolécules (anticorps, peptides, protéines, sucres) sur lesquelles il est aisé d'introduire une fonction aldéhyde. Nous nous proposons donc de fonctionnaliser le bras espaceur par un groupement aminooxy. Etant donné la similitude entre les ligations oxime et hydrazone, nous allons aussi synthétiser un bras espaceur avec une fonction hydrazide terminale.

III.3 Elaboration du bras espaceur

Pour aboutir à notre bras espaceur fonctionnalisé par une fonction amine d'un côté et une fonction aminoxy ou hydrazide de l'autre, quelle que soit la stratégie employée, nous devrons en premier lieu désymétriser le PEG de départ. C'est la raison pour laquelle, nous insisterons sur les méthodes de désymétrisation du PEG dans le paragraphe suivant. Plus loin, nous présenterons les méthodes d'introduction des aminooxy et hydrazide.

III.3.1 Réaction de désymétrisation du PEG

La réaction de désymétrisation a pour but la différenciation de deux fonctions chimiquement identiques dans une molécule. Dans des conditions stœchiométriques, cette réaction conduit à la formation statistique du produit monosubstitué et du disubstitué, en présence du réactif de départ qui n'a pas réagit. Des exemples dans la littérature montrent que les rendements sont faibles et atteignent au mieux 50%[45-47].

La disubstitution peut être évitée par l'utilisation d'un large excès de glycol. Cela ne peut se faire que dans le cas où l'on utilise un glycol peu coûteux, comme l'éthylène glycol ou ses homologues supérieurs jusqu'au tétraéthylène glycol[48,49].

Il faut noter qu'il existe des méthodes pour synthétiser des polyéthylène glycols hétérobifonctionnels passant par la polymérisation par ouverture de cycle de l'oxyde d'éthylène initiée par un amorceur approprié[50], mais celles-ci conduisent à des PEG de hautes masses moléculaires. Nous nous sommes concentrés ici sur des réactions de chimie organique classiques mises en œuvre pour désymétriser des PEG de faibles masses moléculaires.

La désymétrisation peut se faire selon 3 méthodes :

- la monoactivation : un bon groupement partant est introduit sur une extrémité du PEG dans le but de le remplacer par une fonction appropriée lors d'une réaction de type S_N2.
- la monoprotection : une des fonctions alcool du PEG est protégée de façon à pouvoir modifier la fonction alcool libre restante.
- l'introduction d'une fonction masquée : une fonction déjà protégée est introduite sur une extrémité du PEG, permettant la modification de l'autre extrémité dans des conditions orthogonales au groupement protecteur utilisé.

III.3.1.1 La monoactivation

Les esters de sulfonate et les halogénures sont très utilisés comme bons groupements partants dans les réactions de substitution aux extrémités des éthylènes glycols[51].

Cependant, les esters de sulfonate sont généralement plus réactifs que les halogénures et sont donc les plus largement employés, notamment les mésylates et les tosylates[7].

- le groupement tosyle

L'introduction du groupement tosyle sur le PEG se fait par réaction du diol avec le chlorure de tosyle (TsCl) en présence d'une base (Schéma 51).

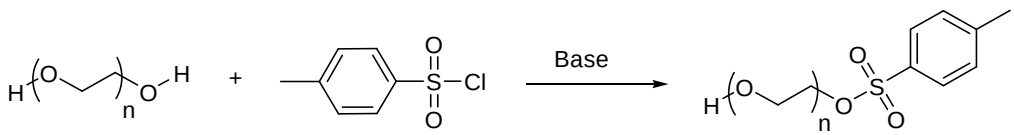


Schéma 51 : Monotosylation du PEG

D'une manière générale, cette réaction se fait à basse température et la pyridine joue souvent le rôle de solvant et de base. Dans ces conditions, le PEG peut être employé en quantité stœchiométrique[52]ou en excès[53]avec de bons rendements, respectivement 82% et 75%.
La monotosylation du PEG peut aussi se faire en milieu aqueux, en présence de soude (Schéma 52).

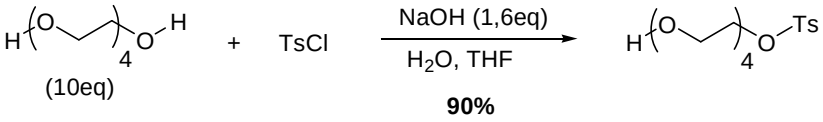


Schéma 52 : Monotosylation du tétraéthylène glycol en milieu aqueux

Ici, le tétraéthylène glycol est utilisé en large excès par rapport au TsCl et le rendement obtenu est excellent[54].
En 2002, Bouzide *et al*.[55]ont proposé une méthode rapide de monotosylation du PEG en présence d'oxyde d'argent et d'une quantité catalytique d'iodure de potassium (Schéma 53).

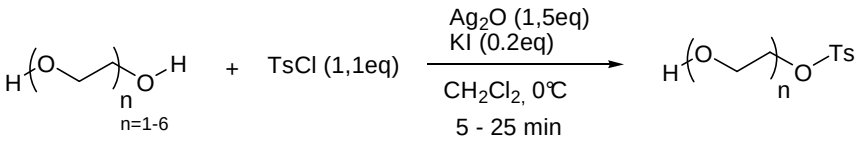


Schéma 53 : Monotosylation du PEG en présence d'Ag_2O

La bonne sélectivité de cette réaction s'explique par la différence d'acidité entre les deux groupements hydroxyles due à une liaison hydrogène interne (Figure 19).

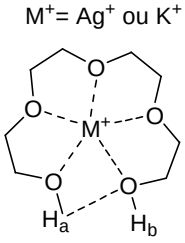


Figure 19 : Chélation du PEG par un cation métallique

Les atomes d'oxygène du PEG chélatent l'ion Ag^+ (ou K^+), ce qui rapproche les deux groupements OH et favorise la formation d'une liaison hydrogène interne. L'atome d'hydrogène H_a faisant partie de cette liaison devient par conséquent moins acide que H_b. Ce

dernier, sera donc déprotoné le premier. La sélectivité de cette réaction augmente avec le nombre d'atomes d'oxygène inclus dans le complexe formé avec Ag^+ (ou K^+)[56].

- le groupement mésyle

L'introduction du groupement mésyle se fait par réaction entre le PEG et le chlorure de mésyle (MsCl) en présence de triéthylamine dans le THF (Schéma 54).

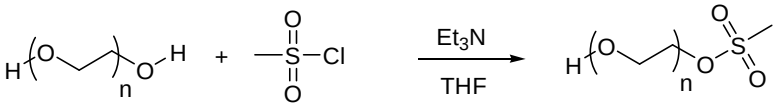


Schéma 54 : Monomésylation du PEG

Cette réaction donne en général des rendements faibles allant jusqu'à 50%[57,58]. Les esters de mésyle sont moins réactifs que les tosylates mais ils sont plus stables dans le cas d'un stockage à long terme[7].

En vue de désymétriser le PEG, nous avons aussi la possibilité de protéger sélectivement une des deux fonctions alcools afin de pouvoir transformer l'autre.

III.3.1.2 La monoprotection

Le PEG étant un diol, les groupements protecteurs les plus utilisés appartiennent à la famille des éthers. Le plus utilisé est le groupement trityle (Tr).

- L'éther de trityle

Le groupement trityle est généralement introduit sur le PEG par réaction entre le chlorure de trityle (TrCl) et le PEG en excès (entre 2 et 10éq)[59-61] (Schéma 55).

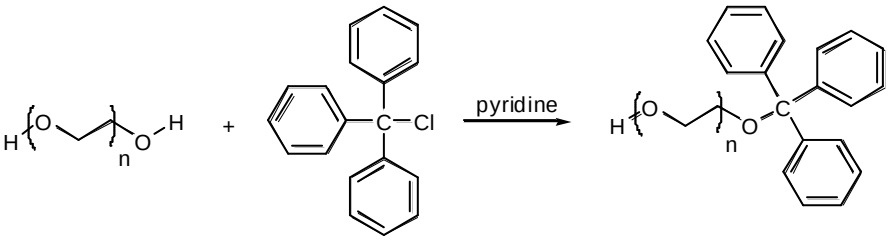


Schéma 55 : Monotritylation du PEG

La pyridine capte le chlore du TrCl et permet d'accéder au carbocation de triphénylméthyle (trityle) qui réagit sur le PEG par un mécanisme de type S_N1. Cette réaction s'effectue avec un bon rendement (70-95%)[48,49,59-61]. Cependant, il est aussi possible d'utiliser le triphénylméthanol (TrOH) en présence d'acide *p*-toluènesulfonique pour générer le carbocation[62].

Le groupement trityle est parfois remplacé par le 4,4'-diméthoxytrityle (DMTr) plus adapté par exemple à la synthèse d'oligonucléotides[63].

L'éther de trityle se déprotège généralement en milieu acide, par exemple avec de l'acide *para*-toluènesulfonique[62].

Dans la littérature, il y a quelques exemples de groupements protecteurs autres que l'éther de trityle pour désymétriser le PEG. Parmi eux, se trouvent l'éther de *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS), l'éther de tétrahydropyranyle (THP) et l'éther de benzyle (Bn).

- L'éther de *tert*-butyldiméthylsilyle

Dans l'exemple ci-dessous, Bertozzi *et al.*[45] utilisent de l'hydrure de sodium pour former l'alcoolate du tétraéthylène glycol qui est en excès. Cet alcoolate réagit alors sur le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle pour former l'éther de TBDMS.

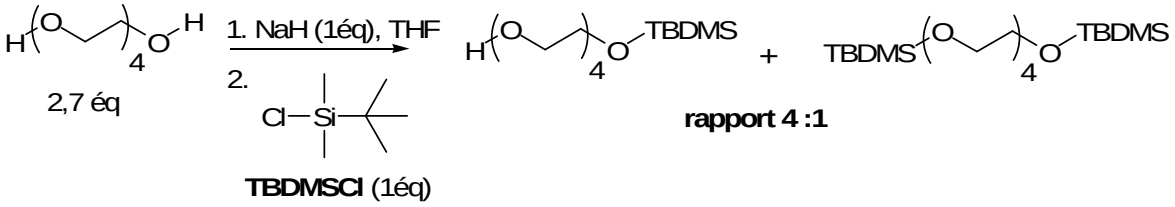


Schéma 56 : Monoprotection du PEG par un éther silylé

Dans ces conditions, il se forme les dérivés mono- et di-protégés dans un rapport 4/1. Cependant, Bertozzi et ses collaborateurs arrivent à les séparer facilement par chromatographie liquide haute pression (CLHP).

L'éther de *tert*-butyldiméthylsilyle est clivé, en général, en présence de fluorure de tétrabutylammonium (TBAF).

Un autre groupement utilisé pour protéger le PEG est l'éther de tétrahydropyranyle (THP).

➢ L'éther de tétrahydropyranyle

L'éther de tétrahydropyranyle est généralement introduit sur un alcool par l'intermédiaire du 2,3-dihydropyrane en catalyse acide.

Dans l'exemple ci-dessous, Richard *et al.*[64] font réagir 3 équivalents de triéthylène glycol avec 1 équivalent de 2,3-dihydropyrane en présence d'une quantité catalytique d'HCl concentré.

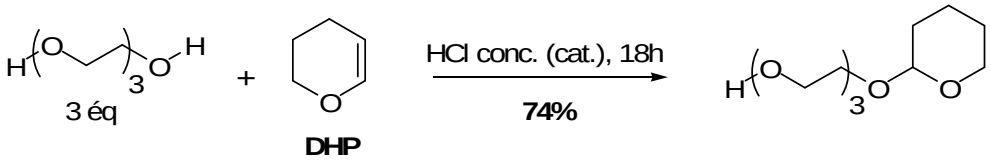


Schéma 57 : Monoprotection du PEG par un éther de tétrahydropyranyle

Ils obtiennent le dérivé monoprotégé du triéthylène glycol avec un bon rendement.

La déprotection de ce groupement est réalisée en général en milieu acide.

Le dernier type d'éther utilisé pour désymétriser le PEG est l'éther de benzyle (OBn).

➢ L'éther de benzyle

En général, l'éther de benzyle est introduit sur une fonction alcool selon la synthèse des éthers de Williamson[65] (Schéma 58).

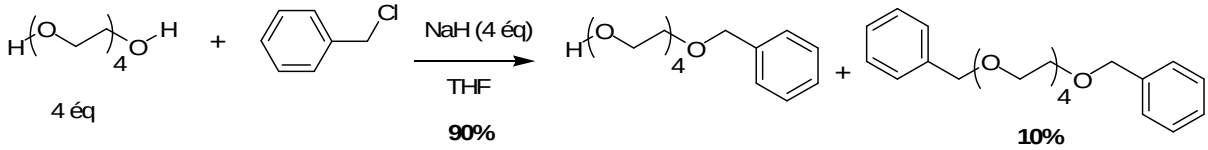


Schéma 58 : Monoprotection du PEG par un éther de benzyle

Tous ces groupements protecteurs acidolabiles, ainsi que l'éther de benzyle qui est hydrogénolabile, sont orthogonaux à la modification de la fonction alcool restante du PEG. En effet, la transformation du groupement hydroxyle restant nécessite l'emploi d'une base pour passer à l'alcoolate, entité plus réactive.

La 3e méthode alternative de désymétrisation du PEG consiste à introduire une fonction chimique masquée ou protégée de façon sélective à une de ses extrémités.

III.3.1.3 L'introduction d'une fonction chimique masquée

D'une manière générale, deux fonctions essentielles en chimie organique sont introduites sur le PEG de façon masquée : la fonction acide carboxylique et la fonction amine.

- la fonction acide carboxylique

La fonction acide carboxylique est masquée habituellement sous forme d'ester. Elle est introduite via deux réactifs : le bromoacétate d'alkyle ou l'acrylate d'alkyle.

La réaction entre le PEG et les bromoacétates d'alkyle (Schéma 59) ne donne pas de très bon rendement comme le montre le tableau 10.

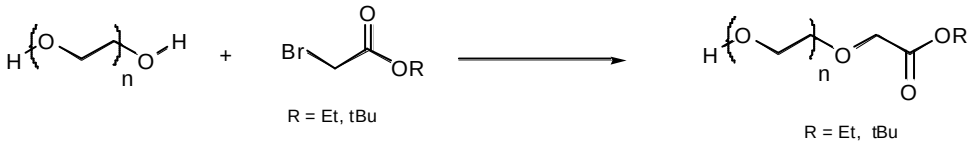


Schéma 59 : Réaction entre le PEG et un bromoacétate d'alkyle

Dans ce tableau, sont répertoriés les conditions de réaction utilisées par deux équipes de recherche ainsi que le rendement obtenu pour chacune d'elles.

	X	R	Conditions*	Rendement (%)
Bhosale[66]	Br	Et	PEG (2eq) Na (1,05eq)	29
Van Boeckel[67]	Br	tBu	PEG (9eq) tBuOK (0,1eq)	60

*excès calculé en fonction du bromoacétate d'alkyle

Tableau 10 : Conditions expérimentales des *O*-alkylations du PEG

Il faut noter que le meilleur rendement est obtenu pour le bromoacétate de *tert*-butyle avec un large excès de PEG et de bromoacétate de *tert*-butyle, le réactif en défaut étant le tBuOK. Cette réaction permet d'allonger la chaîne de deux carbones et consomme beaucoup de réactifs pour un rendement moyen.

Au contraire, les réactions avec les acrylates d'alkyle fonctionnent très bien. Dans le schéma ci-dessous, le PEG en excès est mis en réaction avec l'acrylate de *tert*-butyle en présence d'une quantité catalytique de sodium métal.

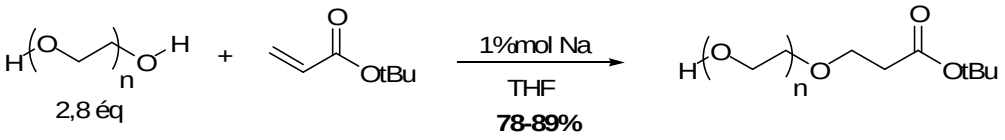


Schéma 60 : *O*-alkylation du PEG par l'acrylate de *tert*-butyle

Cette réaction se fait selon une addition-1,4 du PEG sur l'acrylate[68,69,70]. En comparaison avec le bromoacétate de *tert*-butyle, l'utilisation de l'acrylate de *tert*-butyle donne lieu à une réaction économique, seulement 2,8 équivalents de PEG contre 9 équivalents avec le bromoacétate de *tert*-butyle, avec un excellent rendement.
Une déprotection en milieu acide généralement avec de l'acide trifluoroacétique permet de libérer la fonction acide carboxylique.

- la fonction amine

La fonction amine est, en général, introduite sur le PEG sous forme d'azoture.
Le PEG subit d'abord une monomésylation puis réagit avec l'azoture de sodium pour donner le OH-PEG-N_3 (Schéma 61). La réaction se fait en « one-pot »[45,71].

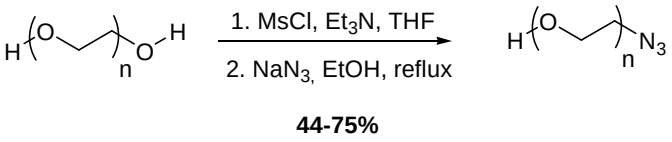


Schéma 61 : Introduction d'un azoture sur le PEG

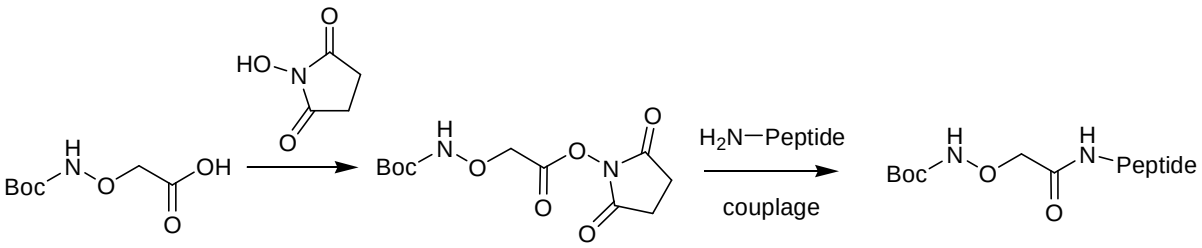
Contrairement à l'introduction de la fonction acide carboxylique, il est nécessaire de passer d'abord par une monoactivation de l'alcool avant d'introduire l'azoture. Cet azoture peut être réduit en amine par hydrogénolyse ou par la réaction de Staudinger (cf. Schéma 40).

Après avoir exposé les différentes méthodes de désymétrisation du PEG, nous allons développer dans les paragraphes suivant les méthodes d'introduction des fonctions aminooxy et hydrazide.

III.3.2 Introduction de la fonction aminooxy

III.3.2.1 Via l'acide aminooxyacétique et ses dérivés

Le couplage des dérivés de l'acide aminooxyacétique (Aoa) avec une amine est fréquemment utilisé pour introduire une fonction aminooxy. Lors des premiers essais de ligation avec une liaison oxime, Rose et ses collaborateurs[29] ont utilisé l'ester de succinimide de l'acide aminooxyacétique avec un groupement Boc pour protéger la fonction amine et introduire la fonction aminooxy sur un peptide (Schéma 62). Les conditions réactionnelles et les réactifs utilisés sont les mêmes que pour un couplage peptidique classique.



N-Boc-Aoa **N-Boc-Aoa-OSu**

Schéma 62 : Insertion de la fonction aminooxy sur un peptide via l'ester activé de l'acide aminooxyacétique

Il est aussi possible d'utiliser directement l'acide aminooxyacétique sans activation préalable. En 2007, Christman et son équipe[72] utilisent l'acide aminooxyacétique protégé par un groupement Boc pour introduire une fonction aminooxy sur un tétraéthylène glycol uniquement à l'une de ses extrémités (Schéma 63).

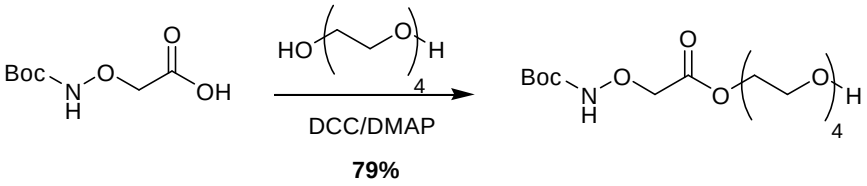


Schéma 63 : Insertion d'une fonction aminooxy sur une extrémité du tétraéthylène glycol

Outre l'utilisation de l'acide aminooxyacétique, la fonction aminooxy peut être introduite via la Boc-hydroxylamine.

III.3.2.2 Via la Boc-hydroxylamine

En 2000, Jones *et al.*[73] proposent une méthode de synthèse permettant d'introduire une fonction aminooxy en faisant réagir la Boc-hydroxylamine sur des dérivés halogénés.

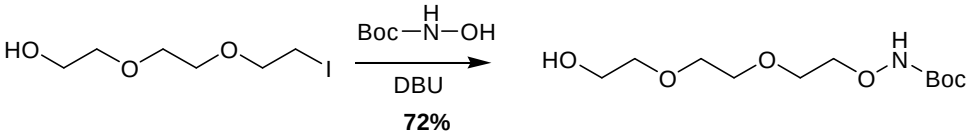


Schéma 64 : Réaction entre un iodotriéthylène glycol et la Boc-hydroxylamine

Dans le schéma ci-dessus, un dérivé triéthylène glycol monoiodé est mis en réaction avec la Boc-hydroxylamine en présence de DBU pour conduire au produit d'addition avec un bon rendement.

En 2006, Albrecht *et al.*[74] proposent une méthode simple de préparation d'hydroxylamines *O*-substitués à partir d'alcools. Dans le schéma ci-dessous, le butanol est tout d'abord activé avec du chlorure de mésyle, puis le composé mésylé est mis en réaction avec la Boc-hydroxylamine pour conduire au dérivé d'hydroxylamine *O*-substitué correspondant.

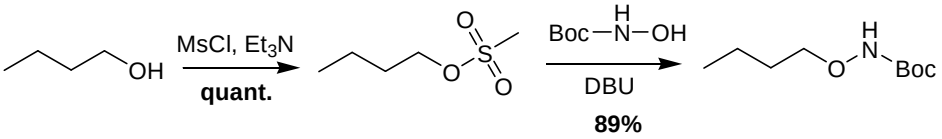
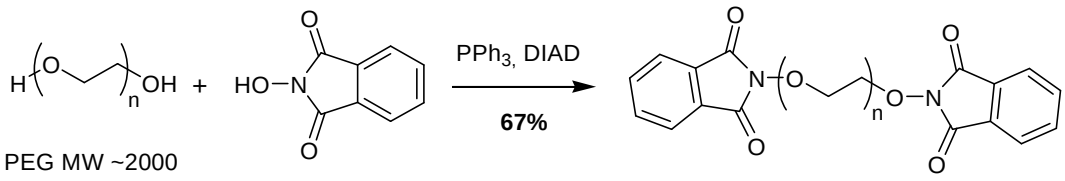


Schéma 65 : Synthèse d'un dérivé *O*-substitué d'hydroxylamine

Une autre méthode d'introduction de la fonction aminooxy a été développée faisant intervenir le *N*-hydroxyphtalimide.

III.3.2.3 Via le *N*-hydroxyphtalimide

La fonction aminooxy est introduite via une réaction de Mitsunobu entre un alcool et le *N*-hydroxyphtalimide. En 2007, Holder et al.[75] réalisent une réaction de Mitsunobu entre un polyéthylène glycol de masse molaire environ 2000 g/mol et le *N*-hydroxyphtalimide, en présence de DIAD (DiIsopropyl AzoDicarboxylate) et de triphénylphosphine (Schéma 66). Le *N*-hydroxyphtalimide est introduit à chaque extrémité de l'éthylène glycol.



PEG MW ~2000

Schéma 66 : Réaction de Mitsunobu entre du PEG et le N-hydroxyphtalimide

Le groupement phtalimide peut être clivé par de l'hydrate d'hydrazine ($NH_2NH_2.H_2O$) afin de libérer la fonction aminooxy. Les avantages de l'utilisation du *N*-hydroxyphtalimide sont qu'il est stable et hydrazinolabile, ce qui permet son utilisation dans des conditions acides ou basiques sans risque de déprotection de l'aminooxy.

III.3.3 Introduction de la fonction hydrazide

D'une manière générale, la fonction hydrazide peut être introduite soit sous forme libre, soit sous forme protégée comme le montre le schéma 67 ci-dessous.

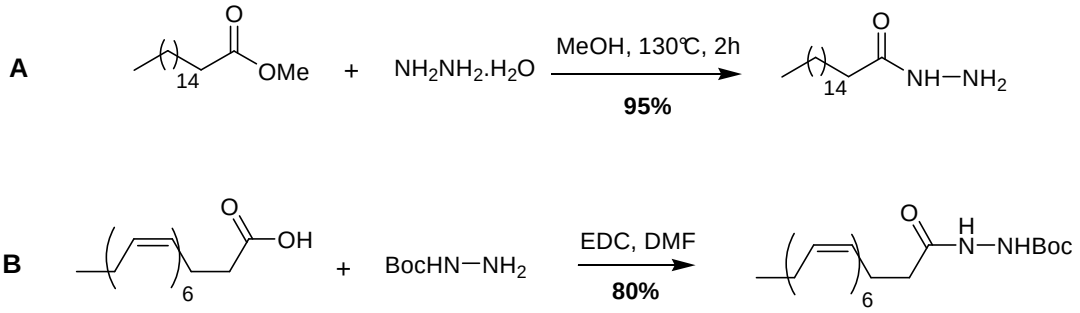


Schéma 67 : Insertion d'une fonction hydrazide libre (A) ou protégée par un groupement Boc (B)

Dans le schéma 67A, l'hydrazide sous forme libre est obtenu par réaction d'un ester méthylique avec l'hydrate d'hydrazine[76]. Cette réaction est réalisée avec un excellent rendement. Dans le schéma 67B, il s'agit d'un couplage peptidique classique. Un acide carboxylique est mis en réaction avec l'hydrazine protégée par un groupement Boc, en présence d'un agent de couplage, l'EDC (*N*-Ethyl-*N*′-(3-Diméthylaminopropyl)carbodiimide)[77].

Après avoir exposé les méthodes de désymétrisation du PEG et d'introduction des fonctions oxime et hydrazide, nous allons développer dans les paragraphes suivants les stratégies que nous avons mises en jeu dans la synthèse des bras espaceurs hydrazide et oxime ainsi que aspects relatifs à la ligation avec une molécule modèle.

III.4 Résultats et discussion

Nous devons synthétiser deux bras espaceurs de type PEG :

- le premier sera fonctionnalisé par un groupement amine à une extrémité et par un groupement aminooxy protégé à l'autre extrémité.
- le second sera fonctionnalisé par un groupement amine à une extrémité et par un groupement hydrazide protégé à l'autre extrémité.

Afin de déterminer la stratégie de synthèse à adopter pour la préparation de ces deux composés, nous commençons par définir le groupement protecteur adéquat pour la fonction servant à la ligation.

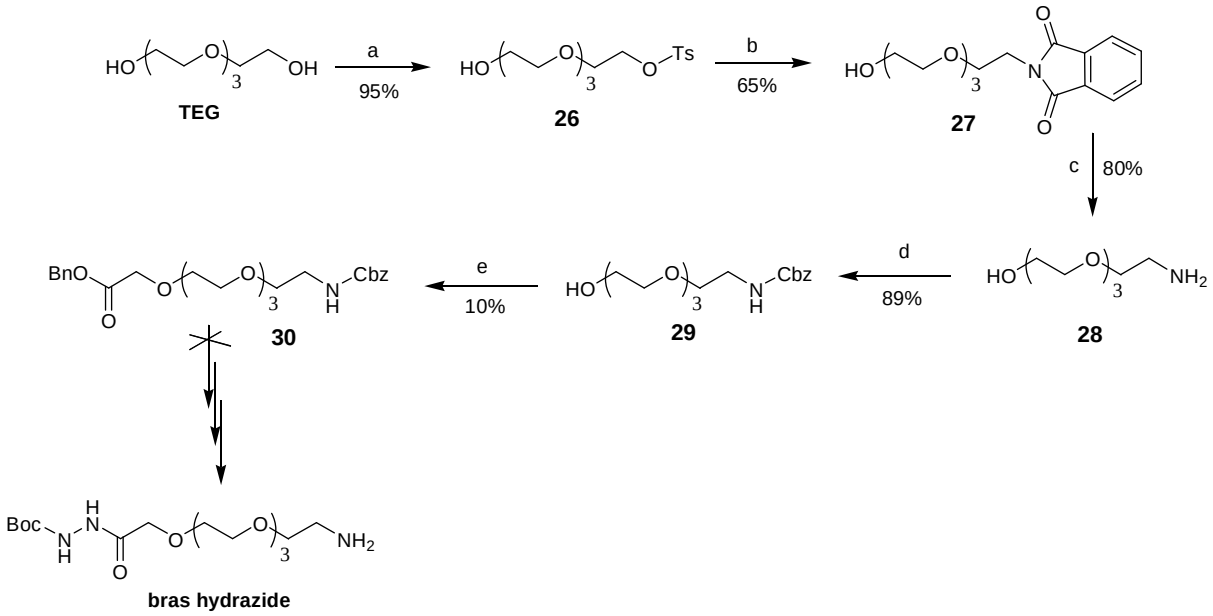
Une fois synthétisé, nous rappelons que le bras espaceur servira d'amorceur de polymérisation de Lys(TFA)-NCA afin de préparer **G1-bras**, puis **G2-bras**. Le groupement protecteur choisi doit donc être stable en milieu neutre (condition de polymérisation de Lys(TFA)-NCA) et en milieu basique (condition de déprotection des DGL). Par conséquent, nous avons opté pour le groupement Boc qui est un groupement acidolabile et facile d'accès. De plus, les DGL sont inertes aux conditions de déprotection du Boc. Ainsi, les conditions de synthèse que nous allons employer doivent être orthogonales au groupement Boc.

Par ailleurs, nous savons que pour introduire la fonction aminooxy, nous devons faire apparaître dans la synthèse une fonction alcool, amine ou iodure sur le dérivé éthylène glycol, selon la méthode choisie (cf. §III.3.2, p.133). Et pour la fonction hydrazide, nous devons faire apparaître une fonction acide carboxylique (cf. §III.3.3, p.135).

Après avoir posé ces bases, nous avons élaboré une stratégie de synthèse pour le bras hydrazide.

III.4.1 1ère stratégie de synthèse du bras hydrazide

Le schéma de synthèse que nous avons développé est présenté ci-dessous.



a) TsCl, NaOH, THF, H_2O, 0°C, 3h. b) phtalimide de potassium, DMF, reflux , 1 nuit. c) $NH_2NH_2.H_2O$, EtOH, 1nuit. d) CbzCl, Et_3N, CH_2Cl_2. e)$BrCH_2CO_2Bn$, tBuOK, THF

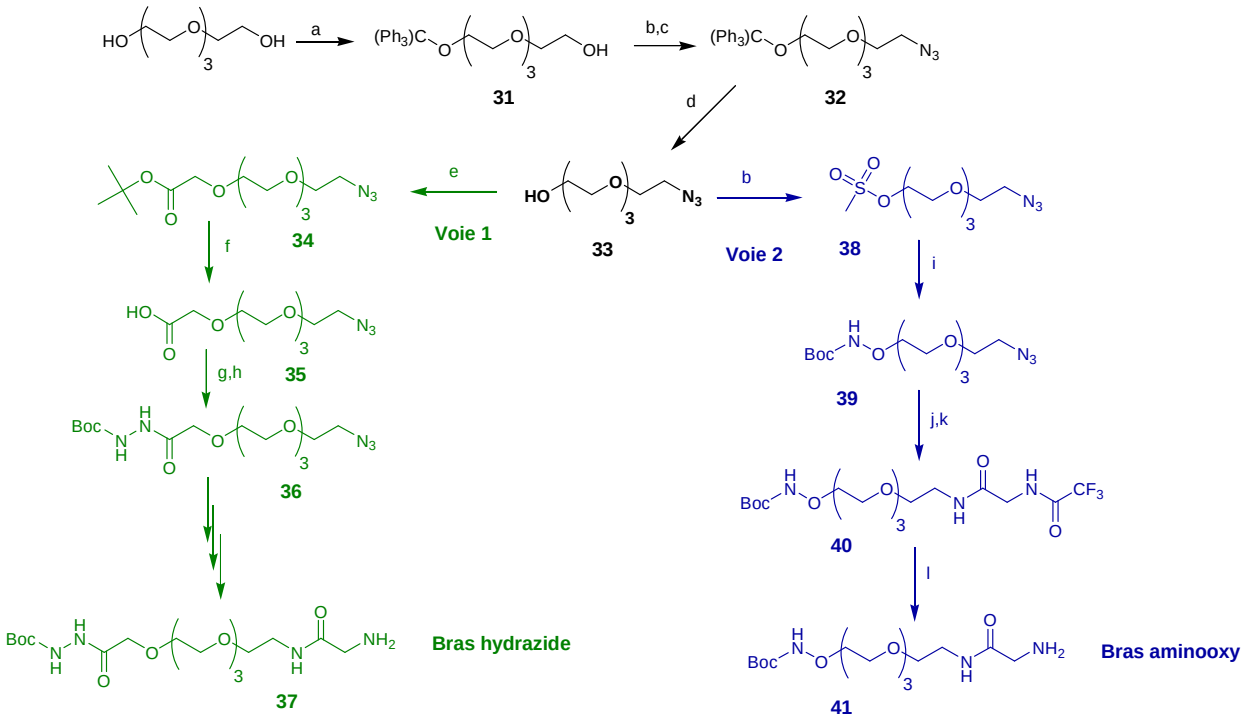
Schéma 68 : Schéma de synthèse du bras hydrazide

Partant du tétraéthylène glycol (TEG), nous avons effectué, premièrement, une monotosylation[54], puis nous avons réalisé une substitution nucléophile[53] avec du phtalimide de potassium pour conduire au tétraéthylène glycol monophtalimide **27**. Ces deux réactions ont été réalisées avec un rendement global de 61%. Deuxièmement, ce composé est mis en présence d'hydrazine monohydrate pour conduire au produit monoaminé[53] **28**. Ensuite, nous avons protégé la fonction amine avec un groupement Cbz (ou benzyloxycarbonyl) dans des conditions classiques, avec un rendement de 89%. Enfin, nous avons réalisé l'addition du bromoacétate de benzyle sur le composé **29**, en présence de tBuOK, pour conduire à la molécule **30**. Nous n'avons pas pu poursuivre cette stratégie car cette dernière réaction est difficile à maîtriser. Comme l'ont démontré Adamczyk *et al.*[78] avec le triéthylène glycol monoamine N-protégé par un groupement Cbz, le tBuOK déprotone la fonction alcool pour donner un alcoolate qui peut ainsi attaquer le bromoacétate de benzyle. Cependant, cet alcoolate peut attaquer non seulement le CH_2 en alpha du carbonyle mais aussi le carbonyle lui-même. Il faut noter aussi que l'amine protégée par le groupement Cbz est suffisamment nucléophile pour attaquer le CH_2 du bromoacétate. Il en résulte la formation de nombreux

produits secondaires qui rendent la récupération et la purification du produit recherché fastidieuses.

Face à ces difficultés, nous avons réexaminé notre schéma réactionnel de façon à trouver une voie de synthèse évitant les problèmes de réactivité évoqués ci-dessus et qui soit commune aux deux molécules visées. De ce fait, nous avons défini une nouvelle stratégie impliquant une partie commune conduisant à la formation d'un TEG azido-alcool. A partir de cet azido-alcool, les bras hydrazide et aminooxy peuvent être obtenus. L'inertie de la fonction azido, sauf dans des milieux réducteurs, autorise la réaction avec la fonction alcool en limitant les réactions secondaires. De plus, cette fonction est un précurseur de la fonction amine.

Le schéma réactionnel que nous avons suivi est présenté ci-après.



a) TrCl, pyridine, 45°C, 1 nuit. b) MsCl, Et_3N, CH_2Cl_2, 1nuit. c) NaN_3, CH_3CN, 95°C, 48h. d) ApTs, MeOH, reflux. e) $BrCH_2CO_2tBu$, TBABr, toluène, $NaOH_{aq}$ 12,5N. f) TFA. g) DCC, HOSu. h) $BocNHNH_2$. i) BocNHOH, DBU, THF. j) PPh_3, THF/H_2O, 60°C. k) TFA-Gly, EDC. l) $NH_3/MeOH/H_2O$, 40°C , 1 nuit.

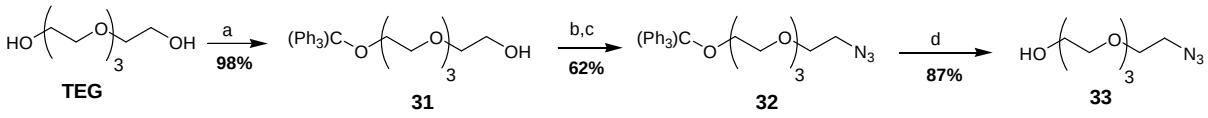
Schéma 69 : Stratégie de synthèse pour la préparation des bras espaceurs aminooxy et hydrazide

Le TEG est tout d'abord monoprotégé par le groupement trityle (composé **31**), puis l'alcool resté libre subit une mésylation permettant l'introduction de la fonction azido (composé **32**). Le composé **32** est ensuite déprotégé pour conduire à l'azido-alcool correspondant (composé **33**). A partir de là, nous avons suivi deux voies différentes de synthèse pour parvenir aux bras espaceurs hydrazide (**voie 1**) et aminooxy (**voie 2**).

Dans les paragraphes suivant, nous détaillerons la synthèse de l'azido-alcool **33**, puis celle du bras hydrazide, et enfin celle du bras aminooxy.

III.4.2 Synthèse du TEG azido-alcool 33

La première étape de cette synthèse est la réaction de désymétrisation du tétraéthylène glycol. Nous avons utilisé le protocole développé par Menger *et al.*[61] pour effectuer la monoprotection du TEG par le groupement trityle. Ainsi, le TEG est mis en réaction, en large excès (10 équivalents), avec du chlorure de tosyle (1 équivalent) en présence de pyridine pour conduire au dérivé monoprotégé correspondant avec un excellent rendement (basé sur le nombre de moles de chlorure de tosyle engagées). L'avantage du groupement trityle est que c'est un groupement volumineux qui rend le TEG plus hydrophobe et facilite sa purification. En effet, le composé **31** est purifié par extraction liquide/liquide uniquement.



a) TrCl, pyridine, 45℃, 1 nuit. b) MsCl, Et_3N, CH_2Cl_2, 1nuit. c) NaN_3, CH_3CN, 95℃, 48h. d) ApTs, MeOH, reflux.

Schéma 70 : Synthèse du TEG azido-alcool **33**

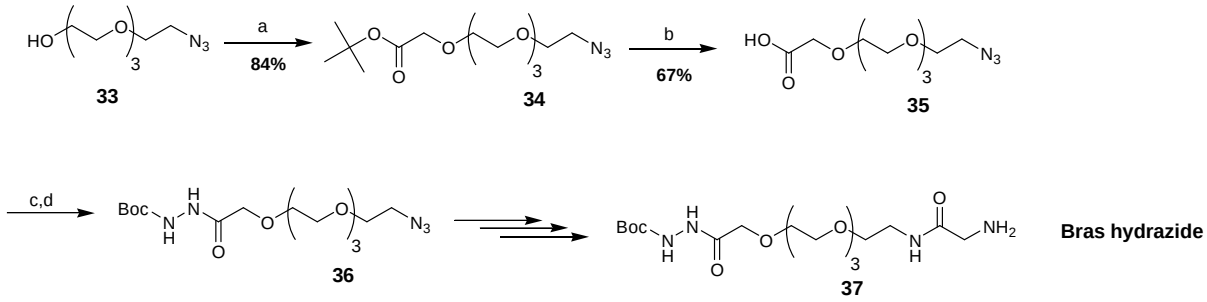
Ce TEG monotrityle **31** est ensuite mis en réaction avec du chlorure de mésyle en présence de triéthylamine pour former le dérivé mésylé correspondant. Ce dernier subit une substitution nucléophile par l'azoture de sodium pour conduire au composé **32**. Le rendement sur ces deux étapes est de 62%. Le groupement trityle est ensuite clivé en milieu acide en présence d'acide *para*-toluènesulfonique en quantité catalytique pour conduire à l'azido-alcool **33** avec un bon rendement. Les modes opératoires de préparations des molécules **32** et **33** ont été adaptés d'une publication de Tahtaoui *et al.*[62].

Le TEG azido-alcool **33**, synthétisé en 4 étapes avec un rendement global de 53%, a ensuite été utilisé pour la synthèse des bras hydrazide et aminooxy.

III.4.3 Synthèse du bras hydrazide

Dans cette nouvelle stratégie (Schéma 71), nous avons opté pour des conditions de synthèse faisant intervenir la soude pour former l'alcoolate de **33**. Cela nécessite de travailler en milieu

biphasique et d'utiliser un agent de transfert de phase. L'azido-alcool **33** est mis en réaction avec le bromoacétate de *tert*-butyle, en présence de bromure de tétrabutylammonium qui est un agent de transfert de phase, dans un milieu biphasique toluène/eau avec de la soude concentrée[67]. Le composé **34** est ainsi obtenu avec 84% de rendement.



a) $BrCH_2CO_2tBu$, TBABr, toluène, $NaOH_{aq}$ 12,5N. b) TFA. c) DCC, HOSu. d) $BocNHNH_2$.

Schéma 71 : Synthèse du bras hydrazide

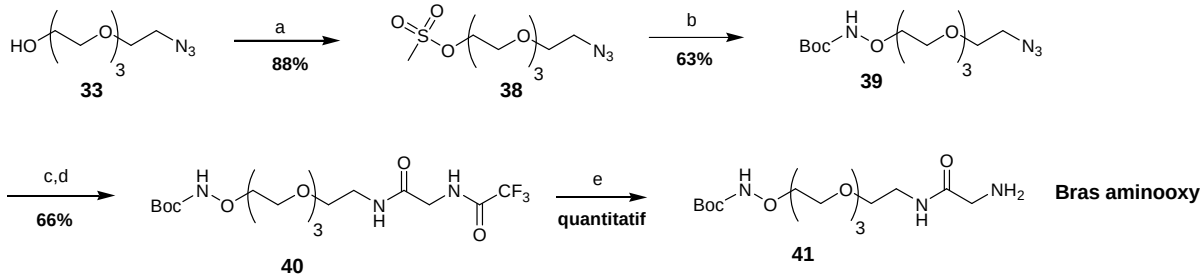
L'ester de *tert*-butyle de **34** est ensuite clivé en milieu acide trifluoroacétique pour conduire à l'acide carboxylique correspondant **35** avec un rendement de 67%. L'étape suivante, consistant à coupler la Boc-hydrazine au bras espaceur, s'est avérée ardue. Nous avons tout d'abord tenté un couplage peptidique classique en présence de DCC (cf. protocole 1, partie expérimentale). Dans ces conditions, en dépit d'un temps de réaction de 48 h et de la formation de DCU (dicyclohexylurée), la purification du milieu réactionnel n'a permis d'isoler que les réactifs de départ.

Face à ce résultat, nous nous sommes orientés vers un couplage passant par la formation d'un ester activé de *N*-hydroxysuccinimide, plus réactif. Nous avons alors mis en œuvre cette réaction, adaptée d'un protocole décrit par Huber *et al.*[79], en faisant réagir le composé **35** avec le DCC et le *N*-hydroxysuccinimide (cf. protocole 2, partie expérimentale). L'ester activé formé est isolé du milieu réactionnel par extraction, avant d'être mis directement en réaction avec la Boc-hydrazine. La tentative de purification du brut réactionnel, après lavages, conduit à l'isolement d'un mélange de produits dont le produit de couplage **36** mais avec un très faible rendement et une pureté moyenne.

Une synthèse multi-étape avec un intermédiaire ayant les caractéristiques du produit que nous avons obtenu n'est pas souhaitable. Les conditions de synthèse de l'hydrazide **36** sont à optimiser afin d'augmenter le rendement et la pureté de celui-ci. Nous avons donc mis cette voie de côté et nous nous sommes focalisés sur le bras aminooxy.

III.4.4 Synthèse du bras aminooxy

Nous avons synthétisé le bras aminooxy à partir de l'azido-alcool **33** selon le schéma ci-dessous.



a) MsCl, Et_3N, CH_2Cl_2, 1nuit. b) BocNHOH, DBU, THF. c) PPh_3, THF/H_2O, 60°C. d) TFA-Gly, EDC. e) $NH_3/MeOH/H_2O$, 40°C , 1 nuit

Schéma 72 : Synthèse du bras aminooxy

La fonction alcool de l'azido-alcool **33** est activée par du chlorure de mésyle en présence de triéthylamine pour conduire au composé **38**, avec un rendement de 88%. Pour introduire le groupement aminooxy sur le bras espaceur, nous avons utilisé la méthode de préparation d'hydroxylamines *O*-substituées développée par Albrecht *et al.*[74]. La Boc-hydroxylamine est mise en réaction avec l'azido-alcool mésylé **38** en présence de DBU pour conduire à la Boc-hydroxylamine *O*-substituée **39** avec un rendement de 63%. Il s'en suit la réduction du groupement azido de **39** en amine en présence de triphénylphosphine dans un milieu THF/H_2O (8/2) à 60°C. Cette réaction se fait avec un rendement quantitatif. La réduction de Staudinger (cf. Schéma 40) permettant de réduire les azotures en amines se fait dans des conditions plus douces qu'une hydrogénolyse. L'amine précédemment formée est couplée à la *N*-TFA-glycine en présence d'EDC, qui permet d'activer la fonction acide de la glycine, conduisant ainsi au composé **40** avec un rendement de 66%. Enfin, la dernière étape consiste à déprotéger la fonction amine en milieu basique à chaud dans une solution $MeOH/NH_3/H_2O$ pendant une nuit pour obtenir le bras aminooxy **41** avec un rendement quantitatif.

Nous avons ainsi réussi à synthétiser un bras espaceur hétérobifonctionnel de type PEG ayant à une extrémité une fonction amine et à l'autre une fonction aminooxy protégée par un groupement Boc en 9 étapes, avec un rendement global de 19%.

Le bras espaceur étant synthétisé, nous pouvons l'utiliser en tant qu'amorceur lors de la polymérisation du Lys(TFA)-NCA en phase aqueuse afin de synthétiser les bioconjugués DGL-bras espaceur-molécule modèle.

III.5 Synthèse des bioconjugués

Nous avons synthétisé nos bioconjugués en suivant la stratégie représentée dans le schéma ci-dessous.

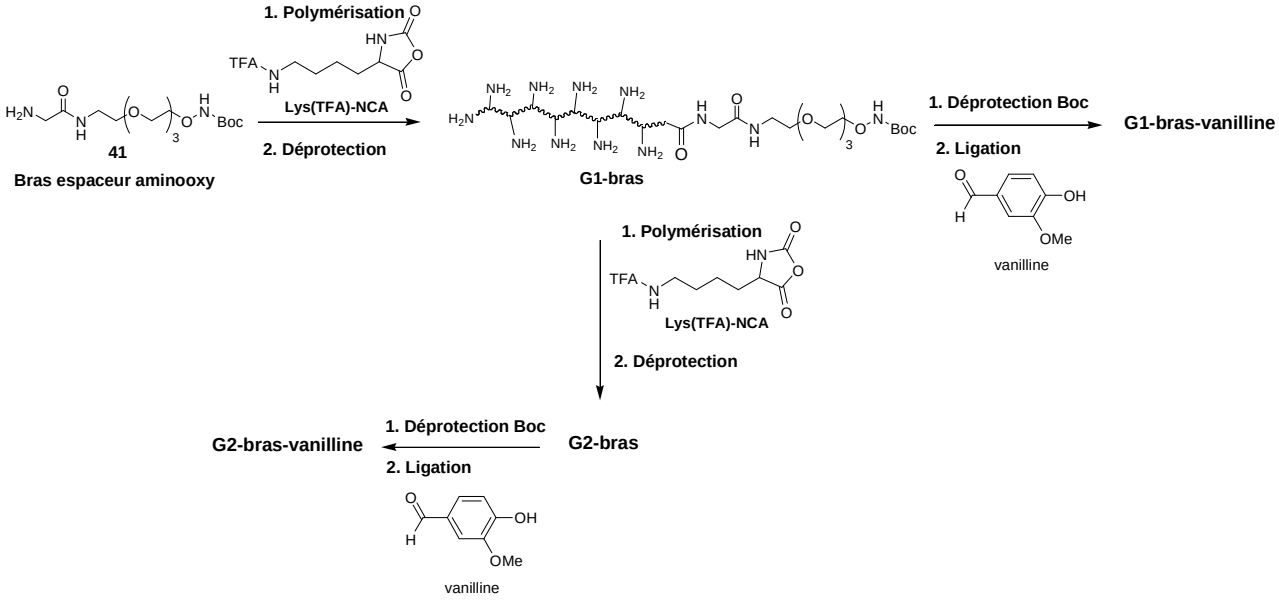


Schéma 73 : Principe de synthèse du bioconjugué DGL-bras-vanilline

Notre bras espaceur aminooxy **41** amorce la polymérisation du Lys(TFA)-NCA pour conduire, après déprotection des amines epsilon des résidus lysine, au conjugué **G1-bras**. Celui-ci est utilisé en tant que macroamorceur pour initier la polymérisation du Lys(TFA)-NCA afin d'obtenir, après déprotection des amines des chaînes latérales des résidus lysine, le conjugué **G2-bras**. Enfin, afin de valider le principe de ligation entre nos conjugués DGL-bras et un composé ayant une fonction aldéhyde, plutôt que d'utiliser un anticorps ou un principe actif onéreux, nous avons choisi une molécule modèle la vanilline. Dans les paragraphes qui suivent, nous détaillerons les étapes de synthèse des bioconjugués.

III.5.1 Synthèse de G1-bras

Nous avons synthétisé **G1-bras** en nous basant sur les conditions réactionnelles mises au point dans le chapitre précédent, notamment avec l'amorceur de type PEG **AM8** qui a une structure proche de celle du bras aminooxy **41**. Lors du premier essai, nous avons obtenu un produit contenant 20% de **G1**. En ajustant les conditions réactionnelles, nous avons réussi à obtenir un produit à teneur limitée en **G1** (≈ 5%) comme le montre la figure 20 ci-après.

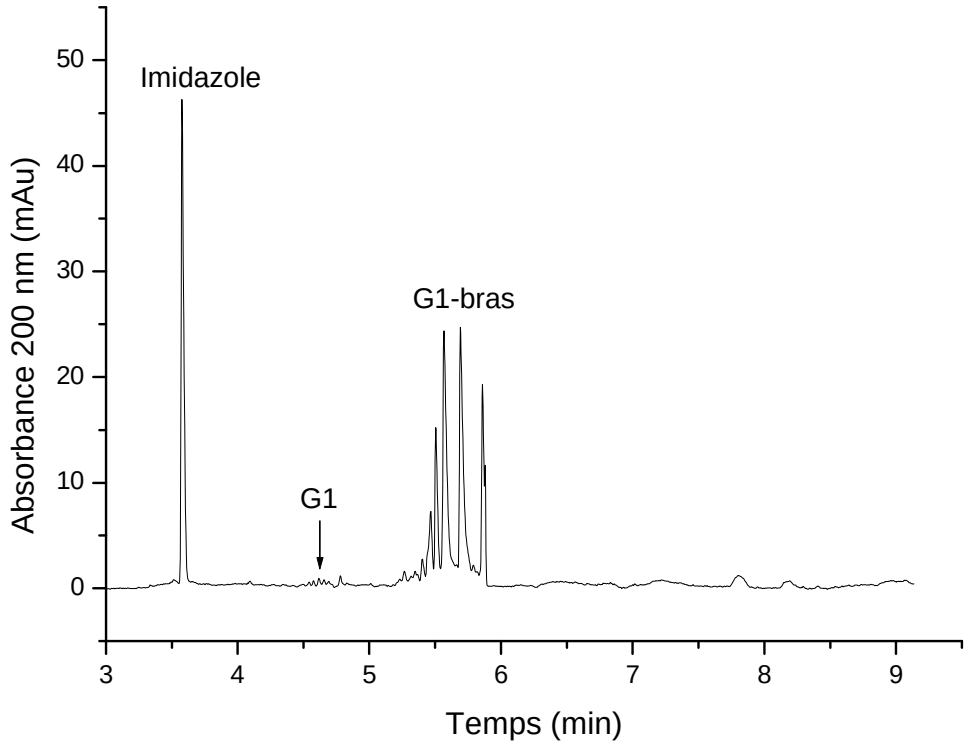


Figure 20 : Electrophérogramme de **G1-bras**. *Conditions électrophorétiques : capillaire de silice vierge, 58,5 cm (50 cm à la fenêtre de détection) x 50 µm. Electrolyte : tampon 125 mM NaH_2PO_4 / 125 mM H_3PO_4 (pH = 2). Tension appliquée : + 20 kV. Détection UV à 200 nm. Marqueur de flux : imidazole 0,5 g/L. Concentration de l'échantillon : 5 g/L.*

G1-bras étant synthétisé et caractérisé, nous allons aborder la synthèse de la deuxième génération.

III.5.2 Synthèse de G2-bras

G2-bras a été synthétisé selon le même principe que **G2**. Dans ce cas, le macroamorceur de polymérisation est **G1-bras** précédemment préparé. Le produit isolé, après clivage des groupements trifluoroacétyles, est analysé par électrophorèse capillaire. La figure suivante présente l'électrophérogramme obtenu lors de cette analyse.

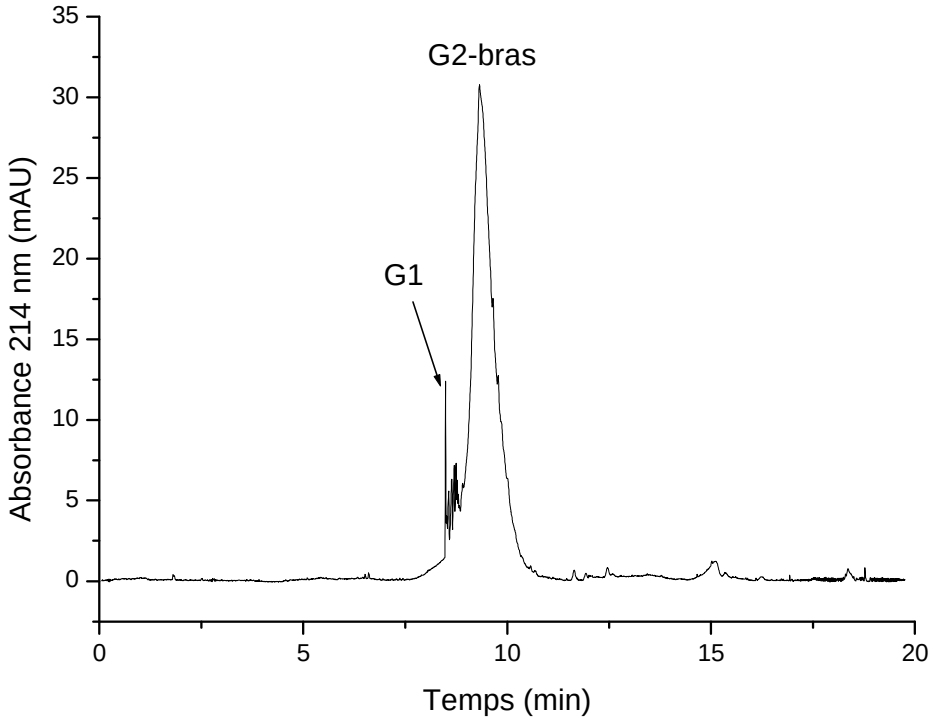


Figure 21 : Electrophérogramme de **G2-bras**. *Conditions électrophorétiques : capillaire de silice vierge, 58,5 cm (50 cm à la fenêtre de détection) x 50 µm. Electrolyte : tampon 125 mM NaH_2PO_4 / 125 mM H_3PO_4 (pH = 2). Tension appliquée : + 20 kV. Détection UV à 214 nm. Concentration de l'échantillon : 5 g/L.*

Nous voyons sur la figure ci-dessus que le produit synthétisé est majoritairement du **G2-bras**, avec une quantité résiduelle de **G1** qui se serait formé lors de la polymérisation. Il est possible de le purifier sur colonne Sephadex® cependant la pureté du produit obtenu est satisfaisante pour l'utilisation envisagée.

La synthèse de **G2-bras** étant achevée, nous allons aborder dans le paragraphe suivant les aspects concernant la ligation des DGL **G1-bras** et **G2-bras** pour en démontrer la faisabilité.

III.5.3 Ligation

Nous rappelons que nous avons choisi de mettre en œuvre une ligation de type oxime afin de réaliser un conjugué entre le DGL-bras et un aldéhyde. Bien que les amines des chaînes latérales du DGL-bras soient capables de réagir avec l'aldéhyde pour former des liaisons imines, il est admis dans la littérature qu'en dépit de leurs caractères réversibles, les liaisons oximes ($K_{éq} > 10^8\ M^{-1}$) [80]sont plus stables que les liaisons imines. La réaction de ligation est

une réaction lente d'une manière générale, mais comme l'ont démontré Dirksen *et al.*[81] elle peut être catalysée, dans le cas de la ligation oxime, par de l'aniline.

Afin de démontrer la faisabilité de la ligation avec les DGL **G1-bras** et **G2-bras**, nous avons choisi d'utiliser la vanilline comme aldéhyde qui, bien que relativement peu réactif, a la particularité d'avoir un spectre UV caractéristique avec un maximum d'absorption à 300 nm. Les DGL **G1**, **G2**, **G1-bras** et **G2-bras** n'absorbent pas à cette longueur d'onde.

Après déprotection des fonctions oximes de **G1-bras** et **G2-bras** en milieu acide trifluoroacétique, nous avons préparé quatre solutions contenant de la vanilline et respectivement du **G1**, **G2**, **G1-bras** et **G2-bras**. Nous nous sommes placés en milieu dilué (100 µM pour chaque réactif), comme lors d'une ligation avec une biomolécule[80]. La réaction est réalisée à température ambiante et à pH 2. Chaque solution est analysée par CLHP à t = 0 et à t = 48 h. Dans la figure 22A ci-dessous, nous avons représenté une superposition des chromatogrammes enregistrés à 210 nm et 300 nm, d'une solution contenant **G1-bras** seul. Ainsi que ceux enregistrés à 300 nm, des solutions contenant la vanilline et respectivement **G1**, servant de témoin, et **G1-bras**. L'équivalent avec **G2**, **G2-bras** et la vanilline est représenté sur la figure 22B.

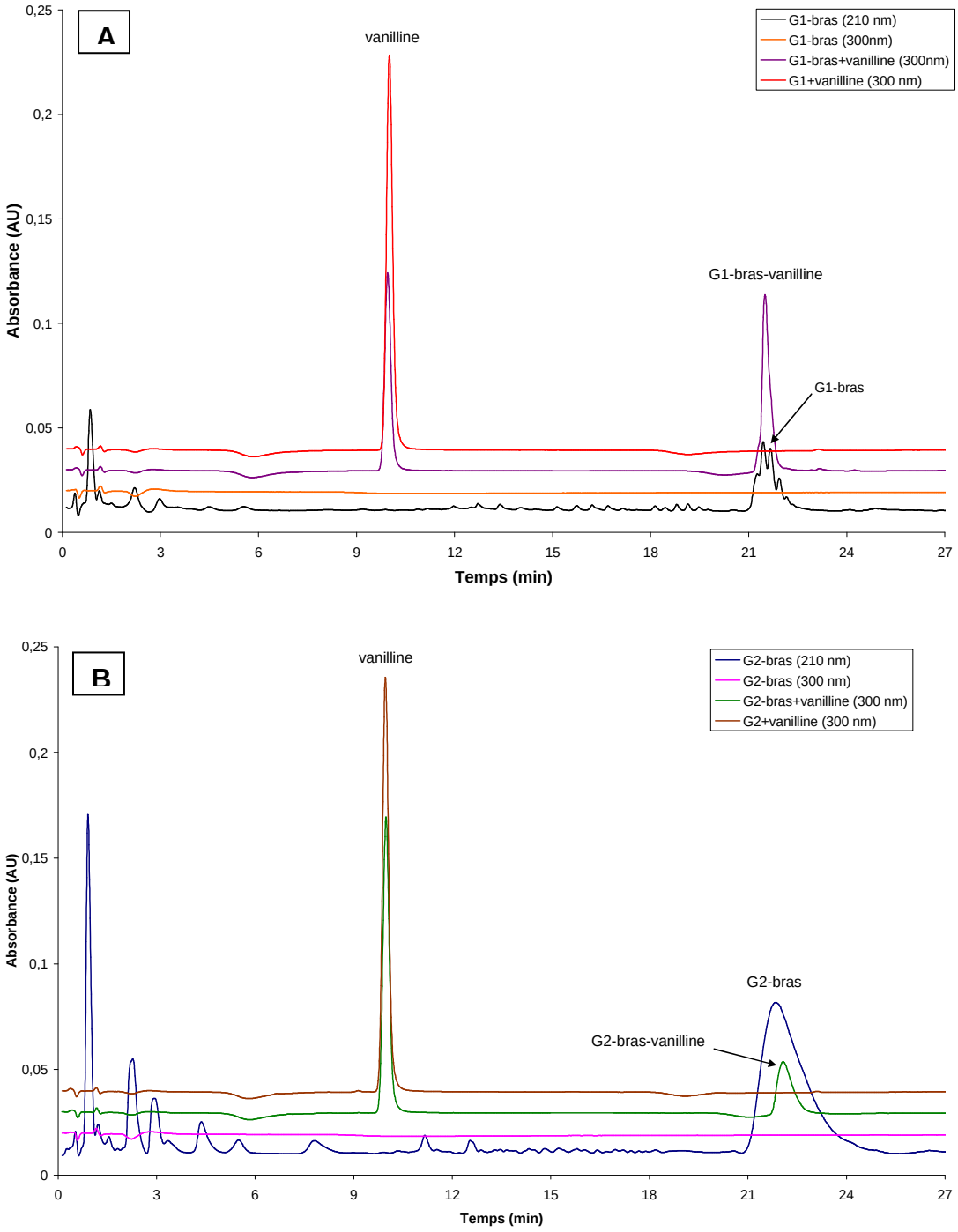


Figure 22 : A) chromatogrammes des solutions contenant **G1-bras**, **G1-bras** + vanilline (t=48h) et **G1** + vanilline (t=48h). **B)** chromatogrammes des solutions contenant **G2-bras**, **G2-bras** + vanilline (t=48h) et **G2** + vanilline (t=48h). Conditions : colonne silice greffée C_{18} ; gradient H_2O/CH_3CN (100/0 – 0/100) en 40 min ; détection UV.

Nous observons premièrement sur la figure 22A que **G1-bras** absorbe en UV à 210 nm mais pas à 300 nm. Ensuite au bout de 48 heures de réaction avec la vanilline, nous remarquons sur le chromatogramme correspondant, à 300 nm, la présence d'un pic, avec un temps de rétention de 21,5 min, traduisant la formation d'une liaison oxime entre **G1-bras** et la

vanilline. Ce composé a le même temps de rétention que **G1-bras** seul à 210 nm, ce qui prouve qu'il s'agit bien du produit de ligation. En outre, sur le chromatogramme correspondant à la solution servant de témoin, contenant **G1** et la vanilline, à 300 nm, nous remarquons qu'il n'y a qu'un pic attribué à la vanilline. Cela valide le fait qu'il n'y a pas de réaction entre **G1** et la vanilline dans les conditions expérimentales mises en œuvre ici. Les mêmes observations que précédemment peuvent être faites à propos de la figure 22B, permettant de conclure que la réaction de ligation a lieu entre **G2-bras** et la vanilline mais pas entre **G2** et la vanilline.

Au travers ces expériences, nous avons d'une part vérifié que le DGL natif en présence de vanilline ne conduit pas à la formation d'un produit de couplage du à la réaction des amines sur l'aldéhyde. D'autre part, nous avons montré que la ligation entre les DGL dotés d'un bras espaceur porteur d'une fonction oxime et la vanilline est effective à une concentration de 100 µM. Ainsi, la faisabilité de la ligation oxime entre le DGL-bras et un aldéhyde est validée. Néanmoins, le système peut être encore amélioré en optimisant les conditions de ligation (aldéhyde plus réactif, catalyseur[81]) afin d'obtenir une réaction totale en un minimum de temps.

III.6 Conclusion

Tout au long du travail exposé dans cette partie, nous nous sommes attachés à présenter les aspects relatifs à l'élaboration d'un bioconjugué DGL-bras espaceur-molécule active, la molécule active étant remplacée par la vanilline, servant de modèle. La première étape de la préparation de cette entité a été la synthèse d'un bras espaceur, basée sur le tétraéthylène glycol, contenant une fonction amine permettant l'initiation de la polymérisation de Lys(TFA)-NCA (synthèse du DGL) et une autre autorisant des réactions de ligation chimique pour introduire la vanilline. A cet effet, nous avons développé une stratégie permettant la préparation de deux bras espaceurs, conduisant à deux types de ligations différentes : le bras hydrazone, non achevé car nécessitant une optimisation, et le bras aminooxy (ligation oxime), réalisé avec succès. De là, nous avons synthétisé **G1-bras** et **G2-bras** en utilisant le bras aminooxy comme amorceur de polymérisation du Lys(TFA)-NCA préparé *in situ*. La faisabilité de la ligation a ensuite été testée avec la vanilline sur les DGL-bras synthétisés, en milieu dilué. L'analyse par CLHP de chacun des milieux réactionnels ainsi que des solutions

témoins (DGL et vanilline) a permis de valider la faisabilité de la ligation pour chaque DGL-bras et de démontrer la sélectivité de celle-ci vis-à-vis de la fonction aminooxy.

Sur cette base, il est envisageable d'étendre les résultats obtenus en optimisant les conditions de ligation et en étudiant l'influence de la longueur du bras fonctionnalisé sur l'efficacité du couplage. Il serait intéressant aussi de moduler la fonction assurant la ligation et de tester la faisabilité de ces réactions avec une biomolécule de type anticorps ou protéine.

Références bibliographiques

1. Klok, H.-A.; Rodriguez-Hernandez, J. *Macromolecules* **2002,** *35*, 8718-8723.
2. Klok, H.-A.; Rodriguez-Hernandez, J.; Müllen, K. In *WO/2003/064452*, 2003.
3. Rodriguez-Hernandez, J.; Gatti, M.; Klok, H.-A. *Biomacromolecules* **2003,** *4*, 249-258.
4. Tsogas, I.; Theodossiou, T.; Sideratou, Z.; Paleos, C. M.; Hélène Collet; Rossi, J.-C.; Romestand, B.; Commeyras, A. *Biomacromolecules* **2007,** *8*, 3263-3270.
5. Romestand, B.; Rolland, J. L.; Commeyras, A.; Coussot, G.; Desvignes, I.; Pascal, R.; Vandenabeele-Trambouze, O. *Biomacromolecules* **2010,** *11*, 1169-1173.
6. Pasut, G.; Veronese, F. M. *Progress in Polymer Science* **2007,** *32*, 933-961.
7. Zalipsky, S. *Bioconjugate Chemistry* **1995,** *6*, 150-165.
8. Working, P. K.; Newman, M. S.; Johnson, J.; Cornacoff, J. B. In *Poly(ethylene glycol);* Harris, J. M.; Zalipsky, S. Eds.; American Chemical Society Books: Washington, DC, 1997; pp. 45-57.
9. Decostaire, I. Th. Chimie/ Chimie organique et bioorganique, Université d'Orléans, 2008.
10. Hackenberger, C. P. R.; Schwarzer, D. *Angewandte Chemie International Edition* **2008,** *47*, 10030-10074.
11. Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Angewandte Chemie International Edition* **2009,** *48*, 6974-6998.
12. Lu, K.; Duan, Q.-P.; Ma, L.; Zhao, D.-X. *Bioconjugate Chemistry* **2010,** *21*, 187-202.
13. Schnölzer, M.; Kent, S. B. *Science* **1992,** *256*, 221-225.
14. Muir, T. W. *Structure* **1995,** *3*, 649-652.
15. Coltart, D. M. *Tetrahedron* **2000,** *56*, 3449-3491.
16. Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. *Science* **1994,** *266*, 776-779.
17. Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. *Organic Letters* **2000,** *2*, 1939-1941.
18. Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. *Organic Letters* **2001,** *3*, 9-12.
19. Nilsson, B. L.; Hondal, R. J.; Soellner, M. B.; Raines, R. T. *Journal of the American Chemical Society* **2003,** *125*, 5268-5269.
20. Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. *Organic Letters* **2000,** *2*, 2141-2143.
21. Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science* **2000,** *287*, 2007-2010.

22. Staudinger, H.; Meyer, J. *Helvetica Chimica Acta* **1919,** *2*, 635-646.

23. Kimmerlin, T.; Seebach, D. *The Journal of Peptide Research* **2005,** *65*, 229-260.

24. Josan, J. S.; Morse, D. L.; Xu, L.; Trissal, M.; Baggett, B.; Davis, P.; Vagner, J.; Gillies, R. J.; Hruby, V. J. *Organic Letters* **2009,** *11*, 2479-2482.

25. Inamori, K.; Kyo, M.; Matsukawa, K.; Inoue, Y.; Sonoda, T.; Tatematsu, K.; Tanizawa, K.; Mori, T.; Katayama, Y. *Analytical Chemistry* **2008,** *80*, 643-650.

26. Liu, C. F.; Tam, J. P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994,** *91*, 6584-6588.

27. Liu, C.-F.; Tam, J. P. *Journal of the American Chemical Society* **1994,** *116*, 4149-4153.

28. Brunel, F. M.; Lewis, J. D.; Destito, G.; Steinmetz, N. F.; Manchester, M.; Stuhlmann, H.; Dawson, P. E. *Nano Letters* **2010,** *10*, 1093-1097.

29. Rose, K. *Journal of the American Chemical Society* **1994,** *116*, 30-33.

30. Singh, Y.; Defrancq, E.; Dumy, P. *The Journal of Organic Chemistry* **2004,** *69*, 8544-8546.

31. Clave, G.; Boutal, H.; Hoang, A.; Perraut, F.; Volland, H.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2008,** *6*, 3065-3078.

32. van Dijk, M.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J.; van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E. *Bioconjugate Chemistry* **2009,** *20*, 2001-2016.

33. Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chemical Reviews* **2008,** *108*, 2952-3015.

34. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angewandte Chemie International Edition* **2002,** *41*, 2596-2599.

35. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *The Journal of Organic Chemistry* **2002,** *67*, 3057-3064.

36. Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007,** *104*, 16793-16797.

37. Clark, M.; Kiser, P. *Polymer International* **2009,** *58*, 1190-1195.

38. Kele, P.; Li, X.; Link, M.; Nagy, K.; Herner, A.; Lorincz, K.; Beni, S.; Wolfbeis, O. S. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009,** *7*, 3486-3490.

39. Lindstrom, U. M. *Chemical Reviews* **2002,** *102*, 2751-2772.

40. Hill, K. W.; Taunton-Rigby, J.; Carter, J. D.; Kropp, E.; Vagle, K.; Pieken, W.; McGee, D. P. C.; Husar, G. M.; Leuck, M.; Anziano, D. J.; Sebesta, D. P. *The Journal of Organic Chemistry* **2001,** *66*, 5352-5358.

41. Berkin, A.; Coxon, B.; Pozsgay, V. *Chemistry - A European Journal* **2002,** *8*, 4424-4433.

42. Pozsgay, V.; Vieira, N. E.; Yergey, A. *Organic Letters* **2002,** *4*, 3191-3194.

43. de Araújo, A. D.; Jose, M. P.; Janina, C.; Oliver, S.; Kirill, A.; Herbert, W. *Chemistry - A European Journal* **2006,** *12*, 6095-6109.

44. de Araújo, A. D.; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Köhn, M.; Schröder, H.; Wacker, R.; Niemeyer, C.; Alexandrov, K.; Waldmann, H. *Angewandte Chemie International Edition* **2006,** *45*, 296-301.

45. Bertozzi, C. R.; Bednarski, M. D. *The Journal of Organic Chemistry* **1991,** *56*, 4326-4329.

46. Lebeau, L.; Oudet, P.; Mioskowski, C. *Helvetica Chimica Acta* **1991,** *74*, 1697-1706.

47. Houseman, B. T.; Mrksich, M. *The Journal of Organic Chemistry* **1998,** *63*, 7552-7555.

48. Keegstra, E. M. D.; Zwikker, J. W.; Roest, M. R.; Jenneskens, L. W. *The Journal of Organic Chemistry* **1992,** *57*, 6678-6680.

49. Chen, Y.; Baker, G. L. *The Journal of Organic Chemistry* **1999,** *64*, 6870-6873.

50. Thompson, M. S.; Vadala, T. P.; Vadala, M. L.; Lin, Y.; Riffle, J. S. *Polymer* **2008,** *49*, 345-373.

51. Svedhem, S.; Hollander, C. A.; Shi, J.; Konradsson, P.; Liedberg, B.; Svensson, S. C. T. *The Journal of Organic Chemistry* **2001,** *66*, 4494-4503.

52. Kim, J.; Morozumi, T.; Nakamura, H. *Organic Letters* **2007,** *9*, 4419-4422.

53. Xie, H.; Braha, O.; Gu, L.-Q.; Cheley, S.; Bayley, H. *Chemistry & Biology* **2005,** *12*, 109-120.

54. Ashton, P. R.; Huff, J.; Menzer, S.; Parsons, I. W.; Preece, J. A.; Stoddart, J. F.; Tolley, M. S.; White, A. J. P.; Williams, D. J. *Chemistry - A European Journal* **1996,** *2*, 31-44.

55. Bouzide, A.; Sauve, G. *Organic Letters* **2002,** *4*, 2329-2332.

56. Bouzide, A.; Sauvé, G. *Tetrahedron Letters* **1997,** *38*, 5945-5948.

57. Frisch, B.; Boeckler, C.; Schuber, F. *Bioconjugate Chemistry* **1996,** *7*, 180-186.

58. Gong, Y.; Luo, Y.; Bong, D. *Journal of the American Chemical Society* **2006,** *128*, 14430-14431.

59. Wang, Q.; Graham, K.; Schauer, T.; Fietz, T.; Mohammed, A.; Liu, X.; Hoffend, J.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M.; Mier, W. *Nuclear Medicine and Biology* **2004,** *31*, 21-30.

60. Branderhorst, H. M.; Liskamp, R. M. J.; Visser, G. M.; Pieters, R. J. *Chemical Communications* **2007**, 5043-5045.

61. Menger, F. M.; Lu, H.; Lundberg, D. *Journal of the American Chemical Society* **2007,** *129*, 272-273.

62. Tahtaoui, C.; Parrot, I.; Klotz, P.; Guillier, F.; Galzi, J. L.; Hibert, M.; Ilien, B. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004,** *47*, 4300-4315.

63. Salo, H.; Virta, P.; Hakala, H.; Prakash, T. P.; Kawasaki, A. M.; Manoharan, M.; Lonnberg, H. *Bioconjugate Chemistry* **1999,** *10*, 815-823.

64. Richard, A.; Bourel-Bonnet, L. *Chemistry - A European Journal* **2005,** *11*, 7315-7321.

65. Ahmed, S. A.; Tanaka, M. *The Journal of Organic Chemistry* **2006,** *71*, 9884-9886.

66. Bhosale, S.; Bhosale, S.; Wang, T.; Kopaczynska, M.; Fuhrhop, J. H. *Journal of the American Chemical Society* **2006,** *128*, 2156-2157.

67. Van Boeckel, C. A. A.; Buijsman, R. C.; De Kort, M.; Meuleman, D. G. In *Eur. Pat. Appl.;* Sanofi-Aventis Ed.: France, 2005.

68. Seitz, O.; Kunz, H. *The Journal of Organic Chemistry* **1997,** *62*, 813-826.

69. Miller, M. L.; Roller, E. E.; Zhao, R. Y.; Leece, B. A.; Ab, O.; Baloglu, E.; Goldmacher, V. S.; Chari, R. V. J. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004,** *47*, 4802-4805.

70. Dziadek, S.; Jacques, S.; Bundle, David R. *Chemistry - A European Journal* **2008,** *14*, 5908-5917.

71. Jeong, S. W.; O'Brien, D. F. *The Journal of Organic Chemistry* **2001,** *66*, 4799-4802.

72. Christman, K. L.; Broyer, R. M.; Tolstyka, Z. P.; Maynard, H. D. *Journal of Materials Chemistry* **2007,** *17*, 2021-2027.

73. Jones, D. S.; Hammaker, J. R.; Tedder, M. E. *Tetrahedron Letters* **2000,** *41*, 1531-1533.

74. Albrecht, S.; Defoin, A.; Tarnus, C. *Synthesis* **2006,** *2006*, 1635-1638.

75. Holder, P. G.; Francis, M. B. *Angewandte Chemie International Edition* **2007,** *46*, 4370-4373.

76. Rauf, A.; Sharma, S.; Gangal, S. *Arkivoc* **2007**, 137-147.

77. Wang, Y.; Li, L.; Jiang, W.; Yang, Z.; Zhang, Z. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006,** *16*, 2974-2977.

78. Adamczyk, M.; Fishpaugh, J. R.; Thiruvazhi, M. *Organic Preparations and Procedures International* **2002,** *34*, 326-331.

79. Gaertner, H. F.; Rose, K.; Cotton, R.; Timms, D.; Camble, R.; Offord, R. E. *Bioconjugate Chemistry* **1992,** *3*, 262-268.

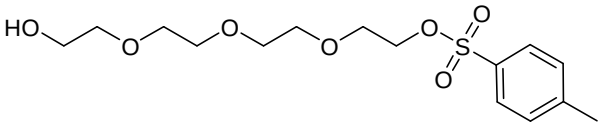
80. Dirksen, A.; Dawson, P. E. *Bioconjugate Chemistry* **2008,** *19*, 2543-2548.

81. Dirksen, A.; Hackeng, T. M.; Dawson, P. E. *Angewandte Chemie International Edition* **2006,** *45*, 7581-7584.

Partie expérimentale

Les spectres RMN ^{1}H ont été enregistrés à 200 MHz sur appareil BRUKER DPX 200 et à 300 MHz sur un appareil Bruker Avance 300. Les spectres RMN ^{13}C et ^{19}F ont aussi été enregistrés sur ce même appareil. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm. Les spectres de masse haute résolution ont été effectués en ESI sur un appareil Microman Q-Tof et les spectres de masses MALDI-TOF sur un BRUKER Ultraflex. Les analyses par électrophorèse capillaires ont été réalisées sur un appareil Agilent EC muni d'un détecteur UV à barette de diodes. Les analyses CLHP ont été réalisées sur un appareil Waters 2690 Separations Module muni d'un détecteur UV Waters 996 Photodiode Array Detector. La colonne utilisée est une Hypersil BDS C18 50x2,1 mm 3µm d.i.

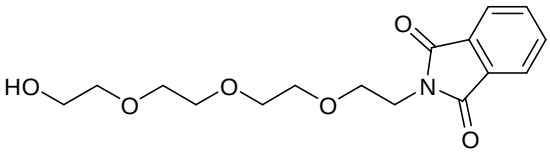
2-(2-(2-(2-hydroxyéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthyl 4-méthylbenzènesulfonate (26)



MM : 348,51 g/mol

A une solution d'hydroxyde de sodium (1,23 g, 30,75 mmol) dans 7 mL d'eau est additionnée une solution de tétraéthylène glycol (40,39 g, 208 mmol) dans 7 mL de THF. Le mélange est refroidi à 0°C puis du chlorure de *p*-toluènesulfonyle (3,67 g, 19,25 mmol) en solution dans 22 mL de THF est ajouté sous agitation pendant 1h. Le mélange est agité à 0°C pendant 2h puis est versé dans 250 mL d'eau glacée. La solution se trouble. La phase organique est extraite avec 4x100mL de CH_2Cl_2. Chaque phase organique est lavée séparément avec 2x50 mL d'eau. Les phases organiques sont rassemblées puis séchées avec du sulfate de sodium anhydre. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Il en résulte une huile incolore (6,37 g).
Rendement : 95% (par rapport au TsCl)
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 200MHz) δ = 2.44 (3H, s, CH_3), 3.58-3.70 (15H, m, CH_2-O et OH), 4.13-4.15 (m, 2H, CH_2-S), 7,34 (d, 2H, $H_{aromatiques}$), 7,79 (d, 2H, $H_{aromatiques}$).

2-(2-(2-(2-(2-hydroxyéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthyl)isoindoline-1,3-dione (27)



MM : 323,34 g/mol

Un mélange de tétraéthylène glycol monotosylate **26** (6,35 g, 18,23 mmol) et de phtalimide de potassium (6,62g, 35,74 mmol) en solution dans 42 mL de DMF anhydre est dégazé pendant 15 min puis chauffé à reflux pendant une nuit sous azote. Une partie du DMF, solvant difficile à éliminer, est chassée sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif en chauffant à 60°C. Le résidu est dissout dans 200 mL de CH_2Cl_2 et lavé avec 2x10 mL de $Na_2CO_{3\ aq}$. Le lavage permet d'éliminer l'excès de phtalimide de potassium et le chlorure de tosyle résiduel provenant de l'étape précédente. Les phases aqueuses sont rassemblées et extraites avec 2x50 mL de CH_2Cl_2. Les phases organiques sont rassemblées et séchées avec du Na_2SO_4 anhydre. Le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice.

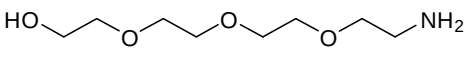
Eluant : CH_2Cl_2/MeOH (100/0 – 100/5)

Le produit final est séché à 40°C avec un dessiccateur sous vide (pompe à palette) pendant 4h pour éliminer le maximum de DMF.

Rendement: 65% (3,83 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 200MHz) δ = 3.20 (1H, s, OH), 3.41-3.62 (14H, m, CH_2-O), 3.73 (2H, m, $C\underline{H}_2$-NH_2), 7.60 (2H, m, $H_{aromatiques}$), 7.69 (2H, m, $H_{aromatiques}$).

2-(2-(2-(2-aminoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthanol (28)



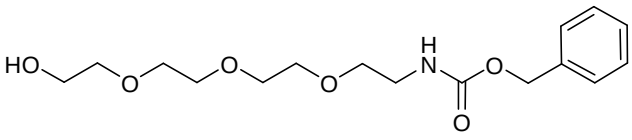
MM : 193,24 g/mol

Un mélange de tétraéthylène glycol monophtalimide **27** (2,93 g, 9,06 mmol) et d'hydrazine monohydrate (0,66 mL, 13,6 mmol) en solution dans 14,6 mL d'éthanol absolu est dégazé puis chauffé à 60°C sous agitation pendant une nuit, sous azote. Le milieu réactionnel est filtré et le filtrat est concentré sous vide. Le résidu est mis en suspension dans le dichlorométhane puis filtré pour éliminer l'insoluble. Le filtrat est refroidi à -18°C pour faire précipiter le reste des impuretés. Le solvant est évaporé sous pression réduite.

Rendement : 80% (1,4 g)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 200MHz) δ = 2.90 (2H, m, C<u>H</u>$_2$-NH_2), 2.97 (3H, s large, OH et NH_2), 3.53-3.74 (14H, m, CH_2-O-)

<u>2-(2-(2-(2-hydroxyéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthylcarbamate de benzyle</u> (29)



MM : 327,37 g/mol

A un mélange de tétraéthylène glycol monoamine **28** (1,3 g, 6,73 mmol) et de triéthylamine (1,86 mL, 13,46 mmol) en solution dans 30 mL de dichlorométhane, est additionné, à l'aide d'une ampoule à brome, du Z-Cl (1,18 mL, 8,08 mmol) dissout dans 10 mL de dichlorométhane. Cette addition se fait lentement, sous agitation et à froid. 10 mL de solvant sont ajoutés dans l'ampoule à la fin de l'addition pour la rincer. L'agitation se poursuit pendant 1 nuit.

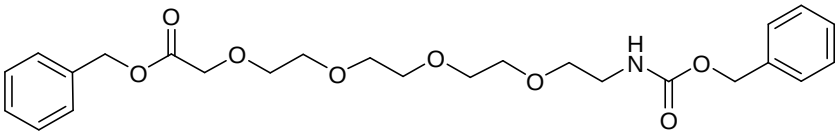
Afin de réaliser une extraction, 60 mL de dichlorométhane sont ajoutés au milieu réactionnel afin d'obtenir 100 mL de phase organique. Un lavage est effectué avec 2x50 mL d'HCl 1N. Puis, les phases aqueuses sont rassemblées et lavées avec 2x50 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées et séchées avec du sulfate de sodium anhydre et le solvant est évaporé sous vide. Une purification par chromatographie sur colonne de silice est réalisée.

Eluant : CH_2Cl_2/MeOH (95/5)

Rendement : 89% (1,96 g)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 200MHz) δ = 2.98 (2H, m, C<u>H</u>$_2$-NH_2), 3.54-3.72 (15H, m, CH_2-O et OH), 5.12 (2H, s, CH_2-O-C=O), 7,34 (5H, m, $H_{aromatiques}$)

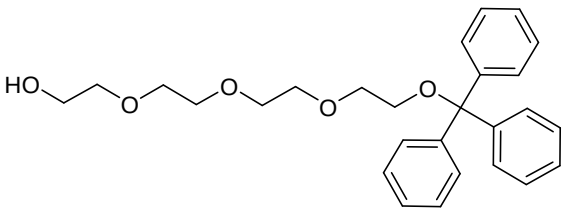
3-oxo-1-phényl-2,7,10,13,16-pentaoxa-4-azaoctadécan-18-oate de benzyle (30)



MM : 475,53 g/mol

A un mélange de tétraéthylène glycol monoamine N-protégé **29** (200 mg, 0,611 mmol) et de tBuOK (109 mg, 0,971 mmol) en solution dans 5 mL de THF est ajouté du bromoacétate de benzyle (0,12 mL, 0,754 mmol). Cette addition se fait sous agitation magnétique, pendant 10 min, à l'aide d'une ampoule à brome et sous azote. L'agitation est maintenue pendant 2 jours. Le THF est ensuite évaporé et est remplacé par 10 mL d'Et_2O afin d'effectuer une extraction. La solution est extraite avec 10 mL de $Na_2CO_{3\ aq}$ puis avec 10 mL de $KHSO_{4\ aq}$. Une première chromatographie sur colonne est effectuée (éluant : CH_2Cl_2/MeOH 97/3) afin d'éliminer le maximum de produits secondaires. Puis une deuxième chromatographie sur colonne (éluant : AcOEt/hexane 1/1 – 1/0 puis AcOEt/MeOH 10/0,5) est réalisée afin d'isoler le produit.
Rendement : 10% (29 mg)
RMN ^1H ($CDCl_3$, 200MHz) δ = 3.40 (2H, m, $C\underline{H}_2$-NH_2), 3.54-3.74 (14H, m, CH_2-O), 4.24 (2H, s, O-CH_2-C=O), 5.12 (2H, s, $C\underline{H}_2$-Ph de l'ester benzylique), 5.4 (2H, s, $C\underline{H}_2$-Ph du carbamate), 5.57 (1H, s large, NH), 7.37 (10H, m, $H_{aromatiques}$)

1,1,1-triphényl-2,5,8,11-tétraoxatridécan-13-ol (31)



MM = 436,54 g/mol

Du chlorure de trityle (3,21 g ; 11,5 mmol) est introduit dans un monocol de 50mL contenant du TEG (22,14 g ; 114 mmol) ainsi que de la pyridine (1,4 mL ; 17,2 mmol). Le milieu réactionnel est chauffé à 45°C sous agitation pendant 1 nuit. Le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante, puis transvasé dans une ampoule à décanter contenant 25 mL d'eau : un trouble apparaît. Après 3h de décantation, la phase inférieure est récupérée et mise à part. La phase supérieure est extraite avec 3x50 mL de toluène. Les phases organiques sont

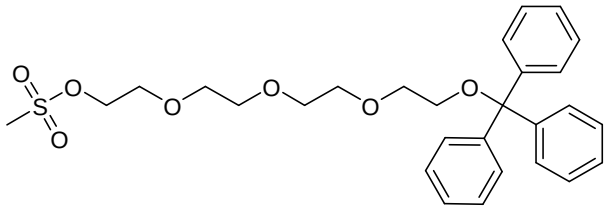
rassemblées et mélangées avec la phase inférieure mise à part précédemment. La phase organique est alors lavée avec 3x30mL d'eau. Cette phase est ensuite séchée avec du sulfate de sodium anhydre sous agitation pendant 1h. La suspension est alors filtrée et le filtrat est concentré sous vide. Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune clair transparente et visqueuse.

Rendement : 98 % (4,92 g)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 200 MHz) δ = 2,41 (1H, s large, OH); 3,17 (2H, t, J = 5 Hz, CH_2OCPh_3); 3,59-3,67 (14H, m, CH_2O); 7,14-7,25 (9H, m, $H_{aromatiques}$); 7,37-7,41 (6H, d, J = 6,8 Hz, $H_{aromatiques}$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 63,99 ; 64,96 ; 72,06 ; 72,34 ; 72,42 ; 74,11 ; 88,19 ($\underline{C}Ph_3$) ; 128,55 ($CH_{aromatique\ en\ para}$) ; 129,39 ($CH_{aromatique\ en\ ortho}$) ; 130,35 ($CH_{aromatique\ en\ méta}$) ; 145,75 ($C_{aromatique}$)

<u>méthanesulfonate de 1,1,1-triphényl-2,5,8,11-tétraoxatridécan-13-yle</u> (31')



MM = 514,63 g/mol

Dans un monocol de 100 mL, sont introduits le TEG monotrityle **31** (6,21 g ; 14,2 mmol) en solution dans 19 mL de CH_2Cl_2 ainsi que la triéthylamine (2,4 mL ; 17 mmol). Le milieu est refroidi à 0°C à l'aide d'un bain de glace. A cette température, le chlorure de mésyle (1,2 mL ; 15,5 mmol) est ajouté. Le mélange est maintenu à 0°C pendant 2h puis l'agitation se poursuit à température ambiante pendant une nuit (suivi CCM : AcOEt/heptane 3/1). La suspension est alors filtrée et le filtrat est concentré sous vide.

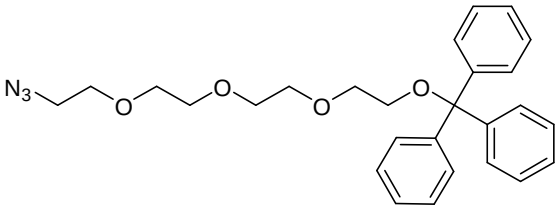
Le brut réactionnel est purifié sur colonne de gel de silice. L'éluant utilisé est AcOEt/heptane (1/1 puis 3/1 une fois l'impureté éliminée).

Rendement : 77 % (5,63 g)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 200 MHz) δ = 2,89 (3H, s, CH_3); 3,15 (2H, t, J = 5,07 Hz, CH_2OCPh_3); 3,59-3,67 (12H, m, CH_2O); 4,21-4,26 (2H, m, CH_2OSO_2); 7,14-7,25 (9H, m, $H_{aromatiques}$); 7,37-7,41 (6H, d, J = 6,8 Hz, $H_{aromatiques}$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 37,59 (CH_3) ; 63,35 ; 69,01 ; 69,33 ; 70,66 ; 70,70 ; 70,75 ; 70,83 ; 86,56 ($\underline{C}Ph_3$) ; 127 ($CH_{aromatique\ en\ para}$) ; 127,82 ($CH_{aromatique\ en\ ortho}$) ; 128,24 ($CH_{aromatique\ en\ méta}$) ; 144,14 ($C_{aromatique}$)

13-azido-1,1,1-triphényl-2,5,8,11-tétraoxatridécane (32)



MM = 461,55 g/mol

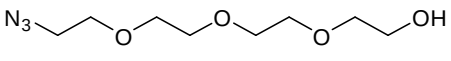
Dans un monocol de 250 mL sont introduits **31'** (5,89 g ; 11,45 mmol) dissout dans 160 mL de CH_3CN anhydre et de l'azoture de sodium (1,14 g ; 17,54 mmol). La suspension est chauffée au reflux de l'acétonitrile sous agitation (suivi CCM : AcOEt/heptane 2/1). Au bout de 48h, une fois le milieu revenu à température ambiante, 270 mL d'eau y sont ajoutés. Le mélange est extrait avec 2x500 mL de CH_2Cl_2. La phase organique est séchée avec du Na_2SO_4 anhydre puis concentrée sous vide. Le résidu est purifié sur colonne de silice (éluant : AcOEt/heptane 2/8).

Rendement : 80 % (4,23 g)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 200 MHz) δ = 3,28 (2H, t, J = 5,0 Hz, CH_2OCPh_3); 3,39 (2H, t, J = 5,1 Hz, CH_2N_3); 3,67-3,73 (12H, m, CH_2O); 7,26-7,54 (15H, m, $H_{aromatiques}$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 50,67 (CH_2-N_3) ; 63,41 ; 70,08 ; 70,73 ; 70,77 ; 70,81 ; 70,86 ; 86,59 ($\underline{C}Ph_3$) ; 126,99 ($CH_{aromatique\ en\ para}$) ; 127,82 $CH_{aromatique\ en\ ortho}$) ; 128,78($CH_{aromatique\ en\ méta}$) ; 144,20 ($C_{aromatique}$)

2-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthanol (33)



MM = 219,24 g/mol

Dans un monocol de 1L, sont introduits **32** (4,24 g ; 9,19 mmol) en solution dans 390 mL de MeOH et de l'acide *p*-toluènesulfonique (0,18 g ; 0,95 mmol). Le mélange est chauffé sous

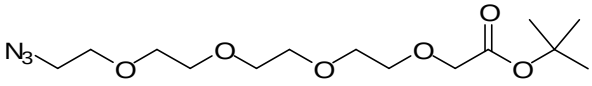
agitation au reflux du MeOH. Quelques grains de pierre ponce sont ajoutés pour réguler le reflux. Au bout de 6h, une fois le milieu revenu à température ambiante, du Na_2CO_3 (1,97 g ; 18,57 mmol) est introduit dans le ballon. Après 10 min d'agitation, la suspension est filtrée et le filtrat est concentré sous pression réduite. 25mL d'eau sont ajoutés au résidu et cette phase est extraite avec 2x50 mL d'Et_2O. La phase aqueuse est concentrée sous vide. Le résidu rougeâtre est repris avec de l'AcOEt pour filtrer les sels. Le filtrat incolore est concentré sous vide.

Rendement : 87 % (1,75 g)

RMN ^1H ($CDCl_3$, 200 MHz) δ = 2,9 (1H, s large, OH); 3,38 (2H, t, J = 5,2 Hz, CH_2N_3); 3,58-3,71 (12H, m, CH_2O).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 50,60 (CH_2-N_3) ; 61,58 (CH_2OH) ; 69,97 ; 70,26 ; 70,51 ; 70,58 ; 70,62 ; 72,48

<u>14-azido-3,6,9,12-tétraoxatétradécan-1-oate de *tert*-butyle</u> (34)



MM = 333,38 g/mol

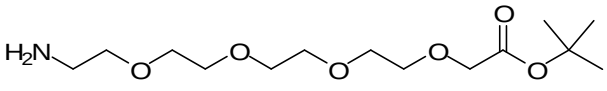
Dans un monocol de 50 mL, sont introduits **33** (872 mg ; 3,98 mmol) en solution dans 7,4 mL de toluène, ainsi que 3,7 mL de $NaOH_{aq}$ 12,5N suivi du bromure de tétrabutylammonium (270 mg ; 0,84 mmol) et du bromoacétate de *tert*-butyle (2,9 mL ; 19,89 mmol). Le mélange biphasique est agité vigoureusement à température ambiante. La disparition du produit de départ est suivie par CCM : CH_2Cl_2/MeOH (98/2). Au bout de 4h, l'agitation est arrêtée et 10 mL d'AcOEt sont ajoutés au milieu. Après transfert dans une ampoule à décanter, la phase organique est lavée successivement avec 10 mL de saumure, puis 3,5 mL d'HCl 3N et enfin 5 mL d'eau. La phase organique est ensuite séchée avec Na_2SO_4 anhydre et concentrée sous vide. Le résidu est purifié sur colonne de silice avec comme éluant AcOEt/hexane (1/1).

Rendement : 84 % (1,11 g)

RMN ^1H ($CDCl_3$, 200 MHz) δ = 1,29 (9H, s, CH_3); 3,19 (2H, t, J = 5 Hz); 3,45-3,51 (14H, m, CH_2O); 3,83 (2H, s, CH_2C=O).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 27,09 (CH_3) ; 49,66 (CH_2N_3) ; 69,04 ; 69,58 ; 69,62 ; 69,67 ; 80,37 (C) ; 168,62 (C=O).

14-amino-3,6,9,12-tétraoxatétradécan-1-oate de *tert*-butyle (AM8)



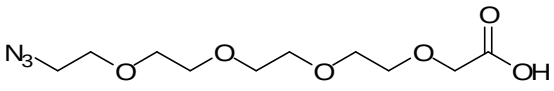
MM = 307,38 g/mol

Dans un monocol de 50 mL, sont introduits **34** (360 mg ; 1,08 mmol) en solution dans 10,3 mL de THF/H_2O (8/2) ainsi que de la triphénylphosphine (568 mg ; 2,17 mmol). Le mélange est chauffé à 60°C et est maintenu sous agitation pendant 24 h. Le milieu réactionnel est ensuite concentré sous vide. 10 mL d'AcOEt sont ajoutés au résidu puis la phase organique est lavée avec 3 x 2 mL de $KHSO_4$ 10% et 10 mL de saumure. Les phases aqueuses sont rassemblées et le pH de la solution est ajusté à 9 avec du Na_2CO_3 avant d'être lyophilisée. Le solide obtenu est repris avec de l'AcOEt et la suspension est filtrée afin d'éliminer les sels. Enfin, le filtrat est concentré sous vide pour conduire au composé brut. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice. Eluant : CH_2Cl_2/MeOH (95/5 - 1/1).

Rendement : 63% (209 mg)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 200 MHz) δ = 1,31 (9H, s, CH_3); 2,87 (2H, s large, NH_2); 3,33 (2H, s, CH_2); 3,45-3,62 (14H, m, CH_2O); 3,95 (2H, s, CH_2C=O).

Acide 14-azido-3,6,9,12-tétraoxatétradécan-1-oïque (35)



MM = 277, 27 g/mol

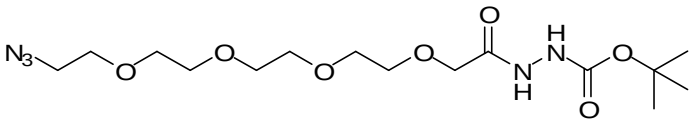
Dans un ballon de 25 mL, sont introduits **34** (640 mg; 1,92 mmol) et 2 mL de TFA. Le mélange est agité à température ambiante pendant 25 min. Le TFA est alors chassé du milieu réactionnel sous un flux d'azote. Le résidu est repris avec de l'éther puis concentré sous vide. 25 mL d'eau sont ajoutés au résidu et la phase aqueuse est extraite avec 3x70 mL d'éther, puis avec 70 mL de dichlorométhane. La phase organique chlorée est séchée avec du sulfate de sodium anhydre et concentrée sous vide pour donner le produit pur.

Rendement : 67% (357 mg)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 3,33 (2H, t, J = 4,91 Hz, CH_2N_3); 3,59-3,69 (14H, m, CH_2O); 4,1 (2H, s, CH_2C=O); 9,01 (1H, s large, CO_2H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 50,65 (CH_2N_3) ; 68,72 ; 69,89 ; 70,20 ; 70,30 ; 70,35 ; 70,45 ;70,57 ; 70,81 ; 172,52 (C=O)

17-azido-4-oxo-6,9,12,15-tétraoxa-2,3-diazaheptadécan-1-oate de *tert*-butyle (36)



MM = 391,42 g/mol

- **Protocole 1**

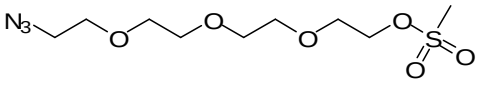
Dans un ballon de 25 mL, sont introduits **35** (140 mg; 0,51 mmol) en solution dans 1,5 mL de dichlorométhane, le DCC (115 mg; 0,56 mmol) et enfin la Boc-hydrazine (138 mg; 1,04 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 48h. Au bout de ce temps, la DCU est filtrée sous vide. 20 mL de dichlorométhane sont ajoutés au filtrat et celui-ci est lavé avec 30 mL d'eau, 30 mL de $NaHCO_3$ 0,5% et 30 mL de NaH_2PO_4 10%. La phase aqueuse est concentrée sous vide et purifiée par chromatographie sur colonne de silice. Eluant : AcOEt/MeOH (4/1).

Résultat : pas de traces du produit de couplage, seuls les réactifs de départ, **35** et la Boc-hydrazine, sont isolés.

- **Protocole 2**

Dans un monocol de 25 mL, sont introduits **35** (340 mg ; 1,23 mmol) en solution dans 8 mL de THF anhydre ainsi que le *N*-hydroxysuccinimide (169 mg ; 1,47 mmol). Le DCC (308 mg ; 1,49 mmol) dissous dans 0,9 mL de THF anhydre est ajouté au mélange refroidi à 20°C avec un bain d'eau. Le milieu réactionnel est agité pendant 1 nuit à température ambiante. La DCU est alors filtrée et le filtrat est concentré sous vide. Le résidu est repris dans 5 mL d'AcOEt, la suspension est filtrée et le filtrat concentré sous vide. Cette opération est répétée deux fois supplémentaires. Le résidu est repris dans 5 mL d'isopropanol puis concentré sous vide. L'huile obtenue est ensuite dissoute dans 1,2 mL de chloroforme anhydre. A cette solution est ajoutée la Boc-hydrazine (163 mg ; 1,23 mmol). Le milieu réactionnel est agité pendant 1 nuit à température ambiante. 10 mL de chloroforme sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel et celui-ci est lavé avec 2 x 17 mL d'eau. La phase organique est séchée avec du sulfate de sodium anhydre et concentrée sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice. Eluant : hexane/AcOEt (95/5 – 80/20).

Méthanesulfonate de 2-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthyle (38)



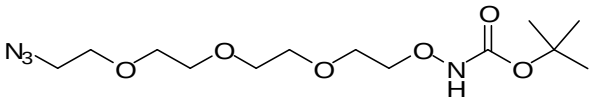
MM = 297,33 g/mol

Dans un monocol de 25 mL, sont introduits **33** (1 g ; 4,56 mmol) en solution dans 6,2 mL de dichlorométhane ainsi que de la triéthylamine (0,76 mL ; 5,47 mmol). Le mélange est refroidi à 0°C par un bain de glace. A cette température, du chlorure de mésyle (0,39 mL ; 5,02 mmol) est ajouté. Le mélange est maintenu à 0°C pendant 2h puis l'agitation se poursuit à température ambiante pendant une nuit. La suspension est alors filtrée et le filtrat est concentré sous vide. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de gel de silice. L'éluant utilisé est AcOEt/hexane (90/10).

Rendement : 88% (1,19 g)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 200 MHz) δ = 2,93 (3H, s, CH_3); 3,23 (2H, t, J = 4,97 Hz, CH_2N_3); 3,39-3,62 (12H, m, CH_2O); 4,21 (2H, m, CH_2OSO_2).

2-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthoxycarbamate de *tert*-butyle (39)



MM = 334,37 g/mol

Dans un monocol de 25 mL, sont introduits de la Boc-hydroxylamine (213 mg ; 1,6 mmol) et de la DBU (0,26 mL ; 1,72 mmol) en solution dans 0,6 mL de THF anhydre. A ce mélange est ajouté **38** (340 mg ; 1,14 mmol) dissout dans 0,6 mL de THF anhydre. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation et sous atmosphère d'azote pendant 24 h. Il est ensuite évaporé partiellement puis remis sous agitation et atmosphère d'azote pendant 3 jours. 10 mL de dichlorométhane sont alors ajoutés au milieu réactionnel et la phase organique est lavée avec 4 x 5 mL de NH_4Cl 2 M et 2 x 5 mL de saumure. La phase organique est séchée avec du sulfate de sodium anhydre et concentrée sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice. Eluant : AcOEt/éther de pétrole (1/3).

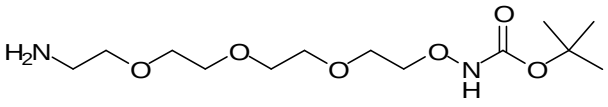
Rendement : 63% (240 mg)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 1,41 (9H, s, CH_3); 3,32 (2H, t, J= 5,03 Hz, $C\underline{H}_2N_3$); 3,60-3,73 (12H, m, CH_2O); 3,98 (t, 2H, $C\underline{H}_2ONH$), 7,8 (1H, s, NH).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 28,15 (CH_3); 50,59 (CH_2N_3); 69,15; 69,96; 70,48; 70,54; 70,6; 81,27 (C); 156,7 (C=O).

HRMS (ESI +) : $C_{13}H_{27}N_4O_6$ calc. :335,1925 ; exp. : 335,1931.

2-(2-(2-(2-aminoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthoxycarbamate de *tert*-butyle (39')



MM = 308,37 g/mol

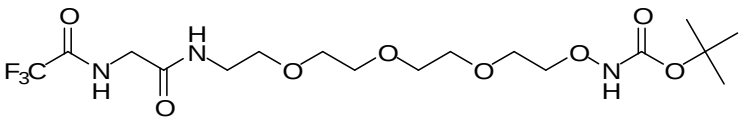
Dans un monocol de 25 mL, sont introduits **39** (220 mg ; 0,658 mmol) en solution dans 6,3 mL de THF/H_2O (8/2) ainsi que de la triphénylphosphine (345 mg ; 1,32 mmol). Le mélange est chauffé à 60°C et est maintenu sous agitation pendant 24 h. Le milieu réactionnel est ensuite concentré sous vide. 10 mL d'AcOEt sont ajoutés au résidu puis la phase organique est lavée avec 3 x 2 mL de $KHSO_4$ 10% et 10 mL de saumure. Les phases aqueuses sont rassemblées et le pH de la solution est ajusté à 9 avec du Na_2CO_3 avant d'être lyophilisée. Le solide obtenu est repris avec de l'AcOEt et la suspension est filtrée afin d'éliminer les sels. Enfin, le filtrat est concentré sous vide pour conduire au composé désiré.

Rendement quantitatif (203 mg)

RMN ^1H ($CDCl_3$, 200 MHz) δ = 1,4 (9H, s, CH_3); 2,83 (2H, t, J = 5,02 Hz, $C\underline{H_2}NH_2$); 3,48-3,66 (12, m, CH_2O); 3,95 (2H, t, J = 4,5 Hz); 6,75 (2H, s large, NH_2)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 28,26 (CH_3); 41,50 (CH_2NH_2); 69,12; 70,15; 70,47; 70,51; 72,76; 75,27; 81,31 (C); 156,96 (C=O)

17,17,17-trifluoro-13,16-dioxo-3,6,9-trioxa-12,15-diazaheptadécyloxycarbamate de *tert*-butyle (40)



MM = 461,43 g/mol

Dans un monocol de 25 mL, sont introduits **39'** (230 mg ; 0,746 mmol), de la *N*-Tfa-glycine (152 mg ; 0,895 mmol) ainsi que de l'EDC (243 mg ; 1,26 mmol), le tout en solution dans 5,7 mL de THF. Le milieu réactionnel est agité pendant 3 jours à température ambiante. Le THF

est ensuite évaporé sous vide puis 20 mL de dichlorométhane sont ajoutés au résidu. La phase organique est lavée avec 2 x 20 mL de $KHSO_4$ 10% et 10 mL de saumure. La phase organique est séchée avec du Na_2SO_4 anhydre et concentrée sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice. Eluant : CH_2Cl_2/MeOH (98/2 – 90/10).

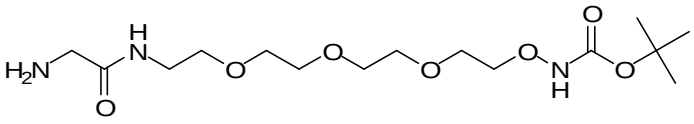
Rendement : 66% (227 mg)

RMN ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 1,40 (9H, s, CH_3); 3,41 (2H, t, CH_2); 3,50-3,72 (12H, m, CH_2O); 3,90 (4H, m, $C\underline{H}_2ONH$ et $C\underline{H}_2C=O$); 7,21 (1H, s, NH); 7,62 (1H, s, NH); 8,01 (1H, s, NH).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 28,19 (CH_3); 39,56 ($CH_2\underline{C}H_2NH$); 42,45 (CH_2NH); 68,98 (CH_2ONH); 69,50; 69,80; 70,10; 70,17; 70,32; 70,36; 75,20; 81,75 (C); 115,74 (q, CF_3); 157,11 (O-NH-C=O); 157,45 (q, $CF_3\underline{C}=O$); 167,07 ($CH_2\underline{C}=O$)

HRMS (ESI+): $C_{17}H_{31}F_3N_3O_8$ calc.: 462.2069; exp.: 462.2063.

<u>14-amino-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azatétradécyloxycarbamate de *tert*-butyle</u> (41)



MM = 365,42 g/mol

Dans un ballon de 25 mL, sont introduits **40** (200 mg; 0,43 mmol) et 5 mL d'une solution de NH_3 28%/H_2O/MeOH (28/56/16). Le mélange est chauffé à 40°C et maintenu sous agitation pendant une nuit. Le brut réactionnel est concentré partiellement sous vide pour chasser l'ammoniac puis le résidu est lyophilisé.

Rendement quantitatif (157 mg)

RMN ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 1,38 (9H, s, CH_3); 3,38 (2H, t, CH_2); 3,49-3,69 (14H, m, CH_2O et $CH_2C=O$); 3,92 (2H, m, $C\underline{H}_2ONH$); 6,07 (2H, s large, NH_2); 8,16 (1H, s, NH); 8,45 (1H, s, NH).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 28,04 (CH_3); 39,09 (CH_2NH); 41,25 (CH_2NH_2); 68,27 (CH_2ONH); 69,69; 69,81; 69,92; 70,21; 70,34; 75; 81,56 (C); 157,96 (OC=O); 167,75 ($CH_2\underline{C}=O$).

HRMS (ESI +) : $C_{15}H_{32}N_3O_7$ calc. : 366,2238 ; exp. : 366,2240.

Synthèse de G1-bras

Le protocole suivi est le même que celui présenté dans le chapitre précédent avec comme amorceur de polymérisation le bras aminooxy **41**.

Amorçage 1

C-Lys(TFA) (1250 mg, 4,39 mmol); NO (250 mL, 11,16 mmol); O_2 (47,5 mL, 2,12 mmol); **41** (428 mg, 0,89 mmol, M/A = 5) ; $NaHCO_3$ 0,2M (20 mL); durée de nitrosation 60 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 490 mg; masse surnageant : 1000 mg ; $\overline{DP_n}$ **G1P** = 6 ; $\overline{DP_n}$ **G1P**-bras = 4,5; % oligomères amorcés (EC) : 79 ; rendement précipité: 39%; rendement monomère: 40% ; rendement amorceur : 30%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): Na^+, Bras aminooxy-$[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 2 à 9) m/z = 836,3 ; 1060,4 ; 1284,5 ; 1508,6 ; 1732,7 ; 1956,7 ; 2180,8 ; 2404,8. Na^+, $[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 6 à 8) m/z = 1385,5 ; 1609,5 ; 1833,6.

Amorçage 2

C-Lys(TFA) (502 mg, 1,76 mmol); NO (100 mL, 4,46 mmol); O_2 (19 mL, 0,85 mmol); **41** (185 mg, 0,39 mmol, M/A = 4,5) ; $NaHCO_3$ 0,2M (15 mL); durée de nitrosation 60 min; durée polymérisation 15h.

masse précipité: 100 mg; masse surnageant : 560 mg ; $\overline{DP_n}$ **G1P** = 6 ; $\overline{DP_n}$ **G1P**-bras = 5; % oligomères amorcés (EC) : 95 ; rendement précipité: 20%; rendement monomère: 19% ; rendement amorceur : 18%

MALDI-TOF MS (matrice CHCA): Na^+, Bras aminooxy-$[Lys(Tfa)]_n$ (de n = 2 à 7) m/z = 836,3 ; 1060,4 ; 1284,5 ; 1508,6 ; 1732,7 ; 1956,7.

Synthèse G2-bras

C-Lys(TFA) (1250 mg, 4,39 mmol); NO (250 mL, 11,16 mmol); O_2 (47,5 mL, 2,12 mmol); **G1-bras** (227 mg, 0,16 mmol, M/A = 27) ; $NaHCO_3$ 0,2M (25 mL); durée de nitrosation 60 min; durée polymérisation 28h.

Masse précipité : 600 mg

Analyses par EC

- Electrolyte 1 : tampon phosphate 250 mM, pH 2

Préparation : 868 µL (12,5 mmol) d'H_3PO_4 84% ainsi que 1,5 g (12,5 mmol) de NaH_2PO_4,H_2O dans une fiole jaugée de 100 mL. La fiole est complétée avec de l'eau ultra-pure jusqu'au trait de jauge.

A cet électrolyte, est ajouté 0,5 g/L d'imidazole (5 mg pour 10 mL d'électrolyte) comme marqueur de position.

Les échantillons à analyser sont préparés à une concentration de 5 g/L (5 mg dans 1 mL d'électrolyte).

Conditions expérimentales :

Capillaire utilisé : silice vierge 58,5 cm (50 cm jusqu'au détecteur) x 50 µm d.i

Tension appliquée : + 20kV

Injection hydrodynamique : 50 mbar, 2 s

Détection UV : 200 nm

Température : 25°C.

Rinçage du capillaire entre les analyses :

5 min avec électrolyte 1

Suivi de la ligation par CLHP

- Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés selon les données consignées dans le tableau ci-dessous. L'eau utilisée est de l'eau désionisée. Les DGL **G1** et **G2** ont été gracieusement fournis par COLCOM.

molécule	Masse (mg)	Volume d'eau (mL)	Concentration (mM)
G1	5,46	5	0,75
G2	11,6	1	1,35
G1-bras	1,48	2	0,52
G2-bras	10,32	1	1,15
vanilline	3,4	20	1,12

Chaque solution est diluée 10 fois (100 µL qsp 1 mL), de façon à obtenir des solutions à environ 0,1 mM, et analysée par CLHP.

- Suivi de la ligation

100 µL de chacune des solutions de DGL (**G1**, **G2**, **G1-bras**, **G2-bras**) ainsi que 100µL de vanilline sont introduits dans 4 vials différents. Chaque échantillon est complété à 1 mL avec de l'eau distillée contenant 1‰ de TFA (pH 2). Ces échantillons sont analysés au bout de 48 h de réaction par CLHP.

- Méthode CLHP

Débit : 0,2 mL/min

Volume injecté : 10 µL

Mode gradient : les éluants (eau et acétonitrile) contiennent chacun 1‰ de TFA.

Temps (min)	H_2O (%)	CH_3CN (%)
0	100	0
4	100	0
24	75	25
32	25	75
33	0	100
38	0	100
39	100	0

Les chromatogrammes sont enregistrés à 210 nm et à 300 nm.

Analyse MALDI-TOF

Les échantillons sont préparés dans une matrice CHCA (acide α-cyano-4-hydroxycinnamique) à une concentration de 10 g/L dans CH_3CN/H_2O.

Chapitre IV

Modification de surface des DGL

IV. Modification de surface des DGL

IV.1 Introduction

Le caractère polycationique, à pH physiologique, des dendrimères greffés de L-lysine leur confère une certaine toxicité selon la génération, limitant ainsi leur utilisation en milieu biologique. Néanmoins, les DGL pourraient s'avérer moins toxiques que leurs homologues PAMAM (polyamidoamine) par exemple. Dans le cas des dendrimères polycationiques, afin de pallier cette limitation, les amines de surface des dendrimères comme les PAMAM, les PEI (polyéthylène imine), les PPI (polypropylène imine) ou les polylysines sont modifiées par des groupements visant à moduler, annuler ou inverser leurs charges positives. De ce fait, ces dendrimères modifiés deviennent moins toxiques et acquièrent aussi de nouvelles propriétés (agent de transfert de phase, agent complexant, etc…). Dans cette optique, nous avons envisagé de créer des nouveaux matériaux, de façon analogue aux dendrimères, en modifiant les DGL par des réactions classiques de chimie organique. Les modifications et les applications possibles étant très nombreuses, nous nous sommes focalisés sur un nombre restreint d'entres elles, afin de démontrer que les DGL peuvent avoir un champ d'applications aussi large que les dendrimères.

Dans ce chapitre, nous verrons dans un premier temps les différentes modifications qui peuvent être réalisées sur les dendrimères ayant une surface aminée par des exemples issus de la littérature. Dans un second temps, nous aborderons la synthèse des nouvelles familles de DGL, et nous démontrerons la possibilité de moduler le taux de greffage en jouant sur le rapport molaire réactif/DGL. Enfin, nous détaillerons le greffage de sucres sur la première génération de DGL. Cette partie sera illustrée par un exemple d'application de ces composés dans le domaine analytique.

IV.2 Modifications de surface des dendrimères de type polyamine

Dans la littérature, il y a peu de publications consacrées à la modification de surface de dendrimères greffés. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes tournés vers les dendrimères polycationiques de type polyamine. Nous allons nous focaliser sur les différentes modifications qu'ils subissent conduisant à des surfaces cationiques, anioniques ou neutres, et sur les applications qui en découlent. Nous avons représenté dans la figure 23 ci-dessous la structure des PPI et de deux types de PAMAM, dendrimères dont il sera question dans les paragraphes suivants. Ils seront représentés dans les schémas suivants simplement par une sphère portant une fonction amine répétée n fois.



Figure 23: Structure des polypropylène imines (PPI), PAMAM (cœur éthylène diamine) et PAMAM

IV.2.1 Obtention de dendrimères dotés d'une surface cationique

Comme nous l'avons mentionné en introduction, un des moyens permettant de diminuer la toxicité des dendrimères polycationiques est de réduire la densité de charge de ces derniers. Choi *et al.*[1] et Okuda *et al.*[2] ont utilisé, pour ce faire, des arginines qu'ils ont couplés sur les amines de surface de dendrimères, respectivement PAMAM et polylysine, par couplage peptidique. Ces dendrimères ont ensuite été testés *in vitro* en tant qu'agents de transfection avec de bons résultats. Paleos *et al.*[3-6] et Tziveleka *et al.*[7] adoptent le même principe, mais plutôt que d'introduire une arginine, ils optent pour la transformation des fonctions amines en fonctions guanidines comme le montre le schéma ci-dessous.

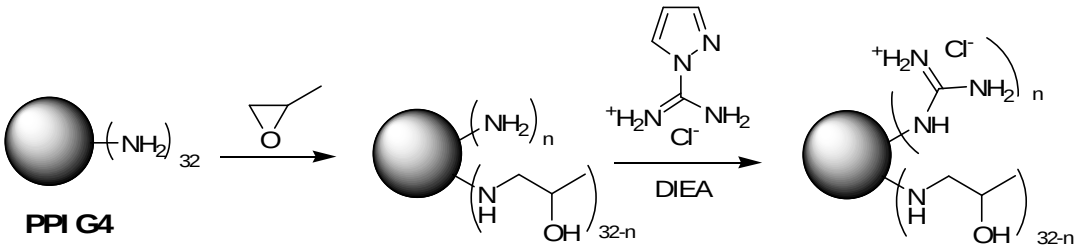


Schéma 74 : Hydroxylation et guanidylation d'un PPI G4[7]

Une partie des amines du polypropylène imine de 4e génération réagit avec l'oxyde de propylène pour former un alcool secondaire et les amines restantes sont guanidylées par le chlorure de 1*H*-pyrazole-1-carboxamidinium[8], en présence de *N*,*N*-diisopropyléthylamine (DIEA). La première étape a été réalisée en modulant l'excès d'oxyde de propylène utilisé de façon à obtenir une hydroxylation totale ou partielle du dendrimère, et ainsi contrôler la densité de charge de celui-ci. La fonction guanidine a été choisie car sa charge positive est délocalisée sur les azotes, et elle a, tout comme les amines, la capacité de former des complexes avec l'ADN au travers d'interactions ioniques. Par ailleurs, il a été constaté que certains peptides riches en arginine ont la capacité à pénétrer les membranes cellulaires[9], aptitude que pourrait éventuellement développer les dendrimères guanidylés.

Les tests effectués sur ces dendrimères guanidylés ont montrés qu'ils sont moins cytotoxiques et de meilleurs transfecteurs d'ADN que les PPI natifs.

De leur côté, Wang *et al.*[10] fonctionnalisent des PAMAM avec des chromophores cationiques en deux étapes, selon le schéma 75 ci-après.

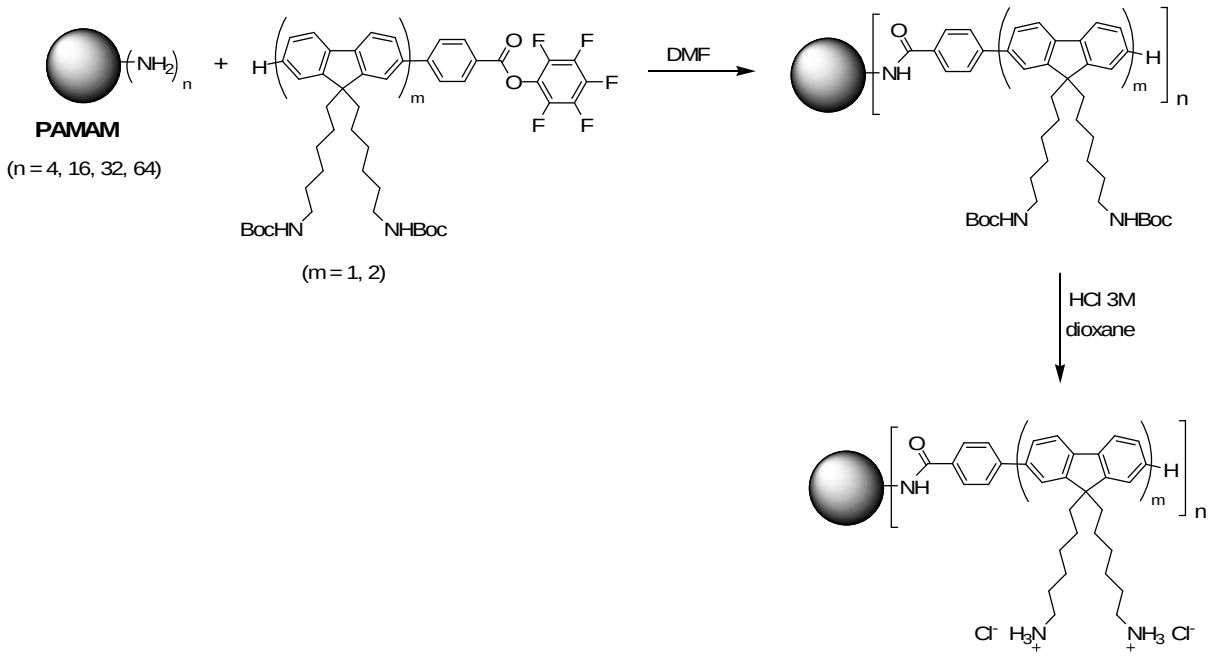


Schéma 75 : PAMAM dérivatisé par des fluorophores cationiques

Les amines de surface du PAMAM sont couplées à un ester activé d'un dérivé de type oligofluorène portant des fonctions amines protégées par un groupement Boc. Le produit de couplage est ensuite déprotégé en milieu acide pour conduire à un PAMAM doté de chromophores chargés positivement à pH physiologique. Les amines permettent au PAMAM de conserver sa capacité à former des complexes avec l'ADN et les groupements de type oligofluorène permettent le suivi de ces complexes par fluorescence.

Dans un autre registre, Chen *et al.*[11] ont cherché à augmenter le pouvoir antibactérien des PPI en transformant les amines de surface en ammoniums quaternaires. Les ammoniums quaternaires sont déjà largement utilisés en tant que désinfectant[12]. La transformation est opérée en deux étapes selon le schéma ci-dessous.

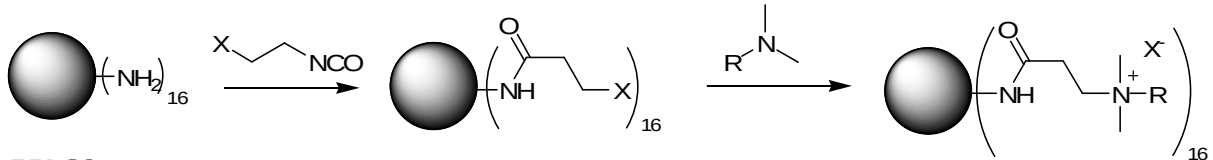


Schéma 76 : Modification des amines de surface en ammoniums quaternaires

Le PPI est mis en réaction avec un halogéno-2-isocyanatoéthane pour conduire au dérivé halogéné correspondant via une liaison amide. Puis, une amine tertiaire, portant une chaîne alkyle plus ou moins longue, attaque le carbone en alpha de l'halogène pour donner un ammonium quaternaire. Ils ont montré au cours de leur étude que le pouvoir antibactérien de ces dendrimères quaternarisés est fonction de la longueur de la chaîne alkyle, du contre-ion et de la génération du dendrimère.

Ainsi, après avoir présenté quelques différentes modifications de dendrimères conduisant à des surfaces cationiques, nous allons développer dans le paragraphe suivant les réactions conduisant à une surface anionique.

IV.2.2 Obtention de dendrimères dotés d'une surface anionique

Parmi les dendrimères polyanioniques, les principales fonctions que l'on rencontre dans la littérature sont les sulfonates et les carboxylates. Certaines de ces macromolécules ont des activités biologiques très intéressantes[13-20]. Par exemple, les PAMAM disulfonate de naphtyle et dicarboxylate de benzyle ont des activités anti-HIV[21] et contre les infections dues au virus Herpes Simplex[22]. Ils sont synthétisés selon le schéma ci-après à partir d'un PAMAM de 4e génération.

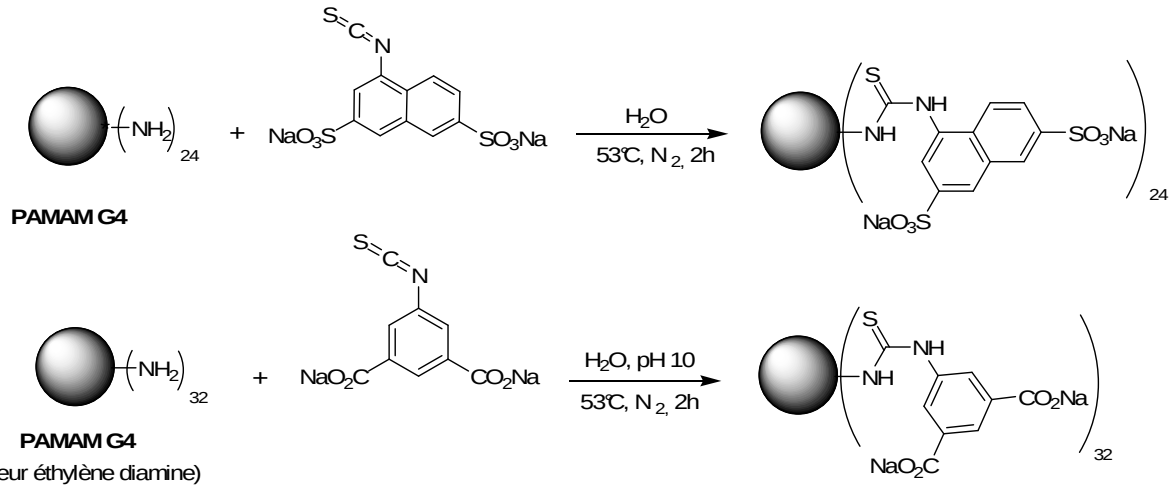


Schéma 77 : Synthèse de PAMAM G4 disulfonate de naphtyle et dicarboxylate de benzyle

Les amines de surface du PAMAM sont mises en réaction avec un dérivé isothiocyanate respectivement du disulfonate de naphtyle et du dicarboxylate de benzyle pour conduire au dendrimère polyanionique correspondant.

IV.2.3 Obtention de dendrimères dotés d'une surface neutre

Les dendrimères ayant une surface neutre représentent la catégorie la plus diversifiée du point de vue des fonctions. Nous avons réparti les diverses modifications chimiques réalisées sur les dendrimères selon le type de fonction introduite.

IV.2.3.1 La « PEGylation »

L'une des modifications les plus couramment effectuées sur les dendrimères de type polyamine est la « PEGylation », c'est-à-dire le couplage d'un dérivé de polyéthylène glycol à la surface de ces molécules. Il est connu que la fonctionnalisation des dendrimères par du PEG diminue leur toxicité et améliore leur biodisponibilité[23-27]. Dans les exemples présentés dans le schéma 78, le PEG est introduit soit sous forme d'acide ou d'ester activé sur un dendrimère de polylysine[26], soit sous forme de para-nitrophényle carbonate sur un PAMAM[23]. Les PEG utilisés, de taille variable (200-2000 g/mol), ont tous une extrémité méthoxy assurant la neutralité de la surface du dendrimère. De plus, le PEG n'altère en rien la solubilité des dendrimères car il est lui-même hydrosoluble.

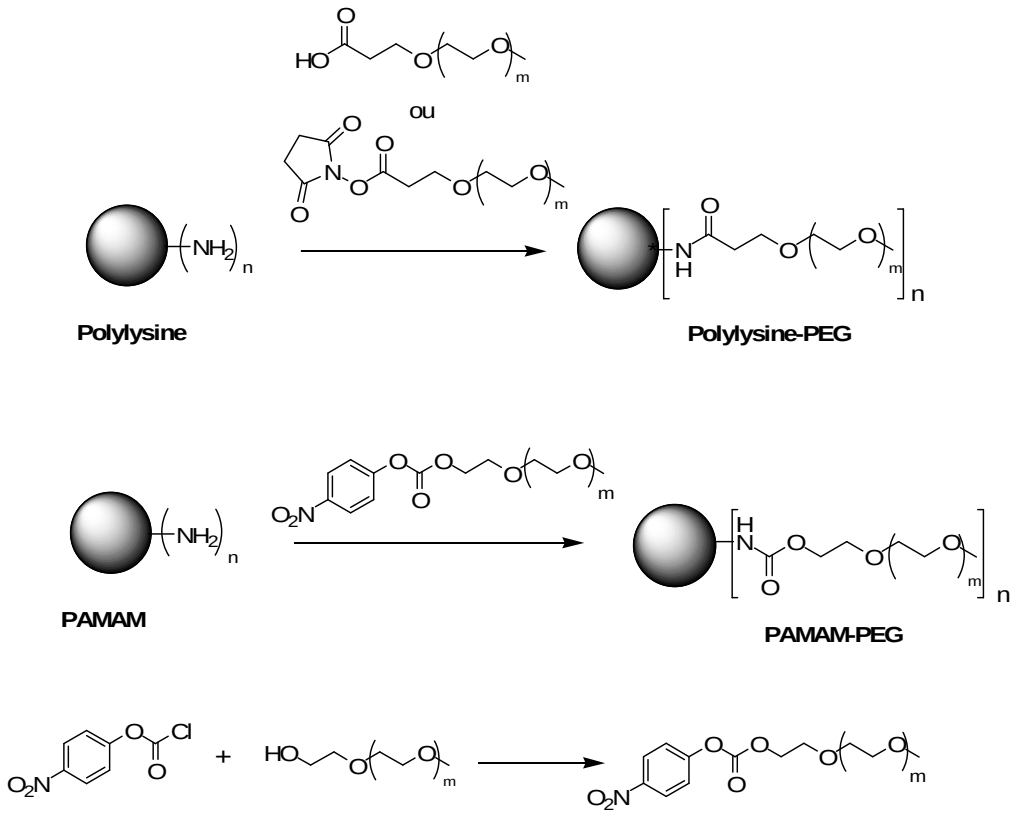


Schéma 78 : Fonctionnalisation d'une polylysine[26] et d'un PAMAM[23] par un dérivé PEG

Outre la fonctionnalisation par des PEG, les dendrimères peuvent aussi être dérivés par des chromophores.

IV.2.3.2 Le greffage de chromophores

Dans la littérature, il y a beaucoup d'exemples de modifications de dendrimères par des groupements permettant la détection par fluorescence. Nous en avons relevé quelques uns qui sont présentés dans le schéma 79. Les fonctions naphtyles[28] et dansyles[29] ont été utilisées pour détecter la coordination des dendrimères avec des cations métalliques (Ni^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, …). D'un autre côté, la fluorescéine, introduite sous forme de fluorescéine isothiocyanate (FITC), trouve son utilité dans le suivi par fluorescence des dendrimères lors des études biologiques[30,31]. Baars *et al.*[32] ont greffé aux PPI des groupements cyanobiphényles afin d'évaluer l'aptitude de ces nouvelles entités à former des mésophases (phase cristal liquide). Par ailleurs, Schenning *et al.*[33] ont fonctionnalisé des PPI par des groupements oligophénylènevinylènes et les ont utilisés comme agents de transfert de phase pour extraire avec des solvants organiques des colorants anioniques (sulforhodamine B) solubilisées dans l'eau.

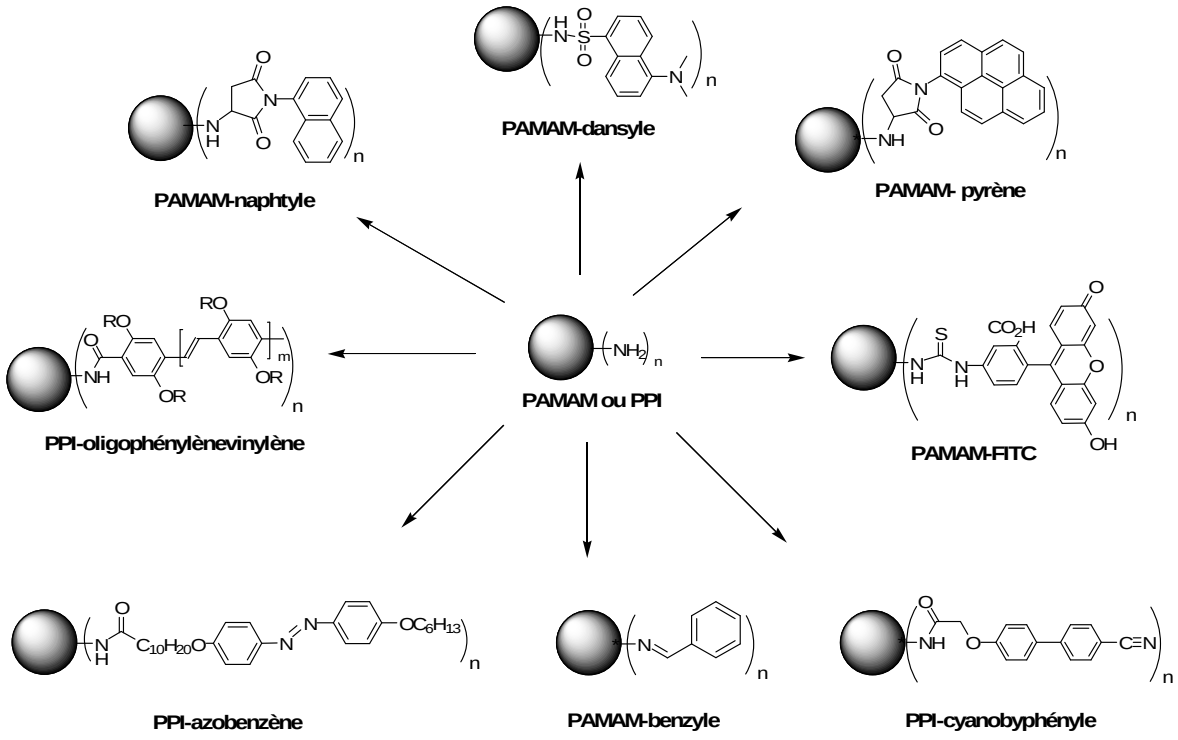


Schéma 79 : Dendrimères contenant des chromophores. (FITC : fluorescéine isothiocyanate)

Les autres groupements, azobenzène[34,35], benzyle[36] et fluorène[36], ont été utilisés, quant à eux, pour déterminer les structures issues d'un auto-assemblage des dendrimères en solution.
Une autre modification des dendrimères très utile pour les applications biologiques est le greffage de sucres.

IV.2.3.3 Le greffage de sucres

De nombreux mécanismes biologiques, comme la reconnaissance cellulaire, font intervenir des sucres, et de ce fait, des équipes de recherche ont travaillé sur la synthèse de dendrimères contenant des sucres, tirant parti du caractère polyfonctionnel des dendrimères et de leur capacité à pouvoir être utilisé comme agent de vectorisation. D'une manière générale, les sucres sont introduits sur les dendrimères de type polyamine soit par couplage peptidique, soit par amination réductrice. Dans le cas d'un greffage par couplage peptidique, le sucre choisi est modifié de façon à y introduire une fonction acide carboxylique.

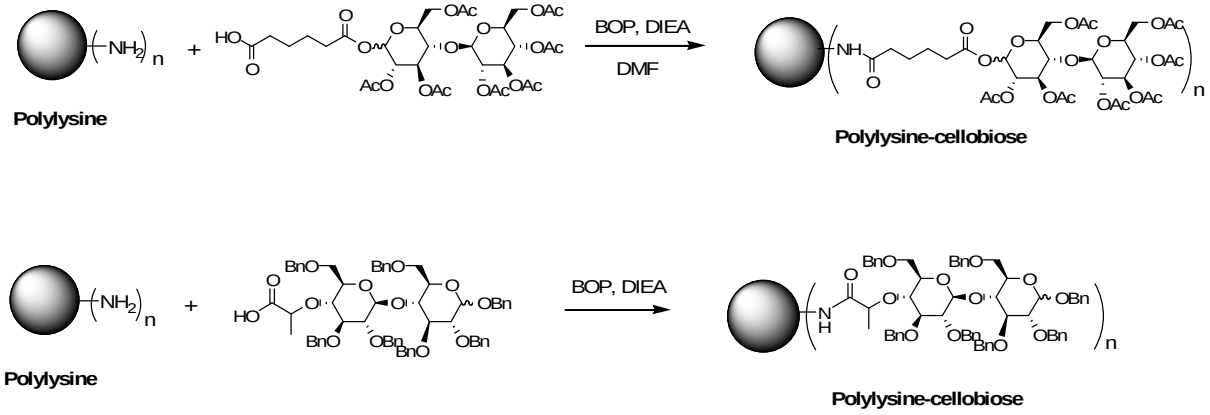


Schéma 80 : Greffage de dérivé de cellobiose par couplage peptidique.

Dans le schéma ci-dessus, nous avons représenté deux dérivés de cellobiose sur lesquels une fonction acide carboxylique a été introduite mais à des positions différentes sur le sucre. Dans le premier cas, la fonction acide a été introduite au niveau de la position anomérique du sucre peracétylé, sous forme de monoester de l'acide adipique. Le cellobiose perd de ce fait son caractère réducteur. Il est ensuite mis en réaction avec un dendrimère de polylysine dans des conditions classiques de couplage peptidique[37]. Dans le deuxième cas, la fonction acide est introduite par réaction du 2-chloropropionate de méthyle sur l'alcool en position 4' du cellobiose perbenzylé. Après déprotection de la fonction acide, le sucre est couplé à la polylysine en présence de BOP et de DIEA[38]. Par cette méthode, le sucre conserve son

caractère réducteur et d'autres molécules, comme des acides aminés ou des peptides, peuvent être ancrées au cellobiose par la fonction aldéhyde[38].

Aoi *et al.*[39] ont adopté une méthode différente consistant à condenser un sucre, ici le lactose, sous forme de lactone avec un PAMAM (Schéma 81).

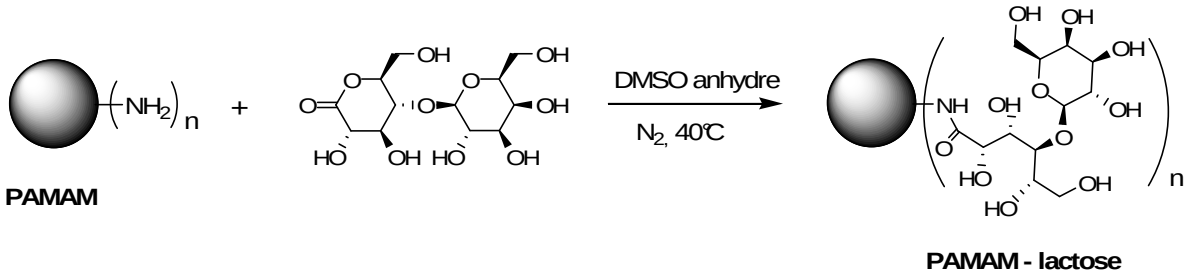
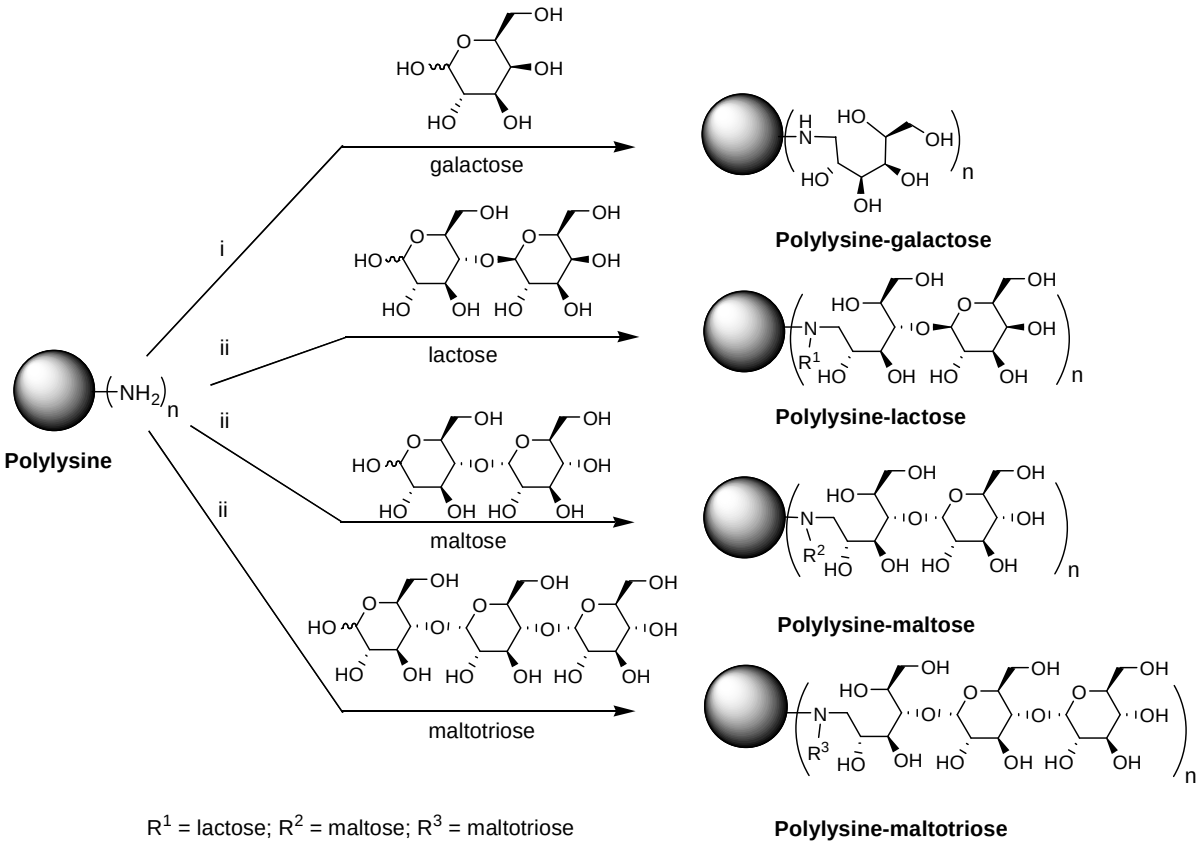


Schéma 81 : Greffage de lactose sous forme de lactone

Dans un greffage par amination réductrice, le sucre est utilisé directement sans subir de modifications. Lors de la réaction entre le dendrimère et les sucres, les amines attaquent le carbone anomérique des sucres en formant des imines, qui sont réduites pour conduire à des liaisons $–NH-CH_2-$ entre le dendrimère et les sucres. Agrawal *et al.*[40] et Baigude *et al.*[41] ont employé des conditions différentes pour réaliser leur amination réductrice comme illustré dans le schéma 82. Le premier effectue le greffage du galactose sur un dendrimère de polylysine en milieu aqueux à pH 4 dans un tampon acétate de sodium à 0,1 M avec du cyanoborohydrure de sodium comme agent réducteur[42]. Ainsi, il greffe une unité de type galactose (polyol) par amine. Le second réalise le couplage entre un dendrimère de polylysine et respectivement le lactose, le maltose et le maltotriose, en milieu aqueux en présence d'un tampon borate à 0,1 M et d'un complexe borane-pyridine assurant la réduction des imines formées.



i. $NaBH_3CN$, tampon AcONa 0,1M pH 4, 2jours, t.amb; ii. tampon borate 0,1M, complexe borane / pyridine, 50°C, 7 jours

Schéma 82 : Greffage de sucre par amination réductrice

Par cette méthode, ils ont greffé sur le dendrimère deux unités de sucres par amine. Ces exemples montrent que l'amination réductrice permet de coupler aussi bien des sucres simples que des di- ou tri-saccharides.

En 1997, Aoi *et al.*[43,44] ont développé une méthode originale de synthèse en faisant réagir un sucre substitué par un *N*-carboxyanhydride d'acide aminé (glyco-NCA) sur un PAMAM jouant le rôle d'initiateur de polymérisation (Schéma 83).

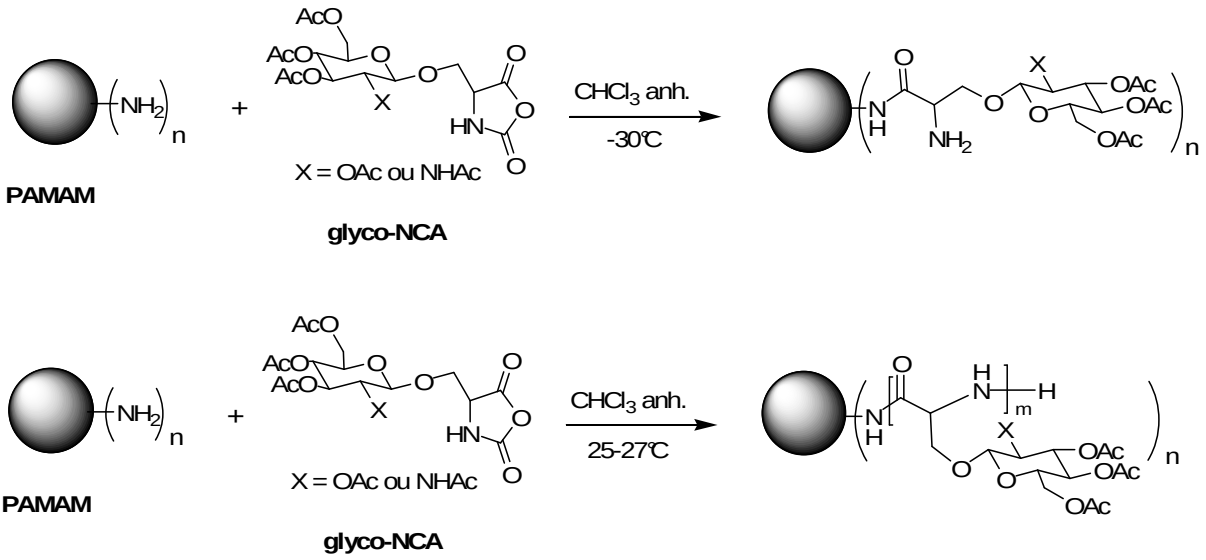


Schéma 83 : Glycosylation d'un PAMAM par réaction avec un glyco-NCA

Pour leur synthèse, ils ont utilisé du glucose et de la *N*-acétylglucosamine peracétylés et couplés au NCA de la sérine. Selon la température à laquelle se déroule la réaction, la polymérisation du NCA est possible ou non. A -30°C, l'étape d'initiation de la polymérisation est rapide mais la propagation n'a pas lieu, permettant d'avoir un seul sucre par amine sur le PAMAM. Par contre, à température ambiante la propagation de la polymérisation se déroule normalement et conduit à l'obtention d'un glycopeptide sur chaque amine du PAMAM.

IV.2.3.4 Autres modifications

Avec l'engouement suscité par les dendrimères depuis leur découverte et notamment celle des PAMAM, il est apparu au début des années 90 une nouvelle classe de dendrimères, les PAMAMOS (OS pour « organosilicon »). Ils sont composés d'un cœur PAMAM et d'une surface contenant des groupements silylés. Dans le schéma ci-dessous, nous avons relevé des exemples de synthèses de trois types de PAMAMOS différents. Le PAMAMOS-TMS (triméthylsilyle) fait parti des PAMAMOS chimiquement inertes, le PAMAMOS-DMVS (diméthylvinylsilyle) représente les PAMAMOS chimiquement réactifs et le PAMAMOS-DMOMS (diméthoxyméthylsilyle), est un PAMAMOS hydrolysable[45].

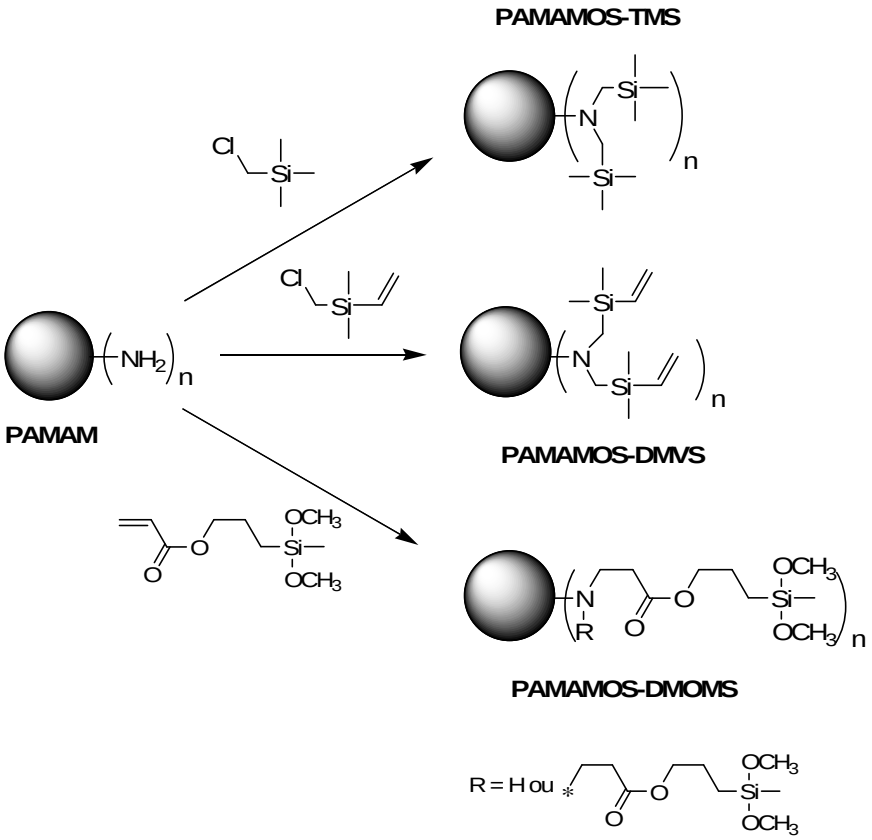


Schéma 84 : Synthèse de divers PAMAMOS

Les fonctions silylées sont introduites sur le PAMAM par chloroalkylation pour les PAMAMOS-TMS et -DMVS, tandis que pour le PAMAMOS-DMOMS, il s'agit d'une addition de Michael sur un acrylate silylé[46]. La modification d'un PAMAM par un triméthylsilane permet de modifier la solubilité du dendrimère en le rendant soluble dans les solvants organiques polaires, dans le toluène et insoluble dans l'eau[46,45]. Les dendrimères PAMAMOS-DMOMS peuvent, quant à eux, être immobilisé sur des surfaces en verre ayant des groupements silanols ou encore être réticulé avec d'autres PAMAMOS-DMOMS par liaison covalente pour former un réseau[47].

Outre l'émergence des dendrimères silylés, des dendrimères avec une surface perfluorée ont aussi vu le jour.

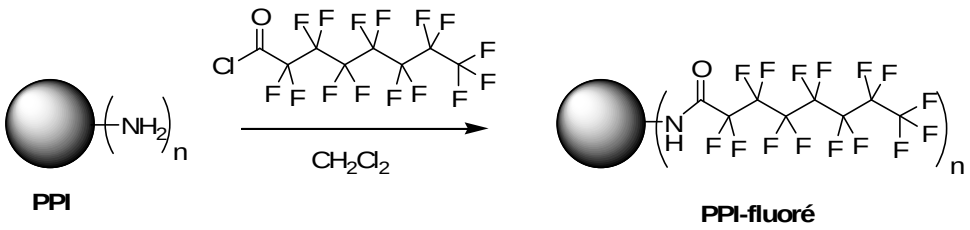


Schéma 85 : Synthèse d'un PPI fluoré

Dans le schéma ci avant, nous avons l'exemple d'un PPI qui est mis en réaction avec un chlorure d'acide perfluoré dans le dichlorométhane pour conduire à un PPI avec une surface perfluorée. Ce dendrimère trouve son application en tant qu'agent de transfert de phase dans les fluides supercritiques[48].

Par ailleurs, Lange *et al.*[49,50] ont introduit un concept original de dendrimères fonctionnalisés par des fonctions phosphines et capables de complexer l'or (I).

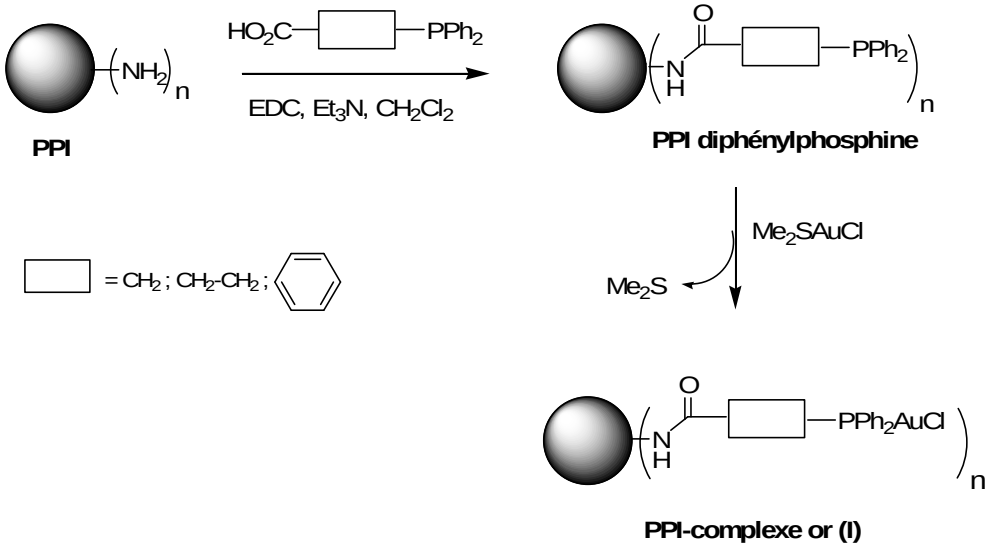


Schéma 86 : Synthèse d'un dendrimère apte à complexer l'or (I)

Les phosphines sont introduites à la surface du dendrimère (PPI) par un couplage peptidique entre un acide (diphénylphosphino)carboxylique et les amines du PPI pour conduire à un PPI avec une surface diphénylphosphine. Cette entité est ensuite traitée avec du chloro(diméthylsulfure)or (I) pour former un complexe, après départ du diméthylsulfure, car l'or de degré d'oxydation (I) a tendance à former des complexes avec les phosphines tertiaires (Schéma 86).

Une dernière modification des dendrimères conduisant à une surface neutre est celle de Baars *et al.*[51] qui ont greffé de longues chaînes alkyles à la surface de PPI de générations différentes.

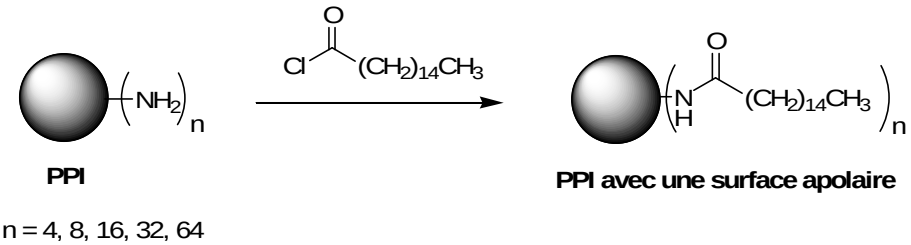


Schéma 87 : Synthèse d'un PPI avec une surface apolaire

Comme le montre le schéma ci-dessus, les chaînes alkyles sont introduites à la surface du PPI par l'intermédiaire d'un chlorure d'acide gras qui réagit avec les amines du dendrimère pour conduire suite à la formation d'une liaison amide à un PPI avec une surface apolaire. Cette nouvelle macromolécule a été testée avec succès comme agent de transfert de phase, pour extraire des xanthènes anioniques (rose Bengale, fluorescéine) solubilisés dans l'eau.

En dehors des diverses modifications chimiques réalisées sur les dendrimères de type polyamine conduisant à des surfaces monofonctionnelles, il existe aussi des exemples de modifications conduisant à dendrimères dotés de plusieurs fonctions.

IV.2.4 Les dendrimères multifonctionnels

Afin d'illustrer ce type de dendrimère, nous avons choisi de présenter quelques exemples de dendrimères destinés à lutte contre le cancer. L'inconvénient majeur avec l'administration de médicaments anticancéreux, est l'attaque sans discrimination aussi bien des cellules cancéreuses que des cellules saines. Les effets secondaires néfastes dus à ce traitement peuvent toutefois être réduits par l'élaboration d'un système de vectorisation spécifique des cellules tumorales. Pour cela, une stratégie appelée ciblage actif peut être suivie, dans laquelle les fonctionnalités qui répondent à des récepteurs surexprimés sur les cellules tumorales sont jointes au transporteur de drogue. Les récepteurs de folate, existants sous trois formes majoritaires (α, β et γ), sont surexprimés au sein de nombreuses tumeurs (de l'ovaire, de l'endomètre, du sein, rénales, etc.…), sous leur forme α. Ainsi, le ciblage des récepteurs de folate pour la vectorisation de médicaments anticancéreux est un bon choix. De plus, la forte affinité du récepteur pour le folate n'est pas altérée lorsque celui-ci est couplé à une autre molécule[52]. Partant de ce principe, des chercheurs ont synthétisés des dendrimères polyfonctionnels sur lesquels sont greffés de l'acide folique ainsi qu'un agent anticancéreux[53-56,52].

En 2005, Majoros *et al.*[55] synthétisent un PAMAM sur lequel ils ont greffés l'acide folique (FA), du méthotrexate (MTX), un fluorophore ainsi que des fonctions acétyles et hydroxyles. La structure de l'acide folique ainsi que celle du méthotrexate sont représentées dans le schéma ci-dessous. Le méthotrexate (Figure 24), analogue structural de l'acide folique, est une molécule qui inhibe la prolifération des cellules cancéreuses en inhibant une enzyme impliquée dans la synthèse de l'ADN.

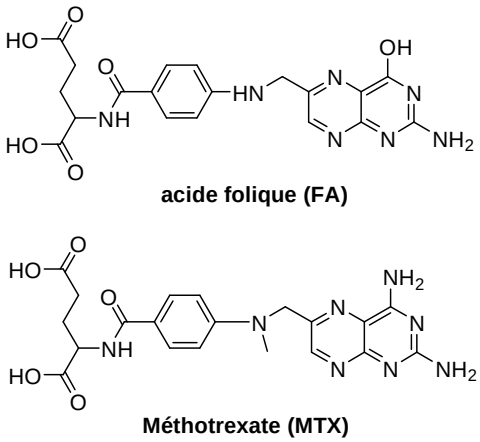


Figure 24 : Structure de l'acide folique et du méthotrexate

Ils sont partis d'un PAMAM G5 qui subit d'abord une acétylation partielle. Une partie des amines restantes réagit ensuite avec du FITC, introduisant ainsi un groupement chromophore.

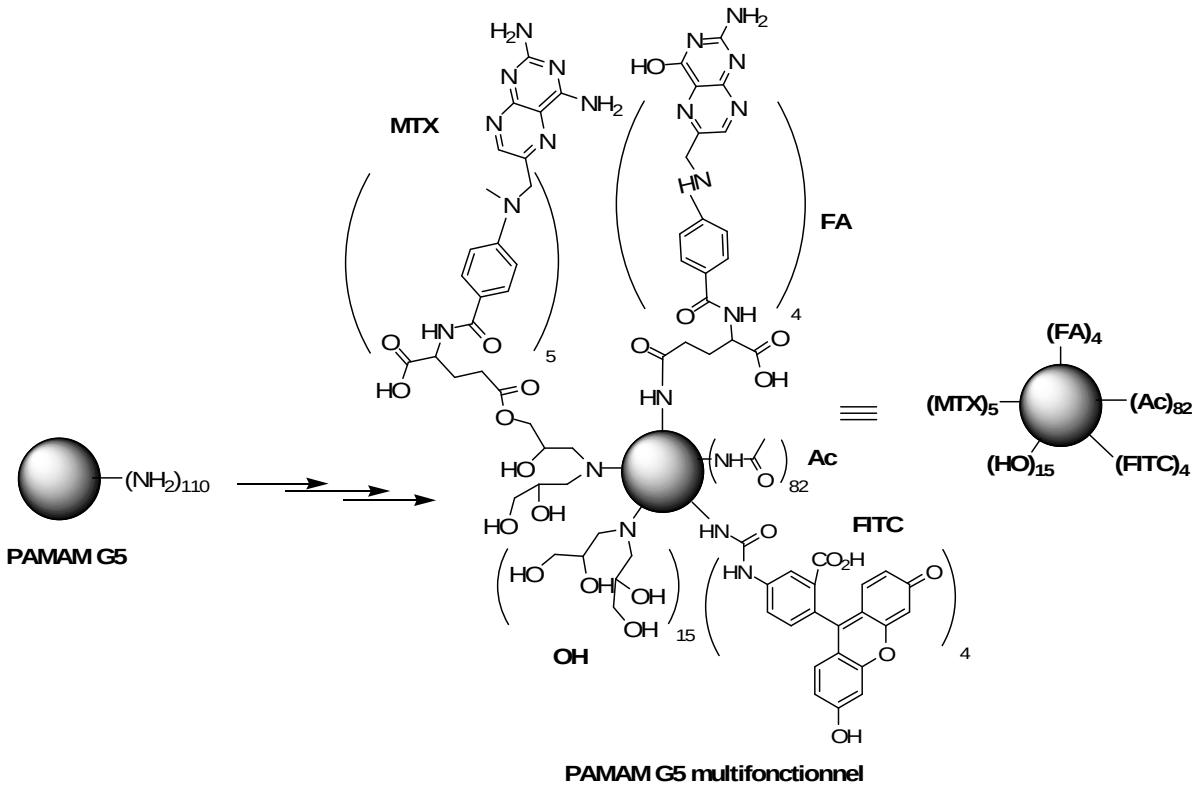


Schéma 88 : PAMAM de 5e génération multifonctionnalisé

L'acide folique est ensuite introduit lors d'un couplage peptidique classique, puis les amines libres restantes sont hydroxylées par du glycidol (2,3-époxy-1-propanol). Enfin, au travers d'une liaison ester le méthotrexate est greffé sur une partie des hydroxyles du dendrimère pour conduire à un PAMAM multifonctionnel (Schéma 88). L'acétylation et l'hydroxylation

servent à masquer les charges positives du PAMAM natif. La maîtrise des conditions réactionnelles leur a permis d'introduire les différentes fonctions avec un bon contrôle du nombre de motifs introduits sur le dendrimère. De ce fait, ils ont synthétisés plusieurs dendrimères en modulant le nombre et le type de fonctions greffées à la surface du PAMAM G5.

En 2006, ils ont remplacé le méthotrexate par du paclitaxel, un autre agent anticancéreux[56] (Schéma 89).

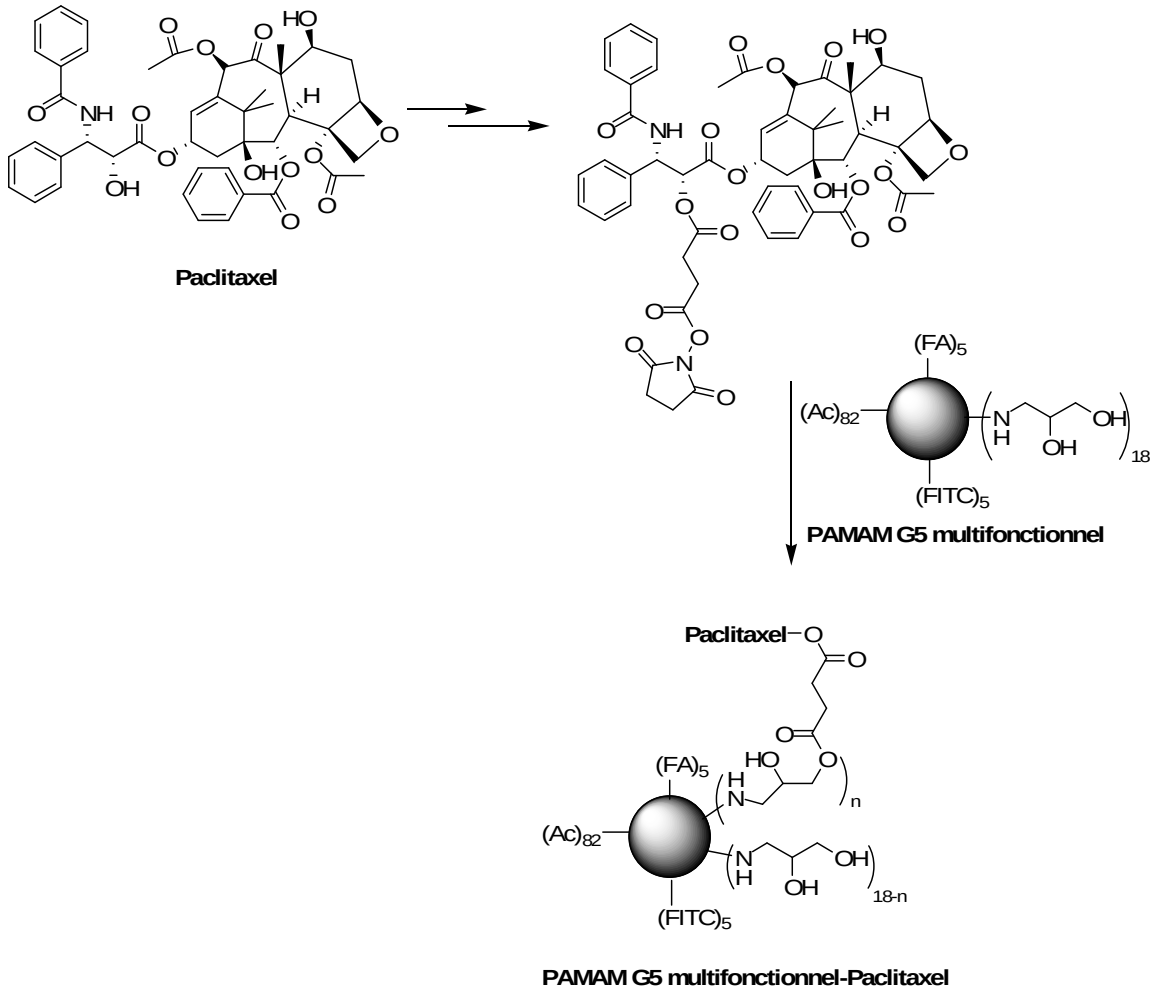


Schéma 89 : PAMAM de 5e génération contenant du paclitaxel

Le paclitaxel est modifié sur l'hydroxyle en 2' par de l'anhydride succinique, puis la fonction acide carboxylique introduite est activée en ester de *N*-hydroxysuccinimide. Cette molécule est alors mise en réaction avec un PAMAM G5 ayant des fonctions acétyles, hydroxyles, de l'acide folique et un dérivé de fluorescéine, pour conduire par estérification, à un PAMAM contenant du paclitaxel.

Par ailleurs, il existe des dendrimères conçu pour le traitement du cancer par la thérapie basée sur la capture de neutrons par le bore (BNCT : « Boron Neutron Capture Therapy »). Cette thérapie consiste à injecter un composé contenant du bore (enrichi en ^{10}B), se concentrant de façon sélective dans les cellules cancéreuses. La tumeur est ensuite irradiée par un faisceau de neutrons produits par un accélérateur de particules. Lorsqu'un atome de bore capture un neutron, il s'en suit une réaction nucléaire qui détruit la cellule cancéreuse tout en préservant les cellules saines situées autour de celle-ci.

Barth *et al*.[57-59] utilisent des PAMAM de différentes générations qu'ils fonctionnalisent par du bore sous forme de $Na(CH_3)_3NB_{10}H_8NCO$ (Figure 25) et un anticorps spécifique du récepteur EGF (epidermal growth factor), récepteur cellulaire souvent surexprimé dans les tumeurs du cerveau[60].

« Œuvre non reproduite par respect du droit d'auteur. »

Figure 25 : Représentation du $Na(CH_3)_3NB_{10}H_8NCO$ [59]

Dans le schéma 90 ci-après, nous avons reporté un exemple de synthèse d'un dendrimère modifié pour une utilisation en BNCT[59]. Ils partent d'un PAMAM G4 sur lequel vient réagir l'ester activé **1** pour conduire via une liaison amide au dendrimère **2**. La stœchiométrie de cette réaction ne permet la substitution que de quelques fonctions amines (5 au maximum). Les amines libres de **2** attaquent ensuite $Na(CH_3)_3NB_{10}H_8NCO$ pour former des liaisons urées et introduire les atomes de bore à la surface du dendrimère. Le pont disulfure de **3** est alors réduit par du dithiothréitol (DTT) en thiol. Ce groupement thiol peut alors attaquer la fonction maléimide de la molécule **5** pour conduire au dendrimère **6**. Le composé **5** est un espaceur hétérobifonctionnel assurant le lien entre le dendrimère et l'anticorps. Un sucre situé sur l'anticorps subit une oxydation au periodate conduisant à la formation de fonctions aldéhydes. L'anticorps oxydé **7** est alors conjugué au dendrimère **6** via une liaison hydrazone pour former le bioconjugué **8**.

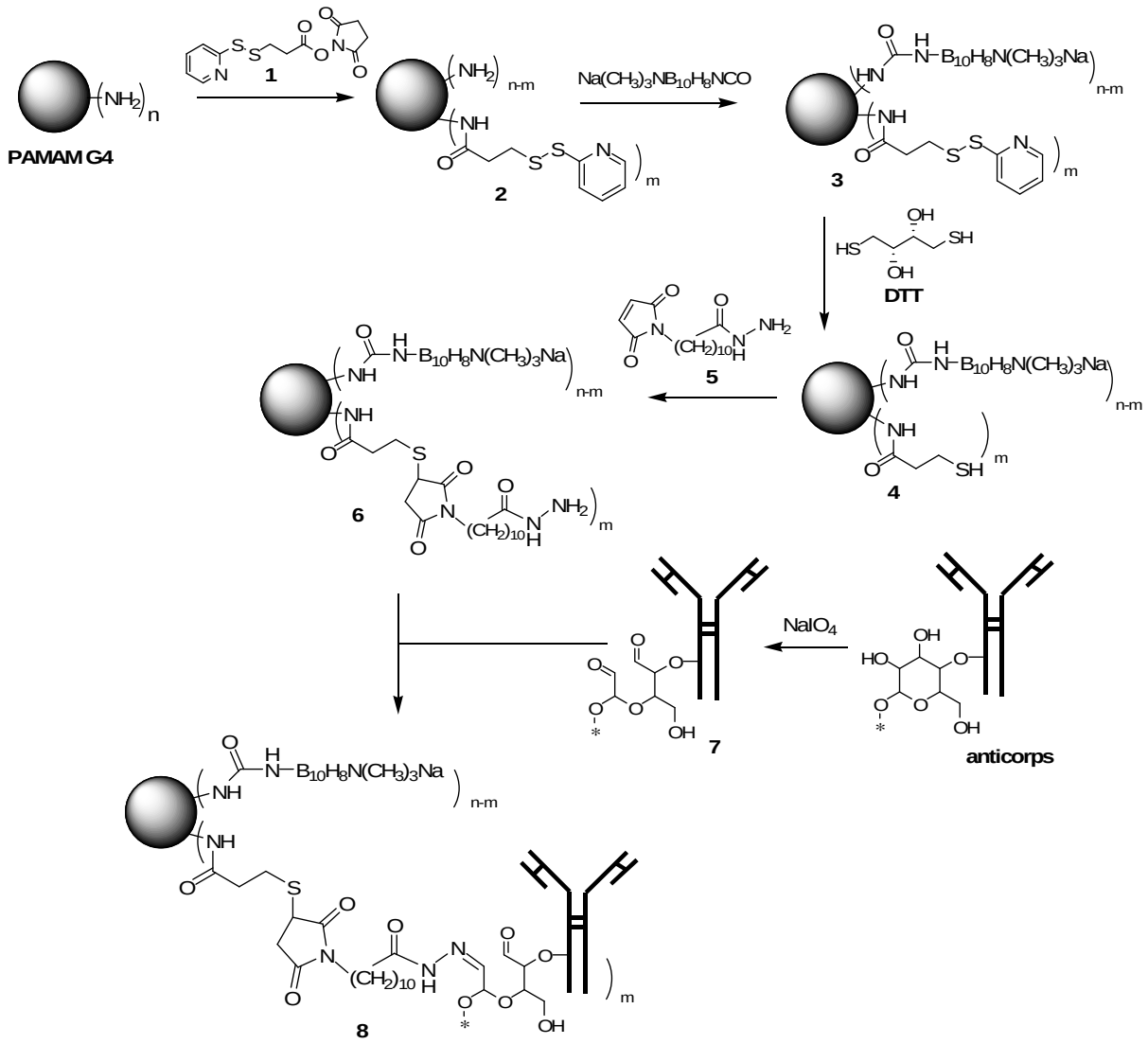


Schéma 90 : Stratégie de synthèse d'un PAMAM G4 modifié pour la BNCT

Barth *et al.*[61] ont aussi synthétisé un autre PAMAM pour la BNCT mais cette fois ils ont visé les récepteurs de folates au lieu des récepteurs EGF comme précédemment. Ainsi, leur dendrimère a été fonctionnalisé par du PEG_{2000}, de l'acide folique et $Na(CH_3)_3NB_{10}H_8NCO$.

A la suite de ce tour rapide sur l'étendue des possibilités de modifications en surface des dendrimères de type polyamine, il apparaît clairement que ces dendrimères sont composés très polyvalents. Par analogie, nous pouvons supposer que les DGL le sont également puisqu'ils sont aussi dotés de fonctions amines. Afin de valider cet aspect concernant les DGL, nous avons tenté de modifier ces macromolécules par diverses fonctions. Bien entendu, nous ne pouvons pas réaliser toute la palette de modifications présentées ci-avant. Par conséquent, nous avons choisi de réaliser des modifications conduisant à chaque type de surface

(cationique, anionique et neutre). Ainsi, dans les paragraphes suivants nous présenterons la modification des DGL en surface par des motifs guanidines (surface cationique), acide succinique (surface anionique), acide aspartique et enfin, par des sucres (surface neutre). A l'occasion de cette dernière modification, nous aborderons aussi les aspects relatifs à la complexation du bore par les DGL greffés par des sucres.

IV.3 Résultats et discussion

Les différentes générations de DGL, utilisées dans les synthèses présentées ci après, ont été préparées selon le procédé exposé dans le chapitre consacré à la polymérisation du Lys(TFA)-NCA.

IV.3.1 Guanidylation des DGL

La guanidylation partielle des générations 2 et 3 a déjà été réalisée par Paleos *et al.*[62] en 2007, en utilisant comme réactif le chlorure de 1*H*-pyrazole-1-carboxamidinium dans le méthanol fraîchement distillé, en présence de DIEA. Ils ont obtenu des DGL guanidylés à 25% et à 10% en partant respectivement des DGL **G2** et **G3**. Dans ce travail, nous avons procédé à la guanidylation d'un DGL **G2** en modulant le nombre de motifs guanidiniums introduits à sa surface. Le DGL **G2-Guana** a été synthétisé en milieu aqueux, en utilisant différents rapports molaires entre le DGL **G2** et le chlorure de 1*H*-pyrazole-1-carboxamidinium (Schéma 91).

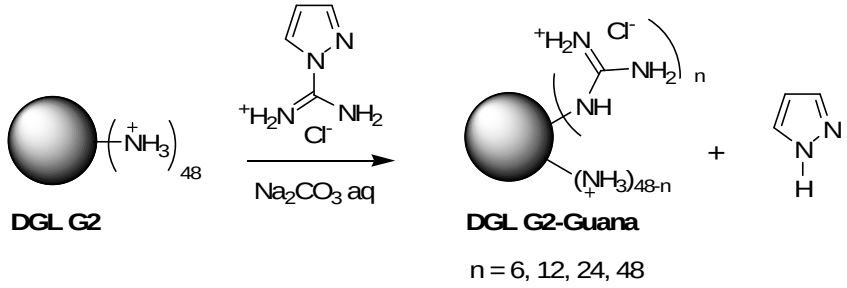


Schéma 91 : Guanidylation du DGL **G2**

Sur les spectres RMN ^{1}H des différents produits obtenus, il n'y a pas de signaux caractéristiques du groupement guanidinium. Mais, le déblindage des protons du CH_2 en position epsilon de la chaîne latérale de la lysine a été attribué au groupement guanidinium fixé au DGL.

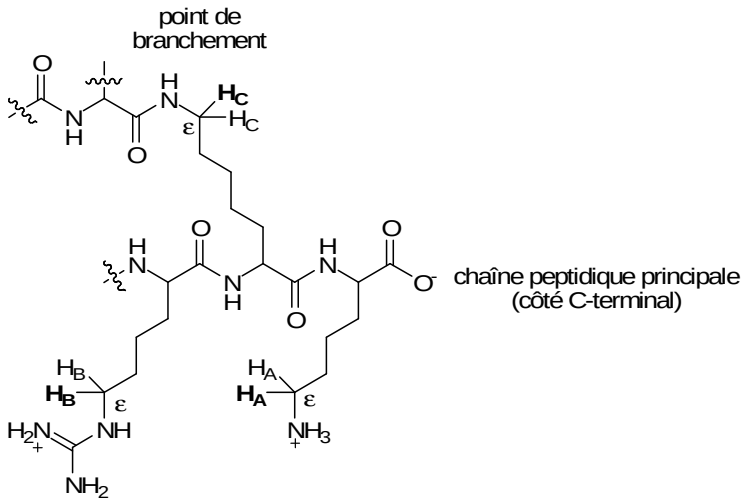


Figure 26 : Représentation des 3 types de H en position epsilon dans le DGL guanidylé

En théorie, il est possible de déterminer le pourcentage d'amines guanidylées à la surface de chaque **G2-Guana** synthétisé à partir des intégrations des protons H_A et H_B, représentés sur la figure 26. Cependant, du fait de la proximité des déplacements chimiques des protons H_B (3,03 ppm) et H_C (3,15 ppm), il y a un recouvrement des signaux sur le spectre RMN, faussant la valeur du rapport d'intégration entre H_A et H_B. Il y a une surévaluation de ce rapport comme le montre le tableau ci-dessous.

carboxamidinium/amine [a]	$H_B/(H_A+H_B)$ [b]
0,125	0,30
0,25	0,42
0,50	0,67
1	0,93

Tableau 11 : Analyse des DGL **G2** guanidylés par RMN ^{1}H. **[a]** rapport molaire. **[b]** rapport d'intégration

Néanmoins, avec toutes les réserves sur l'évaluation expérimentale du rapport d'intégration, nous pouvons dire que la proportion d'amines guanidylées est en relation étroite avec le rapport molaire carboxamidinium/amine.

Ainsi, nous avons démontré qu'il est possible de moduler le nombre de fonctions introduites à la surface du DGL, en jouant sur le rapport molaire réactif de couplage/amine.

IV.3.2 Synthèse de DGL anioniques et neutres

Nous avons opté pour la modification des DGL par deux substrats distincts pour obtenir deux types d'entités différentes. Ces modifications ont été effectuées avec des dérivés de l'acide succinique et de l'acide aspartique sur la 2e génération de DGL pour conduire respectivement à un DGL anionique et un DGL neutre à pH physiologique.

IV.3.2.1 Synthèse de DGL anionique

Pour synthétiser un DGL anionique, nous avons fait réagir le DGL **G2** avec l'acide succinique, sous forme d'anhydride, selon le protocole décrit par Matthews *et al*.[17].

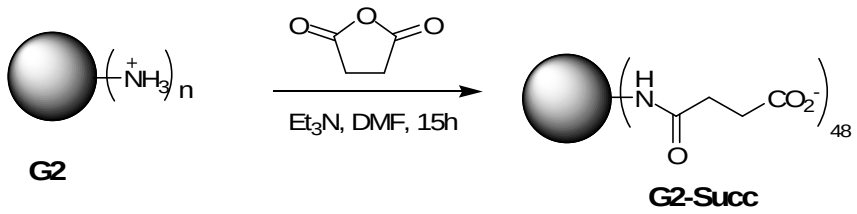


Schéma 92 : Greffage d'acide succinique sur le DGL **G2**

Cette réaction est réalisée avec un excès de 1,5 équivalent d'anhydride succinique par amine de DGL, en présence de triéthylamine dans le DMF (Schéma 92). La différence des déplacements chimiques de signaux caractéristiques de la lysine (CH_2 epsilon ; 2,93 ppm) et de l'acide succinique (CH_2 ; 2,26 ppm) a permis de déterminer que toutes les amines du DGL ont réagi avec l'anhydride succinique.

IV.3.2.2 Synthèse de DGL neutre

Pour la modification de **G2** par l'acide aspartique, nous avons tout d'abord préparé l'anhydride de l'acide *N*-trifluoroacétyl-aspartique (TFA-Asp-anhydride), composé plus réactif que l'acide aspartique, selon un protocole décrit par Lapidus *et al*.[63].

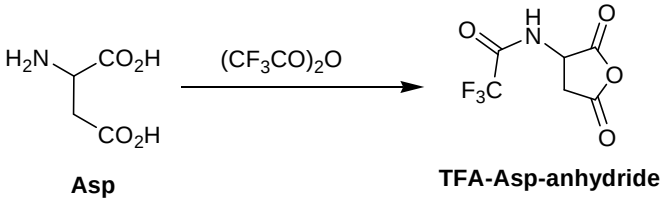


Schéma 93 : Synthèse de TFA-Asp-anhydride

L'acide aspartique est mis en réaction avec l'anhydride trifluoroacétique pour conduire à la formation de TFA-Asp-anhydride (Schéma 93).

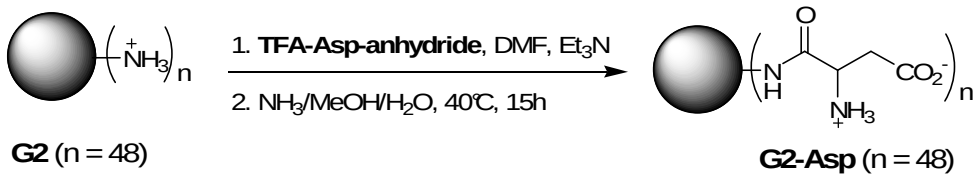


Schéma 94 : Greffage de l'acide aspartique sur le DGL **G2**

Le DGL **G2** est alors mis en réaction avec 2 équivalents de TFA-Asp-anhydride par amine, en présence de triéthylamine, dans le DMF comme le montre le schéma ci-dessus. Le pouvoir inducteur du groupement trifluoroacétyle oriente l'attaque des amines exclusivement sur le carbonyle en α du carbone asymétrique de TFA-Asp-anhydride[63]. Le produit obtenu est ensuite déprotégé en milieu ammoniacal (déprotection des amines) pour conduire à **G2-Asp**. L'analyse du spectre RMN ^{1}H du composé synthétisé permet de déterminer le pourcentage d'amines qui ont réagit, en calculant le rapport des intégrations du signal des protons du CH_2 en epsilon de la lysine (3,02 ppm), et de celui des protons du CH_2 de l'acide aspartique (2,77 ppm). Ce rapport nous indique que la réaction a été totale, et que par conséquent, toutes les amines du DGL **G2** sont couplées à un acide aspartique.

Ainsi, le greffage de l'acide aspartique et de l'acide succinique sur les DGL a été réalisé avec succès, laissant place à des entités totalement anioniques (**G2-Succ**) et neutres (**G2-Asp**) à pH physiologique. Les travaux sur la modification des DGL **G2** ont été réalisés en collaboration avec COLCOM.

IV.3.3 Greffage de sucres sur les DGL par amination réductrice

Nous avons choisi de réaliser la glycosylation réductrice des DGL dans le but de tester leur capacité à complexer le bore. Hormis son intérêt en chimie organique (hydroboration, réduction,…), le bore a aussi un rôle important pour les organismes vivants. C'est un élément indispensable pour les plantes et il est nécessaire au transport des sucres, à la synthèse de la paroi cellulaire et intervient dans des processus métaboliques[64]. Pour les animaux et les humains, il pourrait aussi s'avérer essentiel. Des travaux ont démontré que les complexes bore-polyols jouent un rôle important au niveau des membranes cellulaires et cérébrales[65]. Par ailleurs, un complexe formé de fructose et de bore (calcium fructoborate) vendu, sous le nom de FruiteX-B®[66], et utilisé en tant que complément alimentaire, présente des propriétés antioxydantes[64] et anti-inflammatoires[67]. L'action du bore peut être mise en relation avec le fait que l'acide borique forme des esters cycliques avec les diols ou polyols de substances se

trouvant dans l'organisme comme les sucres, les nucléotides et les vitamines[68]. En effet, le bore sous forme d'acide borique peut former des complexes de type B^-L, B_2^-L et B^-L_2 avec un ligand possédant des diols en cis comme le montre la figure ci-dessous.

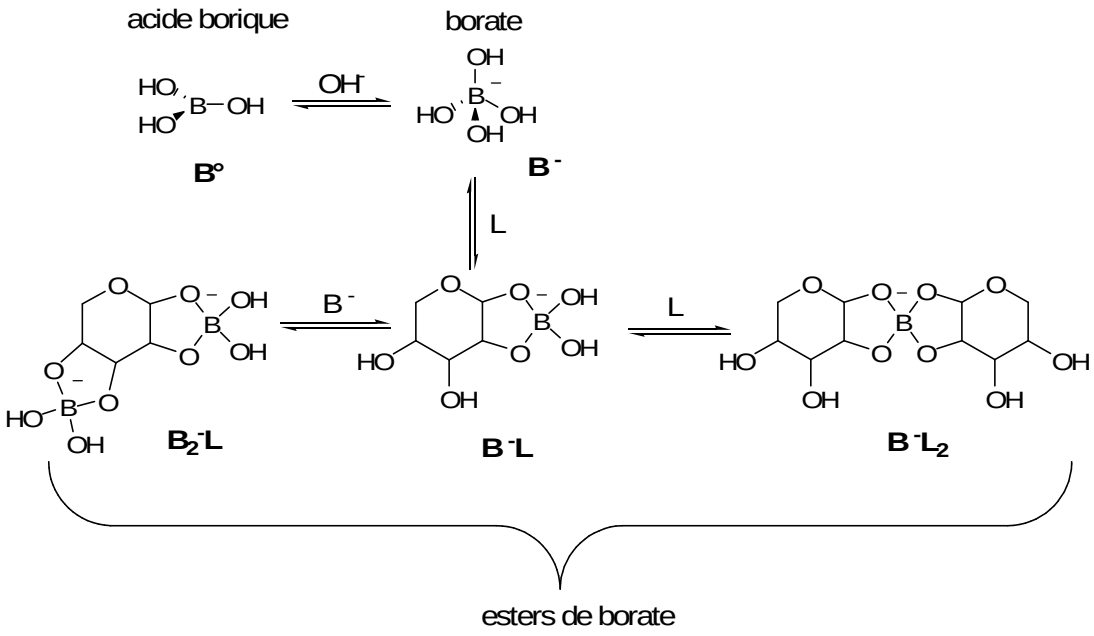


Figure 27 : Equilibres entre l'acide borique, le borate et les esters de borate. L : ligand (sucre).

Ainsi, nous avons envisagé la possibilité d'utiliser des DGL greffés par des sucres, que nous noterons **DGL-S** par la suite, comme vecteurs de bore dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Scorei. D'autre part, ils pourraient être utilisés en tant qu'outils analytiques d'aide à la séparation des hémoglobines glyquées, en particulier HbA1c, de celles qui ne le sont pas, en électrophorèse capillaire.

Afin de réaliser la glycosylation réductrice des DGL, nous nous sommes appuyés sur la méthode utilisée par Baigude *et al.*[69], développée plus haut. Brièvement, cette méthode consiste à introduire des sucres à la surface de dendrimères par amination réductrice. Nous avons choisi d'utiliser le ribose, le galactose et lactose (Figure 28) pour le greffage car ces sucres ont la particularité d'avoir des diols en cis, autorisant la formation des esters de borate.

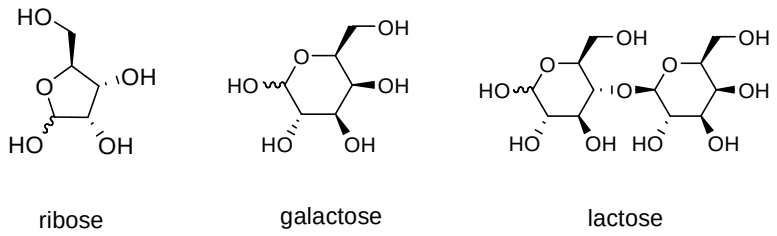
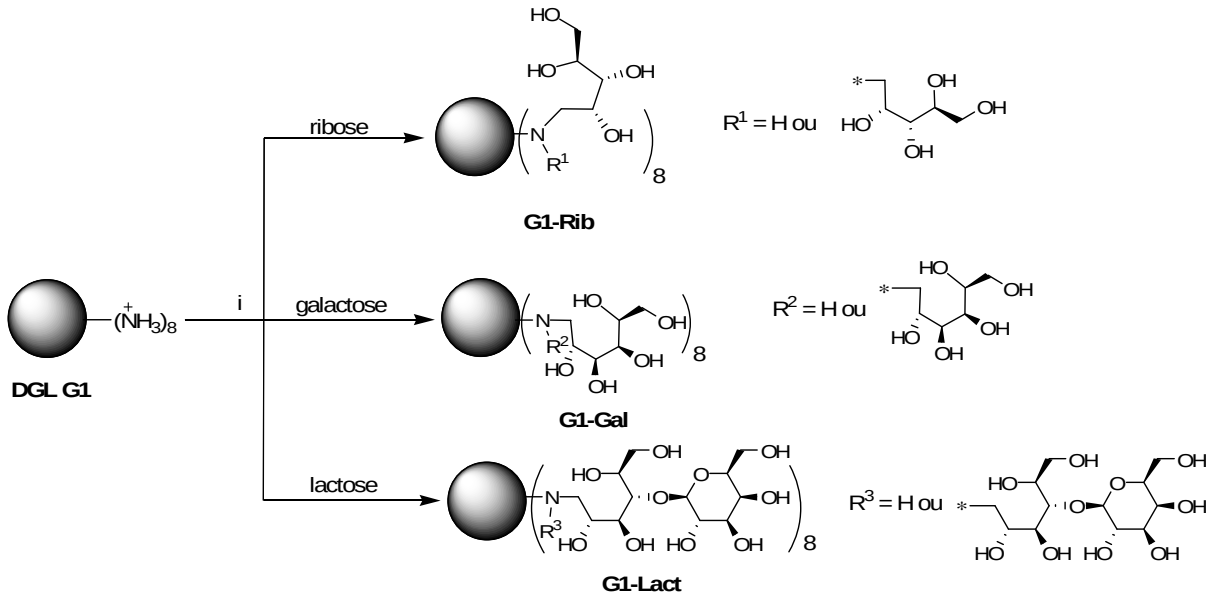


Figure 28 : Structure des sucres utilisés

Nous avons synthétisé les **DGL-S** en partant du DGL **G1**, selon le schéma présenté ci-dessous.



i. tampon borate 0,4 M pH 9, complexe borane/pyridine, 50°C, 7 jours

Schéma 95 : Greffage du ribose, du galactose et du lactose sur le DGL **G1**

Dans ces synthèses, nous nous sommes placés dans des conditions expérimentales autorisant le couplage de deux sucres par amine de DGL, afin de maximiser la quantité de bore qui pourra être complexée par ces nouveaux objets. Le DGL **G1** est mis en réaction avec 2 équivalents de sucre par amine, dans une solution de borate tamponnée à pH 9, en présence de 1,6 équivalent de complexe borane/pyridine par sucre introduit, pour conduire à la formation du **G1**-sucre selon le protocole de Baigude *et al.*[69]. L'utilisation d'un milieu constitué de borates permet d'obtenir des macromolécules contenant déjà du bore complexé sous forme d'esters de borate.

A l'issue de la synthèse, le brut réactionnel est composé du **G1**-sucre, du sucre sous forme réduite (polyol) qui n'a pas réagit, éventuellement du **G1** de départ, de sels de borate et de pyridine, le tout en solution aqueuse. Ce mélange est tout d'abord concentré sous vide afin d'éliminer la pyridine puis lyophilisé. La purification d'un tel système est relativement délicate. Par exemple, les polyols présents au sein du brut réactionnel, qu'ils soient liés au **G1** ou non, forment des complexes avec les ions borates chargés négativement, rendant laborieuse l'utilisation d'une résine échangeuse d'anions. D'autre part, le passage du brut sur une résine échangeuse de cations risquerait de fixer les amines secondaires ou tertiaires du **G1**-sucre par de fortes interactions sur cette résine, entraînant des difficultés pour décrocher ce dernier. Par ailleurs, l'exclusion stérique sur colonne Sephadex® n'est pas non plus adaptée à la séparation de macromolécules de faibles masses molaires comme le **G1**.

Nous nous sommes donc orientés vers une méthode plus simple : la dialyse. Elle a pour principale fonction d'éliminer les sels présents dans le brut tout en limitant la perte de **G1**-sucre. Du reste, avec cette méthode, selon Baigude *et al.*[41], l'élimination totale des polyols n'ayant pas réagit est extrêmement difficile, même en faisant une dialyse de 3 jours avec une membrane ayant un seuil de coupure adéquat.

La caractérisation des composés synthétisés s'est révélée relativement complexe. Tout d'abord, nous avons employé comme technique analytique l'électrophorèse capillaire (EC). Grâce à cette méthode, nous avons pu établir que toutes les molécules de DGL mises en jeu lors de la synthèse ont réagi avec les sucres présents. En effet, dans la figure 29 ci-après, nous avons superposé les électrophérogrammes de **G1**, **G1-Rib**, **G1-Gal** et **G1-Lact**, et il apparaît clairement qu'il ne reste plus de DGL de départ.

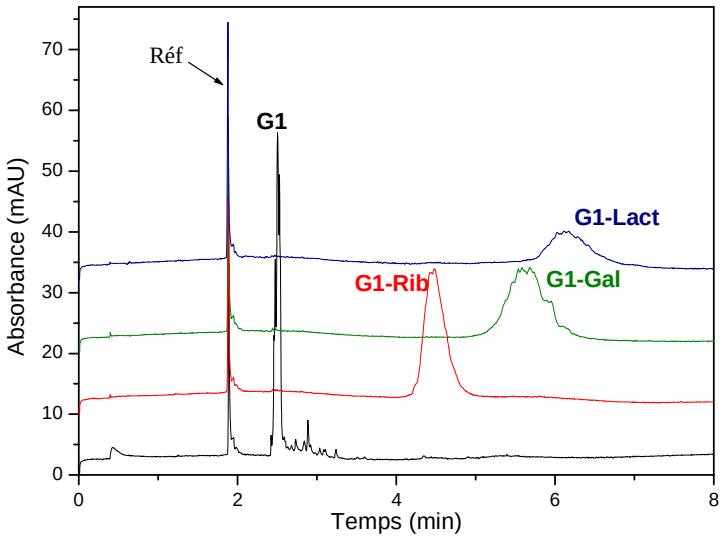


Figure 29 : Comparaison entre **G1** et les **DGL-S** par EC. *Conditions électrophorétiques : capillaire en silice vierge, 33,5 cm (25 cm à la fenêtre de détection) x 50 µm. Electrolyte : tampon 125 mM Tris / 250 mM H_3PO_4 (pH 2). Etalon interne : Imidazole à 0,5 g/L. Concentration de l'échantillon : 5 g/L. Tension appliquée : + 15 kV. Détection UV à 200 nm.*

Toutefois, il faut noter que le mode détection employé, ici la détection UV, ne permet pas de conclure sur la présence ou non de polyols libres résiduels dans les produits obtenus : l'absorbance observée correspond uniquement aux liaisons amide du DGL. Par la suite, nous avons tenté d'analyser ces composés par spectrométrie de masse MALDI-TOF afin d'évaluer le degré de substitution des DGL, sans succès car la désorption s'est révélée impossible. Nous avons alors analysé nos échantillons par RMN ^{1}H. Un exemple de spectre RMN de **DGL-S** est présenté dans la figure 30 ci-après, en comparaison avec celui d'un **G1** natif.

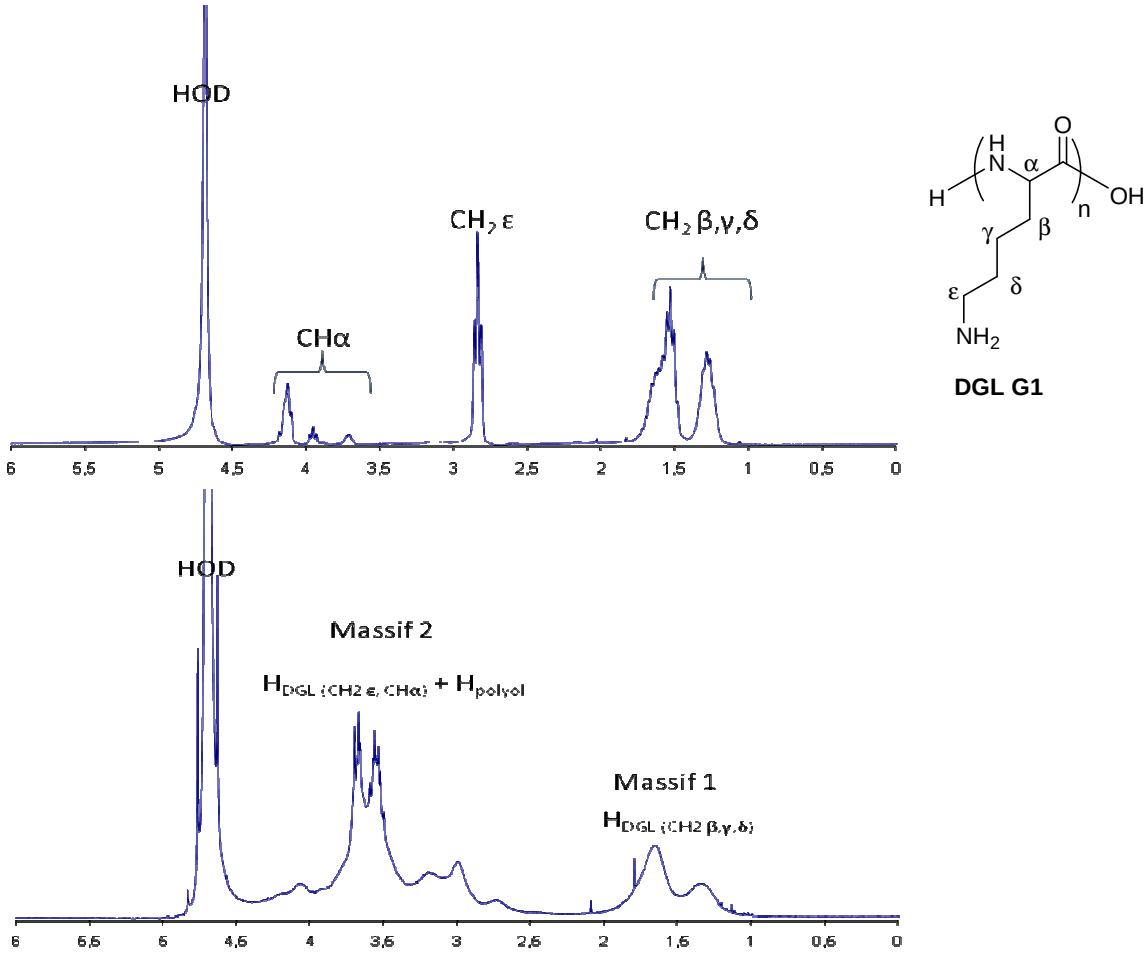


Figure 30 : Spectres RMN ^{1}H (D_2O, 300 MHz) de G1 (en haut) et G1-Rib (en bas)

Nous pouvons distinguer sur le spectre RMN de **G1-Rib** deux massifs. Le premier, caractéristique du DGL, correspondant aux CH_2 en position β, γ et δ de la chaine latérale de la lysine, entre 1 et 2,1 ppm. Et le second, entre 2,5 et 4,5 ppm, correspondant aux protons des polyols et aux protons du CH α et du CH_2 en position ε de la lysine. Il vient que la différence d'intégration du second massif observée sur le spectre RMN d'un **DGL-S** par rapport à celui d'un DGL natif est attribuée directement aux protons des polyols. Suivant ce raisonnement, nous avons calculé pour chaque échantillon un nombre moyen de polyols par unité lysine. Ces résultats sont présentés dans le tableau ci-après.

DGL-S	Nombre moyen de polyols/lysine
G1-Rib	1,8
G1-Gal	2,7
G1-Lact	2,3

Tableau 12 : Estimation du nombre moyen de polyols par unité lysine par RMN ^{1}H

Nous remarquons dans le tableau 12 que le nombre moyen de polyols calculé par unité lysine pour chaque composé est voisin de la valeur théorique maximale 2. Cela semble cohérent car nous avons utilisé des conditions de synthèse permettant de coupler deux polyols par amine. Toutefois, pour **G1-Gal** la valeur calculée est supérieure à la théorie. Cela peut être expliqué par le fait qu'il reste des polyols non liés au **G1** au sein de nos échantillons.

Afin de corroborer ces premiers résultats, nous avons calculé le nombre moyen de polyols par unité lysine par une autre méthode expérimentale. Pour cela, nous avons effectué une analyse élémentaire de nos échantillons. Le DGL étant une macromolécule polydisperse, doté d'une distribution de masses moléculaires dissymétrique, il est très difficile d'établir directement, à partir de l'analyse élémentaire, une formule brute moyenne pour les **DGL-S**. Toutefois, il est possible de calculer pour chacun un nombre moyen de polyols par unité lysine, à partir des valeurs du rapport massique C/N, ce qui permet de faire abstraction du caractère polydisperse du DGL.

Echantillon	Rapport massique C/N[a]	Nombre moyen de polyols/lysine
G1-Rib	6,99	2,1
G1-Gal	9,35	2,6
G1-Lact	20,35	3,5

Tableau 13 : Estimation du nombre moyen de polyols par unité lysine par analyse élémentaire des **DGL-S**. [a] : valeurs corrigées du pourcentage de carbone apporté par la présence de sels de trifluoroacétate au sein du DGL.

Nous voyons dans le tableau ci-dessus que les nombres moyens de polyols par unité lysine calculés à partir de l'analyse élémentaire sont très proches de ceux calculés à partir de la RMN ^{1}H (Tableau 12), sauf dans le cas de **G1-Lact**. Néanmoins, ces résultats tendent à confirmer notre hypothèse selon laquelle il y a des polyols non liés directement au DGL au sein de nos échantillons, notamment pour **G1-Gal** et **G1-Lact**.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons mis du **G1-Lact** en suspension dans du méthanol d'un côté, et dans un mélange méthanol-eau 70-30 d'un autre côté pendant environ 20 minutes. Les suspensions ont été filtrées et les solides obtenus ont été séchés puis analysés par RMN ^{1}H, afin d'observer une éventuelle diminution du nombre moyen de polyols par unité lysine. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau suivant.

Solvant utilisé	Diminution du nombre moyen de polyols/lysine (% molaire)
méthanol	23
méthanol-eau (70-30)	55

Tableau 14 : Estimation par RMN ^{1}H de la diminution du nombre moyen de polyols/lysine en fonction du solvant utilisé

L'analyse des spectres RMN ^{1}H des solides après filtration, nous révèle qu'il y a effectivement une diminution du nombre moyen de polyols par unité lysine et celle-ci est d'autant plus importante du fait de la présence d'eau dans le solvant utilisé. Lorsque **G1-Lact** est mis en suspension dans le mélange de solvants méthanol-eau (70-30), non seulement les polyols sont plus solubles que dans le méthanol seul, mais les esters de borates éventuellement présents sont hydrolysés, car la suspension est à pH 7[70]. Ainsi, les polyols qui sont éliminés de **G1-Lact** étaient soit libres (**I**), soit complexés par du bore (**II, III, IV**) comme le montre la figure ci-dessous.

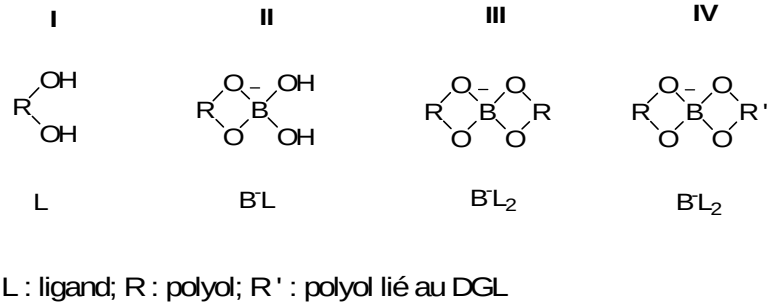


Figure 31 : Configurations possibles des polyols au sein des **DGL-S**. I : polyol libre ; II : bore complexé à un polyol ; III : bore complexé à 2 polyols ; IV : bore complexé à 2 polyols dont l'un est lié au DGL.

Etant donné l'utilisation d'un tampon borate comme solvant de synthèse, il apparaît logique de penser que du bore est présent dans nos échantillons. Par conséquent, nous avons vérifié par analyse élémentaire de ces derniers la présence de cet élément. L'analyse élémentaire confirmant sa présence, nous avons voulu estimer l'efficacité de la dialyse vis-à-vis de

l'élimination des ions borates. Dans le tableau ci-après, nous avons comparé le rapport massique N/B avant et après dialyse.

	G1-Rib	G1-Gal	G1-Lact
rapport massique N/B (av. dialyse)[a]	4,93	4,93	5,01
rapport massique N/B (ap. dialyse)[b]	0,45	0,76	1,05

Tableau 15 : Comparaison des rapports massiques N/B avant et après dialyse. [a] calculé à partir des quantités de réactifs utilisées. [b] calculé à partir de l'analyse élémentaire

Dans ce tableau, nous observons que les rapports massiques N/B calculés diminuent fortement après la dialyse, ce qui prouve l'efficacité de cette méthode pour éliminer les borates. Cependant, il reste une certaine quantité de borate au sein du rétentat qui n'a pas pu être dialysée. Nous supposons qu'il s'agit de borates complexés par des polyols liés au DGL ou non, suffisamment stables pour ne pas être déstabilisés, dans les conditions de dialyse employées. Afin de confirmer notre hypothèse, nous avons effectué une RMN ^{11}B de nos échantillons.

L'étude par RMN ^{11}B permet de déterminer la stœchiométrie des complexes formés entre le bore et un ligand. Le principe de l'analyse repose sur le fait que l'équilibre entre l'acide borique et le borate est un échange rapide par rapport à l'échelle de temps de la RMN, et par conséquent, ne donne qu'un signal moyen en RMN du bore. Par contre, celui entre le borate et les esters de borate est relativement lent et donne des signaux caractéristiques pour chaque espèce. Les valeurs des déplacements chimiques varient selon la nature du sucre et la stœchiométrie du complexe[71].

Type de complexe	**Déplacements chimiques ^{11}B (ppm) [a]**	
	B^-L	B^-L_2
1,2-bidentate	-12,6 à -14,9	-7,7 à -11,9
1,3-bidentate	-17,9 à -18,5	-18,4 à -19,0
1,3,5-tridentate	-18,1 à -19,4	-

Tableau 16[72] : Déplacements chimiques caractéristiques des esters de borate en RMN ^{11}B. [**a**]Référence externe : acide borique.

Dans le tableau ci-dessus, sont reportés les principaux déplacements chimiques observés en RMN ^{11}B par Van Duin *et al.*[72] en fonction de la stœchiométrie des esters de borate. Ces

déplacements chimiques sont exprimés par rapport à l'acide borique, choisi comme référence. Les données de ce tableau seront utilisées par la suite pour analyser nos spectres RMN ^{11}B. Les résultats que nous avons obtenus sont consignés dans le tableau 17ci-dessous.

DGL	% B^-L (1,2-bidentate)	% B^-L_2 (1,2-bidentate)	% autres formes[a]
G1-Rib	36	17	47[b]
G1-Gal	25	75	-
G1-Lact	80	20	-

Tableau 17 : Evaluation de la présence d'esters de borate au sein des **DGL-S** par RMN ^{11}B. Conditions : concentration échantillon : 21,7 g/L dans D_2O. [a] : esters de types B^-L et B^-L_2 (1,3-bidentate). [b] composé de 50% B^-L et 50% B^-L_2.

Dans ce tableau, nous avons exprimé en pourcentage, pour chaque **G1**-polyol, la répartition des esters de borates identifiés sur les spectres RMN. Nous n'avons pas relevé lors de ces analyses la présence d'ions borates libres, d'acide borique ou encore de polyborates pouvant s'être formés lors de la lyophilisation du rétentat : le bore se trouve exclusivement sous forme complexée. Les esters de borate identifiés ont une stœchiométrie (bore:polyol) 1:1 et 1:2. Le bore se trouve majoritairement sous la forme de diester de borate dans **G1-Gal** et sous forme de monoester dans **G1-Rib** et **G1-Lact**. Il faut noter que seul le **G1-Rib** contient des formes 1,3-bidentate. Toutefois, s'il est possible de différencier les complexes de type B^-L et B^-L_2 grâce à la RMN ^{11}B, nous ne pouvons pas conclure quant à la complexation du bore avec un polyol lié au DGL, d'avec un polyol non lié au DGL.

Par ailleurs, nous avons évalué le nombre moyen d'atomes de bore présents par unité lysine pour chaque **DGL-S**, à partir des valeurs des rapports massiques N/B (Tableau 15). Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-dessous.

DGL-S	Nombre moyen d'atomes de bore/lysine
G1-Rib	1,15
G1-Gal	1,96
G1-Lact	2,7

Tableau 18 : Estimation du nombre moyen d'atomes de bore par unité lysine

Nous voyons dans ce tableau que le nombre moyen d'atomes de bore par unité lysine calculé varie entre 1 et 3 selon le DGL considéré. Il est intéressant de noter que ces valeurs évoluent

dans le même sens que les nombres moyens de polyols par lysine calculés en amont (cf. Tableau 13). Il semble logique que ces deux valeurs augmentent en même temps car selon Van Duin *et al.*[72], plus le nombre de fonctions hydroxyles dans un polyol est grand, plus les constantes de stabilité borate-polyol $K_{B\text{-}L}$ et $K_{B2\text{-}L}$ sont élevées. Cette affirmation est appuyée par les travaux d'Evans *et al.*[73] sur la détermination des constantes de stabilité des complexes borate-polyols.

A partir de toutes les informations réunies, nous sommes en mesure de proposer une structure moyenne pour chacun des **DGL-S**. Dans la figure 32 ci-dessous, nous avons représenté **G1-Gal** qui devrait vraisemblablement avoir une structure intermédiaire aux composés **V** et **VI**. La présence des cations Na^+ a été validée par absorption atomique.

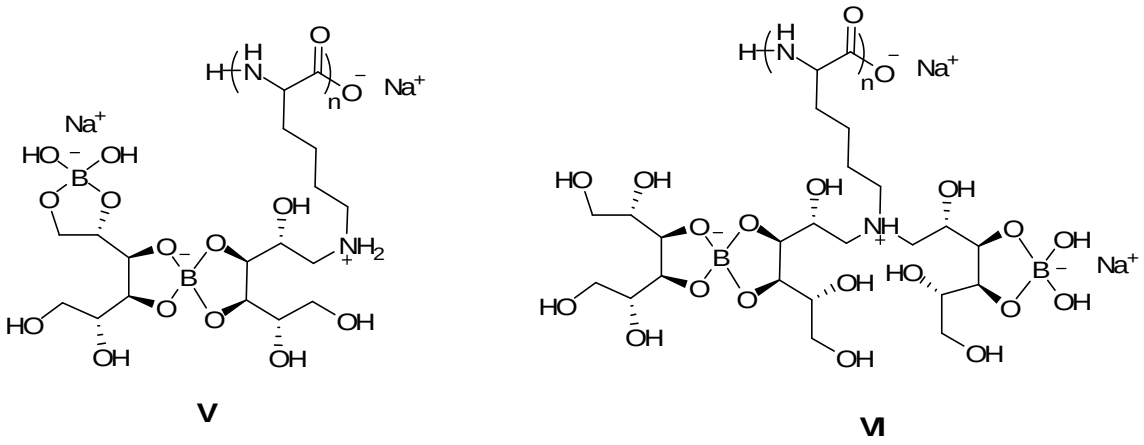


Figure 32 : Représentation de **G1-Gal**

Selon nos estimations, **G1-Gal** est constitué en moyenne de 2,6 polyols et de 2 atomes de bore par unité lysine. Il est raisonnable d'envisager que la plupart des amines de **G1-Gal** sont liées à un polyol complexé à un borate appartenant lui-même à un complexe de type B_2-L (structure **V**). Il faut noter que l'existence de complexes comprenant plusieurs atomes de bore est sujette à controverse. Certains comme Van Duin *et al.*[72] ou encore Evans *et al.*[73] n'en ont pas identifié, tandis que d'autres comme Pettersson *et al.*[74]ou encore Roy *et al.*[75] en font la démonstration pour expliquer leurs résultats expérimentaux. La structure **VI** représente, quant à elle, quelques lysines de **G1-Gal** ayant trois polyols dont deux sont liés à la fonction amine complexés par 2 atomes de bore. Il vient que la structure de **G1-Rib** est plus simple que celle de **G1-Gal** puisqu'il ne comporte que 2 polyols et 1 atome de bore par unité lysine. La structure de **G1-Lact** est quant à elle plus complexe.

Nous avons donc synthétisé trois DGL greffés par des sucres différents par amination réductrice. Les techniques analytiques utilisées pour caractériser ces produits nous ont permis de déceler des quantités résiduelles de bore et de polyols, liées aux conditions opératoires, dans les produits finaux et de proposer une structure moyenne pour chacun d'eux. Comme exemple d'application, ces nouveaux objets ont pu être utilisés en tant qu'outils analytiques d'aide à la séparation des hémoglobines glyquées, en particulier HbA1c, de celles qui ne le sont pas, en électrophorèse capillaire. Un travail réalisé par le Dr. Dušan Koval[76], supervisé par le Pr. Cottet, au sein du laboratoire, a montré que l'ajout de **G1-Gal** dans un électrolyte composé d'un tampon borate permet d'améliorer la séparation entre HbA1c et HbA0 (hémoglobine non glyquée). Ces premiers résultats prometteurs incitent à poursuivre les travaux dans ce domaine.

IV.4 Conclusion

A travers les exemples de synthèse présentés, nous avons démontré la possibilité de modifier les dendrimères greffés de L-lysine en utilisant des réactions chimiques classiques qui ont fait leurs preuves en chimie des dendrimères. En effet, nous avons pu moduler la charge ionique des DGL par guanidylation des amines de surface. D'autre part, nous avons synthétisé des DGL entièrement anioniques (surface carboxylate) et neutres respectivement par l'intermédiaire de dérivés de l'acide succinique et de l'acide aspartique. Enfin, nous avons greffé des sucres sur les DGL, de façon quantitative, par amination réductrice. Ces nouveaux objets, grâce à la présence des fonctions diols apportées par les polyols, ont la capacité de former des complexes en solution avec les ions borates. Cette aptitude a montré tout son intérêt dans la séparation des hémoglobines glyquées des non glyquées, dans un tampon borate, en électrophorèse capillaire. En outre, nous avons effectué des essais préliminaires prometteurs d'amination réductrice avec un dendrimère de 2e génération et le galactose, la caractérisation du produit obtenu étant en cours de réalisation.

Ainsi, nous voyons qu'il est possible d'accéder de façon simple et rapide à de nouvelles classes de DGL. Sans se limiter aux réactions décrites ici, il vient que l'étendue des modifications envisageables et des applications qui en découlent est prodigieuse.

Références bibliographiques

1. Choi, J. S.; Nam, K.; Park, J.-y.; Kim, J.-B.; Lee, J.-K.; Park, J.-s. *Journal of Controlled Release* **2004,** *99*, 445-456.
2. Okuda, T.; Sugiyama, A.; Niidome, T.; Aoyagi, H. *Biomaterials* **2004,** *25*, 537-544.
3. Sideratou, Z.; Foundis, J.; Tsiourvas, D.; Nezis, I. P.; Papadimas, G.; Paleos, C. M. *Langmuir* **2002,** *18*, 5036-5039.
4. Paleos, C. M.; Tsiourvas, D.; Sideratou, Z.; Tziveleka, L. *Biomacromolecules* **2004,** *5*, 524-529.
5. Pantos, A.; Tsiourvas, D.; Nounesis, G.; Paleos, C. M. *Langmuir* **2005,** *21*, 7483-7490.
6. Tsogas, I.; Tsiourvas, D.; Nounesis, G.; Paleos, C. M. *Langmuir* **2006,** *22*, 11322-11328.
7. Tziveleka, L.-A.; Psarra, A.-M. G.; Tsiourvas, D.; Paleos, C. M. *Journal of Controlled Release* **2007,** *117*, 137-146.
8. Bernatowicz, M. S.; Wu, Y.; Matsueda, G. R. *The Journal of Organic Chemistry* **1992,** *57*, 2497-2502.
9. Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. *Journal of Biological Chemistry* **2001,** *276*, 5836-5840.
10. Wang, S.; Gaylord, B. S.; Bazan, G. C. *Advanced Materials* **2004,** *16*, 2127-2132.
11. Chen, C. Z.; Beck-Tan, N. C.; Dhurjati, P.; van Dyk, T. K.; LaRossa, R. A.; Cooper, S. L. *Biomacromolecules* **2000,** *1*, 473-480.
12. Ikeda, T.; Tazuke, S. *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications* **1983,** *4*, 459-461.
13. Matthews, B. R.; Holan, G. In *WO/1995/034595*, **1995**.
14. Matthews, B. R.; Holan, G. In *WO/2000/015240*, **2000**.
15. Matthews, B. R.; Holan, G.; Mardell, K. W. In *WO/2000/015239*, **2000**.
16. Matthews, B. R.; Holan, G.; Karellas, P.; Henderson, S. A.; O'Keefe, D. F. In *WO/2002/079299*, **2002**.
17. Matthews, B. R.; Holan, G.; Giannis, M. P. In *WO/2002/079298*, **2002**.
18. McCarthy, T. D.; Karellas, P.; Henderson, S. A.; Giannis, M.; O'Keefe, D. F.; Heery, G.; Paull, J. R. A.; Matthews, B. R.; Holan, G. *Molecular Pharmaceutics* **2005,** *2*, 312-318.

19. Kaminskas, L. M.; Boyd, B. J.; Karellas, P.; Henderson, S. A.; Giannis, M. P.; Krippner, G. Y.; Porter, C. J. H. *Molecular Pharmaceutics* **2007,** *4*, 949-961.
20. Gajbhiye, V.; Vijayaraj Kumar, P.; Tekade, R. K.; Jain, N. K. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009,** *44*, 1155-1166.
21. Witvrouw, M.; Fikkert, V.; Pluymers, W.; Matthews, B.; Mardel, K.; Schols, D.; Raff, J.; Debyser, Z.; De Clercq, E.; Holan, G.; Pannecouque, C. *Molecular Pharmacology* **2000,** *58*, 1100-1108.
22. Bourne, N.; Stanberry, L. R.; Kern, E. R.; Holan, G.; Matthews, B.; Bernstein, D. I. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000,** *44*, 2471-2474.
23. Kojima, C.; Kono, K.; Maruyama, K.; Takagishi, T. *Bioconjugate Chemistry* **2000,** *11*, 910-917.
24. Okuda, T.; Kawakami, S.; Akimoto, N.; Niidome, T.; Yamashita, F.; Hashida, M. *Journal of Controlled Release* **2006,** *116*, 330-336.
25. Okuda, T.; Kawakami, S.; Maeie, T.; Niidome, T.; Yamashita, F.; Hashida, M. *Journal of Controlled Release* **2006,** *114*, 69-77.
26. Kaminskas, L. M.; Boyd, B. J.; Karellas, P.; Krippner, G. Y.; Lessene, R.; Kelly, B.; Porter, C. J. H. *Molecular Pharmaceutics* **2008,** *5*, 449-463.
27. Kaminskas, L. M.; Wu, Z.; Barlow, N.; Krippner, G. Y.; Boyd, B. J.; Porter, C. J. H. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009,** *98*, 3871-3875.
28. Grabchev, I.; Chovelon, J.-M.; Bojinov, V.; Ivanova, G. *Tetrahedron* **2003,** *59*, 9591-9598.
29. Balzani, V.; Ceroni, P.; Gestermann, S.; Gorka, M.; Kauffmann, C.; Vogtle, F. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **2000**, 3765-3771.
30. Kitchens, K.; Kolhatkar, R.; Swaan, P.; Eddington, N.; Ghandehari, H. *Pharmaceutical Research* **2006,** *23*, 2818-2826.
31. Perumal, O. P.; Inapagolla, R.; Kannan, S.; Kannan, R. M. *Biomaterials* **2008,** *29*, 3469-3476.
32. Baars, M. W. P. L.; Söntjens, S. H. M.; Fischer, H. M.; Peerlings, H. W. I.; Meijer, E. W. *Chemistry - A European Journal* **1998,** *4*, 2456-2466.
33. Schenning, A. P. H. J.; Peeters, E.; Meijer, E. W. *Journal of the American Chemical Society* **2000,** *122*, 4489-4495.

34. Schenning, A. P. H. J.; Elissen-Roman, C.; Weener, J.-W.; Baars, M. W. P. L.; van der Gaast, S. J.; Meijer, E. W. *Journal of the American Chemical Society* **1998,** *120*, 8199-8208.

35. Tsuda, K.; Dol; Gensch, T.; Hofkens, J.; Latterini, L.; Weener; Meijer; De, S. *Journal of the American Chemical Society* **2000,** *122*, 3445-3452.

36. Wang, B.-B.; Zhang, X.; Jia, X.-R.; Li, Z.-C.; Ji, Y.; Yang, L.; Wei, Y. *Journal of the American Chemical Society* **2004,** *126*, 15180-15194.

37. Han, S.; Baigude, H.; Hattori, K.; Yoshida, T.; Uryu, T. *Carbohydrate Polymers* **2007,** *68*, 26-34.

38. Baigude, H.; Katsuraya, K.; Tokunaga, S.; Fujiwara, N.; Satoyama, M.; Magome, T.; Okuyama, K.; Borjihan, G.; Uryu, T. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2005,** *43*, 2195-2206.

39. Aoi, K.; Itoh, K.; Okada, M. *Macromolecules* **1995,** *28*, 5391-5393.

40. Agrawal, P.; Gupta, U.; Jain, N. K. *Biomaterials* **2007,** *28*, 3349-3359.

41. Baigude, H.; Katsuraya, K.; Okuyama, K.; Tokunaga, S.; Uryu, T. *Macromolecules* **2003,** *36*, 7100-7106.

42. Mitchell, J. P.; Roberts, K. D.; Langley, J.; Koentgen, F.; Lambert, J. N. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1999,** *9*, 2785-2788.

43. Aoi, K.; Tsutsumiuchi, K.; Yamamoto, A.; Okada, M. *Tetrahedron* **1997,** *53*, 15415-15427.

44. Aoi, K.; Tsutsumiuchi, K.; Yamamoto, A.; Okada, M. *Macromolecular Rapid Communications* **1998,** *19*, 5-9.

45. Dvornic, P. R. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2006,** *44*, 2755-2773.

46. Dvornic, P. R.; de Leuze-Jallouli, A. M.; Owen, M. J.; Perz, S. V. *Macromolecules* **2000,** *33*, 5366-5378.

47. Kohli, N.; Dvornic, P. R.; Kaganove, S. N.; Worden, R. M.; Lee, I. *Macromolecular Rapid Communications* **2004,** *25*, 935-941.

48. Goetheer, E. L. V.; Baars, M. W. P. L.; van den Broeke, L. J. P.; Meijer, E. W.; Keurentjes, J. T. F. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2000,** *39*, 4634-4640.

49. Lange, P.; Schier, A.; Schmidbaur, H. *Inorganica Chimica Acta* **1995,** *235*, 263-272.

50. Lange, P.; Schier, A.; Schmidbaur, H. *Inorganic Chemistry* **1996,** *35*, 637-642.

51. Baars, M. W. P. L.; Meijer, E. W.; Froehling, P. E. *Chemical Communications* **1997**, 1959-1960.

52. Singh, P.; Gupta, U.; Asthana, A.; Jain, N. K. *Bioconjugate Chemistry* **2008,** *19*, 2239-2252.

53. Quintana, A.; Raczka, E.; Piehler, L.; Lee, I.; Myc, A.; Majoros, I.; Patri, A.; Thomas, T.; Mulé, J.; Baker, J. *Pharmaceutical Research* **2002,** *19*, 1310-1316.

54. Choi, Y.; Thomas, T.; Kotlyar, A.; Islam, M. T.; Baker, J. R. *Chemistry & Biology* **2005,** *12*, 35-43.

55. Majoros, I. J.; Thomas, T. P.; Mehta, C. B.; Baker, J. R. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005,** *48*, 5892-5899.

56. Majoros, I. J.; Myc, A.; Thomas, T.; Mehta, C. B.; Baker, J. R. *Biomacromolecules* **2006,** *7*, 572-579.

57. Barth, R. F.; Adams, D. M.; Soloway, A. H.; Alam, F.; Darby, M. V. *Bioconjugate Chemistry* **1994,** *5*, 58-66.

58. Capala, J.; Barth, R. F.; Bendayan, M.; Lauzon, M.; Adams, D. M.; Soloway, A. H.; Fenstermaker, R. A.; Carlsson, J. *Bioconjugate Chemistry* **1996,** *7*, 7-15.

59. Wu, G.; Barth, R. F.; Yang, W.; Chatterjee, M.; Tjarks, W.; Ciesielski, M. J.; Fenstermaker, R. A. *Bioconjugate Chemistry* **2004,** *15*, 185-194.

60. Gillies, E. R.; Fréchet, J. M. J. *Drug Discovery Today* **2005,** *10*, 35-43.

61. Shukla, S.; Wu, G.; Chatterjee, M.; Yang, W.; Sekido, M.; Diop, L. A.; Muller, R.; Sudimack, J. J.; Lee, R. J.; Barth, R. F.; Tjarks, W. *Bioconjugate Chemistry* **2003,** *14*, 158-167.

62. Tsogas, I.; Theodossiou, T.; Sideratou, Z.; Paleos, C. M.; Hélène Collet; Rossi, J.-C.; Romestand, B.; Commeyras, A. *Biomacromolecules* **2007,** *8*, 3263-3270.

63. Lapidus, M.; Sweeney, M. *Journal of Medicinal Chemistry* **1973,** *16*, 163-166.

64. Scorei, R.; Cimpoiasu, V.; Iordachescu, D. *Biological Trace Element Research* **2005,** *107*, 127-134.

65. Hu, H.; Penn, S. G.; Lebrilla, C. B.; Brown, P. H. *Plant Physiol.* **1997,** *113*, 649-655.

66. Miljkovic, D. In *WO/1998/043652*, **1998**.

67. Scorei, R.; Ciofrangeanu, C.; Ion, R.; Cimpean, A.; Galateanu, B.; Mitran, V.; Iordachescu, D. *Biological Trace Element Research* **2009**.

68. Scorei, R.; Ciubar, R.; Iancu, C.; Mitran, V.; Cimpean, A.; Iordachescu, D. *Biological Trace Element Research* **2007,** *118*, 27-37.

69. Baigude, H.; Katsuraya, K.; Okuyama, K.; Hatanaka, K.; Ikeda, E.; Shibata, N.; Uryu, T. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2004,** *42*, 1400 - 1414.

70. Van Duin, M.; Peters, J. A.; Kieboom, A. P. G.; Van Bekkum, H. *Tetrahedron* **1984,** *40*, 2901-2911.

71. van den Berg, R.; Peters, J. A.; van Bekkum, H. *Carbohydrate Research* **1994,** *253*, 1-12.

72. Van Duin, M.; Peters, J. A.; Kieboom, A. P. G.; Van Bekkum, H. *Tetrahedron* **1985,** *41*, 3411-3421.

73. Evans, W. J.; McCourtney, E. J.; Carney, W. B. *Analytical Biochemistry* **1979,** *95*, 383-386.

74. Pettersson, L.; Andersson, I. *Acta Chemica Scandinavica* **1973,** *27*, 1019-1028.

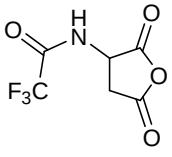
75. Roy, G. L.; Laferriere, A. L.; Edwards, J. O. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **1957,** *4*, 106-114.

76. Koval, D.; IBMM: Montpellier, **2007**.

Partie expérimentale

Les spectres RMN ^{1}H ont été enregistrés à 300 MHz sur un appareil Bruker Avance 300 et à 400 MHz sur Bruker DRX 400. Les spectres RMN ^{13}C et ^{11}B ont aussi été enregistrés sur ce dernier. Les spectres RMN ^{19}F ont été enregistrés sur un appareil Bruker AC 250. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm. Les analyses élémentaires ont été réalisées par le Service Centrale d'Analyse (CNRS Vernaison). Le sodium a été dosé par spectrométrie d'absorption atomique avec un appareil Perkin Elmer AAS 300. Les analyses par électrophorèse capillaires ont été réalisées sur un appareil Agilent EC muni d'un détecteur UV à barette de diodes. Les DGL **G1** et **G2** ont été gracieusement fournis par COLCOM.

Anhydride *N*-trifluoroacétyl-L-aspartique (TFA-Asp-anhydride)



M.M. 211 g/mol

Dans un ballon de 50 mL, est introduit l'acide L-aspartique (4,58 g; 34,44 mmol). Le milieu est refroidi à l'aide d'un bain de glace et l'anhydride trifluoroacétique (12 mL; 86,34 mmol) est ajouté doucement. A la fin de l'ajout, le bain de glace est retiré et le milieu réactionnel est agité à reflux pendant 2 heures. Une fois revenu à température ambiante, l'anhydride aspartique précipite par ajout d'éther de pétrole et est isolé par filtration sous vide. Le résidu est lavé à l'éther.

Rendement : 90% (6,54 g)

RMN ^{1}H ($DMSO_{d6}$, 300 MHz) δ = 3,11 (1H, dd, J = 18,7 Hz et 6,25 Hz, CH_2); 3,36 (1H, dd, J = 18,7 Hz et 10,07 Hz, CH_2); 5,02 (1H, m, CH); 10,27 (1H, d, J = 7,32 Hz, NH)

DGL G2-Asp

Dans un monocol de 25 mL, sont introduits le DGL **G2** (200 mg; 0,023 mmol) dissous dans 2 mL de DMF, ainsi que l'anhydride *N*-trifluoroacétyl-L-aspartique (471 mg; 2,23 mmol) et la triéthylamine (466 µL, 3,35 mmol). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 2 jours. Le DMF est alors évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans une solution ammoniacale $MeOH/H_2O$ (4/1). Cette suspension est

chauffée à 50°C sous agitation pendant 1 nuit. Le milieu réactionnel est alors concentré sous vide puis filtré sur colonne de Sephadex® G 25 (éluant : bicarbonate d'ammonium 0,1 M).
RMN ^{1}H (D_2O, 300 MHz) δ = 1,22-1,61 (288H, m, CH_2 β, δ et γ); 2,5-2,77 (96H, m, CH_2 Asp); 3,02 (96H, m, CH_2 ε); 3,81 (48H, m, CHα Asp); 4,11 (48H, m, CHα DGL)

DGL G2-Succ

Dans un monocol de 50 mL sont introduits le DGL **G2** (200 mg; 0,023 mmol) dissous dans 15 mL de DMF, ainsi que de l'anhydride succinique (167 mg; 1,67 mmol). Le pH du mélange est ajusté à 8 avec de la triéthylamine. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 1 nuit. Le milieu réactionnel est alors concentré sous vide puis filtré sur colonne de Sephadex® G 25 (éluant : bicarbonate d'ammonium 0,1 M).
RMN ^{1}H (D_2O, 300 MHz) δ = 1,15-1,54 (288H, m, CH_2 β, δ et γ); 2,22 (192H, m, CH_2 Succ); 2,93 (96H, m, CH_2 ε); 4,04 (48H, m, CHα)

Procédure générale de préparation de G2-Guana

Dans un ballon de 25 mL, sont introduits le DGL **G2** (100 mg; 0,012 mmol), le chlorure de 1*H*-pyrazole-1-carboxamidinium et du carbonate de sodium dans 2 mL d'eau. Le mélange est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 3 jours. Le milieu réactionnel est alors purifié par filtration sur colonne de Sephadex® G 25 (éluant : bicarbonate d'ammonium 0,1 M).

G2-Guana 100%

chlorure de 1*H*-pyrazole-1-carboxamidinium (82 mg; 0,56 mmol) et Na_2CO_3 (30 mg; 0,28 mmol).
RMN ^{1}H (D_2O, 300 MHz) δ = 1,23-1,58 (288H, m, CH_2 β, δ et γ); 2,98 (96H, m, $C\underline{H}_2$-NH-$C(NH_2^+)$=NH); 4,11 (48H, m, CHα)

G2-Guana 50%

chlorure de 1*H*-pyrazole-1-carboxamidinium (41 mg; 0,28 mmol) et Na_2CO_3 (48 mg; 0,45 mmol).
RMN ^{1}H (D_2O, 300 MHz) δ = 1,28-1,83 (288H, m, CH_2 β, δ et γ); 2,85 (48H, m, CH_2-NH_2); 3,03 (48H, m, $C\underline{H}_2$-NH-$C(NH_2^+)$=NH); 4,15 (48H, m, CHα)

G2-Guana 25%

chlorure de 1*H*-pyrazole-1-carboxamidinium (20,45 mg; 0,14 mmol) et Na_2CO_3 (24 mg; 0,23 mmol).

RMN ^1H (D_2O, 300 MHz) δ = 1,28-1,56 (288H, m, CH_2 β, δ et γ); 2,84 (72H, m, CH_2-NH_2); 3,01 (24H, m, C$\underline{H_2}$-NH-C(NH_2^+)=NH); 4,11 (48H, m, CHα)

G2-Guana 12,5%

chlorure de 1*H*-pyrazole-1-carboxamidinium (10,2 mg; 0,07 mmol) et Na_2CO_3 (12 mg; 0,11 mmol).

RMN ^1H (D_2O, 300 MHz) δ = RMN ^1H (D_2O, 300 MHz) δ = 1,29-1,63 (288H, m, CH_2 β, δ et γ); 2,94 (84H, m, CH_2-NH_2); 3,04 (12H, m, C$\underline{H_2}$-NH-C(NH_2^+)=NH); 4,15 (48H, m, CHα)

Procédure générale de greffage de sucres sur les DGL

Dans un ballon de 100 mL, sont introduits le DGL, ainsi que le sucre (2eq/amines du DGL), dans une solution de borate 0,4 M tamponnée à pH 9. Le complexe borane/pyridine (1,6 eq/sucre) est ensuite ajouté. Le mélange est chauffé à 50°C sous agitation pendant 7 jours. La pyridine est ensuite évaporée sous vide puis le résidu est dialysé. Le rétentat est lyophilisé donnant un solide blanc.

DGL G1-Rib

G1 (1,01g; 0,697 mmol), D(-)-ribose (1,88g; 12,54mmol) et BH_3/pyridine (2 mL; 20,06 mmol) dans 50 mL de solution tampon. Membrane de dialyse SpectraPor® cellulose ester MWCO 100 Da.

Masse de **G1-Rib** récupérée : 1,58 g

RMN ^{11}B (D_2O, 128 MHz) δ = -9,97; -12,88; -13,50; -13,75; -17,19; -18,11; -18,62

Analyse élémentaire: %B : 2,26; %C : 36,45; %H : 6,99; %N : 5,07.

DGL G1-Gal

G1 (1,01g, 0,696mmol), D(+)-galactose (2,22g; 12,32 mmol) et BH_3/pyridine (2 mL; 20,06 mmol) dans 50 mL de solution tampon. Membrane de dialyse SpectraPor® cellulose ester MWCO 100 Da.

Masse de **G1-Gal** récupérée : 2,42 g

RMN ^{11}B (D_2O, 128 MHz) δ = -9,78; -13,67; -14,8

Analyse élémentaire: %B : 2,75; %C : 34,11; %H : 6,87; %N : 3,64.

DGL G1-Lact

G1 (1,14g; 0,786 mmol), α-D-lactose monohydrate (5,12g; 14,21mmol) et BH_3/pyridine (2,3 mL; 22,74 mmol) dans 58 mL de solution tampon. Membrane de dialyse SpectraPor® cellulose ester MWCO 500 Da.

Masse de **G1-Lact** récupérée : 3,84 g

RMN ^{11}B (D_2O, 128 MHz) δ = -9,75; -13,6; -14,63

Analyse élémentaire: %B : 1,81; %C : 34,36; %H : 6,16; %N : 1,73.

Analyses par EC

- Electrolyte 1 : tampon Tris 125 mM / H_3PO_4 250 mM, pH 2

Préparation : 3,79 g (31,29 mmol) de Tris (ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol) ainsi que 7,3 g (62,57 mmol) d'H_3PO_4 84% sont introduits dans une fiole jaugée de 250 mL. La fiole est complétée avec de l'eau ultra-pure jusqu'au trait de jauge.

A cet électrolyte, est ajouté 0,5 g/L d'imidazole (5 mg pour 10 mL d'électrolyte) comme marqueur de position.

Conditions expérimentales :

Capillaire utilisé : silice vierge 33,5 cm (25 cm jusqu'au détecteur) x 50 µm d.i.

Tension appliquée : + 15 kV

Injection hydrodynamique : 50 mbar, 2 s

Détection UV : 200 nm

Température : 25°C.

Rinçage du capillaire entre les analyses :

5 min avec électrolyte 1

Dosage du fluor dans les DGL-Spar RMN ^{19}F

Environ 50 mg de chaque DGL-S sont dissous dans 1 mL d'une solution d'acide borique à 50 mM, préparée dans D_2O et placés dans un tube RMN. Une sonde contenant du trifluorotoluène en solution dans le CCl_4 est ajouté dans chaque tube RMN.

Les échantillons sont analysés par RMN ^{1}H et ^{19}F.

Conclusion générale

Conclusion générale

Les dendrimères greffés de L-lysine (DGL), appartenant à la classe des polymères dendritiques, sont des matériaux aux applications potentielles variées (agents antibactériens, antifongiques, …). Ces dendrimères greffés sont obtenus selon un procédé original mis au point au laboratoire basé, sur la polymérisation des *N*-carboxyanhydrides (NCA) de L-lysine. Le travail présenté dans ce mémoire s'inscrit dans le cadre général de la modification au cœur et à la surface des dendrimères greffés de L-lysine. La modification totale ou partielle des amines de surface permettra alors de moduler la charge globale des DGL afin, selon la transformation effectuée, d'améliorer leur capacité à traverser les membranes cellulaires, leur biodisponibilité, de diminuer leur toxicité ou de renforcer leur activité antibactérienne, etc… Par ailleurs, en tirant partie du mode particulier de synthèse des DGL, il est envisageable de coupler de façon sélective une seule molécule au DGL de première génération. En fonction de sa longueur, cette molécule sera confinée au cœur ou reléguée à la périphérie des DGL de générations supérieures. En outre, si elle possède une fonction admettant une réaction de ligation sélective avec une biomolécule, le bioconjugué résultant pourra intervenir dans des phénomènes de reconnaissance moléculaire. Par exemple, un anticorps pourra être immobilisé sur un DGL modifié, qui deviendra alors spécifique d'un récepteur ou d'un antigène particulier. Avant de réaliser de telles architectures, il nous faut avant tout maîtriser le processus de synthèse des DGL de 1ère génération en présence ou en l'absence d'amorceur, et valider la faisabilité de la modification de ceux-ci ainsi que des DGL de 2e génération au cœur, via l'utilisation d'un agent d'amorçage, et en surface.

C'est pourquoi, dans une première partie, nous avons détaillé le procédé de synthèse des DGL, en insistant sur la préparation de Lys(TFA)-NCA par nitrosation de C-Lys(TFA) et sur son devenir au cours de la polymérisation, lors de la synthèse de la première génération de DGL. Les analyses réalisées sur le surnageant obtenu en fin de réaction a conduit à l'identification de certains produits secondaires, présents à l'état de traces dans le produit, et à la proposition de mécanismes réactionnels expliquant leur formation. Grâce à ces éclaircissements, nous avons pu mieux appréhender la modification de la première génération de DGL par l'ajout d'un amorceur aminé dans le milieu de polymérisation, qui a été l'objet du deuxième chapitre.

Dans cette partie, nous avons initié la polymérisation de Lys(TFA)-NCA par plusieurs molécules contenant des amines primaires, avec plus ou moins de succès. Parmi les agents d'amorçage employés, deux fluorophores aminés ont été testés afin d'examiner la possibilité d'introduire une sonde fluorescente au cœur du DGL, autorisant ainsi le suivi de ces macromolécules en milieu biologique. De même, une biomolécule ayant une activité spécifique introduite au cœur du DGL pourrait être protégée, par cette voie, d'un environnement hostile.

La mise en parallèle de nos résultats avec ceux de Lahav *et al*., nous a permis d'identifier trois phases du mécanisme de polymérisation du NCA en milieu hétérogène, clarifiant ainsi la constance du $\overline{DP_n}$ des oligomères obtenus quel que soit l'amorceur utilisé. La polymérisation commence à l'interface $NCA_{(s)}$/eau (étape rapide), puis il y a une phase d'auto-assemblage des oligopeptides formés en feuillet β induisant la précipitation de ceux-ci et enfin la réaction se poursuit à l'interface feuillet β/eau (étape lente). Cela nous a conduit à faire évoluer le système vers un milieu de polymérisation hydro-organique eau/acétonitrile. Ce système, en l'absence d'amorceur, induit une augmentation du $\overline{DP_n}$ des oligomères en fonction du taux d'acétonitrile employé, mais aussi l'élargissement de la distribution des masses moléculaires. De même, nous avons noté que des oligomères de lysine ayant une terminaison amide deviennent prépondérants pour des taux d'acétonitrile élevés. La démixtion du mélange eau/acétonitrile, due à la présence d'hydrogénocarbonate de sodium et à la basse température utilisée, intervenant à partir d'un certain taux d'acétonitrile, est un paramètre dont l'importance a été démontrée par l'utilisation d'un amorceur fluorescent.

Dans le chapitre suivant, nous nous sommes attachés à décrire la synthèse d'un conjugué constitué d'un bras espaceur de type polyéthylène glycol de longueur définie portant une fonction amine, permettant son utilisation comme agent d'amorçage de la polymérisation de Lys(TFA)-NCA, et une fonction autorisant une ligation oxime, point d'ancrage pour l'introduction d'une biomolécule. La synthèse du bras espaceur, réalisée en 9 étapes avec un rendement global de 19%, a permis de préparer des DGL de 1ère et 2e génération fonctionnalisés par ce dernier. La faisabilité et la sélectivité de la ligation oxime, à une concentration (100µM) compatible avec des applications biologiques, a aussi été démontrée par le couplage de la vanilline, choisie comme molécule modèle, avec les deux générations de DGL synthétisées.

Enfin, dans le dernier chapitre, nous avons présenté des exemples de modifications des amines de surface des DGL, ces transformations permettant d'apporter les nouvelles

propriétés énoncées plus haut, et d'envisager d'autres applications pour ces macromolécules comme la vectorisation du bore. En modifiant la surface des DGL par des substrats de type guanidine, acide succinique, acide aspartique, et des sucres (ribose, galactose, lactose), nous avons prouvé que ces nano-objets sont très simplement modulables à façon. Toutefois, bien que les réactions mises en jeu soient aisées, la caractérisation de ce type de composés est relativement difficile, notamment en raison de leur polydispersité.

Le travail développé tout au long de ce mémoire a permis d'approfondir les connaissances du processus de polymérisation de Lys(TFA)-NCA en milieu hétérogène avec et sans amorceur, et d'exposer quelques modes de modification des DGL, l'originalité de ce travail se situant surtout au niveau de l'introduction d'un bras espaceur au sein du DGL via la polymérisation. Maintenant, dans l'optique d'une production de DGL à plus grande échelle, il semble nécessaire de comparer les caractéristiques de DGL obtenus à partir de NCA de Lys(TFA) préparés par notre procédé original (*i.e* la nitrosation) et de DGL synthétisés à partir de NCA obtenus par la méthode classique au phosgène. L'évolution du système vers un milieu de polymérisation hydro-organique avec un NCA pur est sans doute un axe de recherche intéressant qui permettrait de moduler le $\overline{DP_n}$ des DGL. D'un point de vue modification des DGL au cœur, des améliorations sont à apporter pour optimiser le système de ligation (type et longueur du bras espaceur, type de ligation, conditions réactionnelles) afin de s'orienter vers la création de conjugués contenant une biomolécule. Du reste, il vient que la recherche d'outils analytiques performants à même de caractériser les DGL est primordiale pour assurer la valorisation de ces matériaux prometteurs.

Annexes

Annexe I : Principe électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique analytique couramment utilisée pour la séparation de biomolécules, et notamment de peptides[2]. La technique de l'électrophorèse capillaire recouvre de nombreuses variantes. Nous nous sommes intéressés exclusivement à l'électrophorèse capillaire de zone. Un capillaire de silice vierge, d'un diamètre interne de l'ordre de 10 à 100 µm est rempli par un électrolyte garantissant la conductivité électrique. Chaque extrémité du capillaire plonge dans le même électrolyte. L'application d'une forte tension (de l'ordre de 10 kV par exemple) permet la mise en mouvement des analytes, introduits à l'entrée du capillaire sous l'effet d'un champ électrique ou d'une pression externe. La différence de migration des analytes permet leur séparation. Ces derniers sont détectés lors de leur passage devant la fenêtre de détection située vers l'extrémité sortie du capillaire (Figure 33). Différentes méthodes de détection sont possibles. Le plus souvent, une détection par absorbance UV est utilisée.

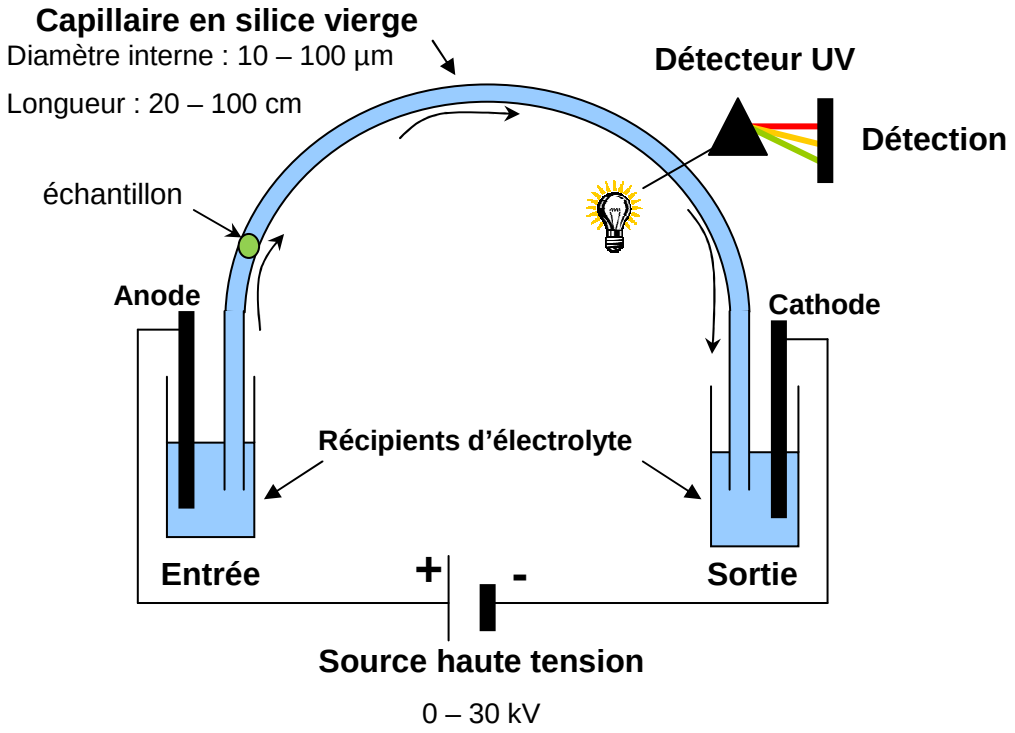


Figure 33 : Schéma de principe de l'électrophorèse capillaire

[2] Mc Laughlin, G. M.; Anderson, K. W. *High performance capillary electrophoresis : theory, techniques, and applications*: New York, **1998**.

La vitesse électrophorétique apparente v_{app} d'un soluté est calculable expérimentalement par le rapport de la distance parcourue l_{eff} (longueur efficace du capillaire) divisé par le temps de migration t_m :

$$v_{app} = \frac{l_{eff}}{t_m}$$

Par conséquent, la mobilité apparente μ_{app} de ce soluté est donnée par la relation :

$$\mu_{app} = \frac{v_{app}}{E} = \frac{l_{eff} L}{t_m V}$$

où E est champ électrique, L la longueur totale du capillaire et V la tension appliquée.

Un marqueur de flux électroosmotique (molécule neutre) permet de calculer la mobilité électroosmotique μ_{eo} par la relation suivante :

$$\mu_{eo} = \frac{l_{eff} L}{t_{eo} V}$$

où t_{eo} est le temps de migration de la molécule neutre.

La mobilité électrophorétique effective du soluté μ_e est alors par la relation suivante :

$$\mu_e = \frac{l_{eff} L}{V} \times \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{eo}} \right)$$

Annexe II: Publication soumise à Tetrahedron Letters

Synthesis and ligation ability of mono-aminooxy-functionalized dendrigraft poly-L-lysine (DGL)

Andrea Molero Bondia[a], Nicolas Larcher[a], Laurent Garrelly[b], Jean Christophe Rossi[a], Robert Pascal[a,*]

[a] *IBMM, UMR 5247, CNRS – Universtités Montpellier 1 & Montpellier 2, Université de Montpellier 2, CC1706, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France*

[b] *Colcom, Cap Alpha, Avenue de l'Europe, Clapiers, 34940 Montpellier Cedex 9, France*

Abstract— A bifunctional tetraethylene glycol (TEG) linker was prepared and used as an initiator for the synthesis of the first two generations of dendrigraft poly-L-lysines (DGL). The key steps involved the desymmetrization of TEG by introduction of an amine group after activation of a terminal hydroxyl group and of conveniently protected aminooxy functionality at the other end. Initiation of L-lysine *N*-carboxyanhydride polymerization by the terminal amine yielded generations 1 and 2 of DGL in which a subsequent functionalization of the aminooxy group by ligation with entities bearing an aldehyde group turned out to be feasible.

Keywords: Dendrimers · Dendrigraft polymers . Oxime ligation · Conjugates

* Corresponding author. Tel.: +33-467-14-4229; fax: +33-467-63-1046; e-mail: rpascal@univ-montp2.fr.

Arborescent polymers form a special class of macromolecules with a hyperbranched architecture that is derived from a multi-stage synthetic protocol.[1] Among this particular class of polymers, dendrimers have a symmetrically organized and, in principle, perfectly controlled structure, monodispersed size, and chain end functionality control.[2] However, the purity of reagents and the difficulty in achieving high yields in their stepwise synthesis usually generates numerous structural defects. Although not ideally perfect, other families, such as hyperbranched polymers (non-symmetrical and polydisperse structures) and dendrigrafts (structure intermediate between dendrimers and hyperbranched polymers) usually present similar properties while being much easily accessible to synthesis.[3] Dendrigrafts, the most recently introduced family, are prepared by employing reactive oligomers or polymers through repeated protection/deprotection steps.[3] The possibility of obtaining a high molecular weight and functionalized dendrigraft at very low generation numbers combined with the use of relatively inexpensive monomers offers the potential to synthesize and develop dendrigraft polymers possessing dendrimer-like properties at a much lower cost and at a multigram scale.[4] Recently, our group reported a new synthetic route to dendrigraft lysine polymers (DGLs).[5] These few nanometer-sized objects[6] were synthesized by an original process based on the polycondensation of N^{ε}-trifluoroacetyl-L-lysine-*N*-carboxyanhydride (Lys(Tfa)-NCA) in buffered water at pH values close to neutrality. According to this process, the spontaneous precipitation of the growing protected polymer allows the control of the molecular weight. As a matter of fact, oligo-L-lysine prepared as a first generation of these materials (**G1**) served as a backbone for subsequent polymerization of Lys(Tfa)-NCA, permitting the preparation of higher generations (**G2** to **G5**) through an easy work-up (Fig. 1).[5]

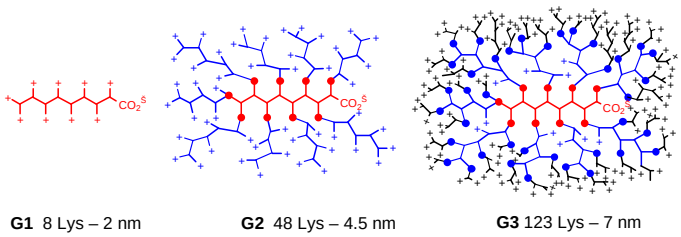
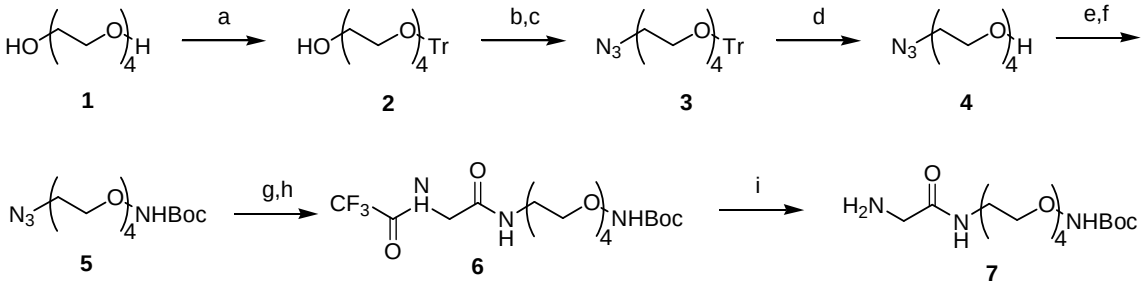


Figure 1. Schematic structure of DGL generations **G1**, **G2** and **G3**.

These molecular materials display a higher branching ratio compared to hyperbranched lysine polymers prepared through other procedure,[7] which gives them a behaviour very similar to ideal lysine dendrimers as for example the properties associated with their polycationic structure electrostatically interacting with cell membranes. Indeed, partial guanidinylation of the surface amino groups enhanced the ability of the second generation DGL G2 to cross model liposomal and cellular membranes.[8] These properties

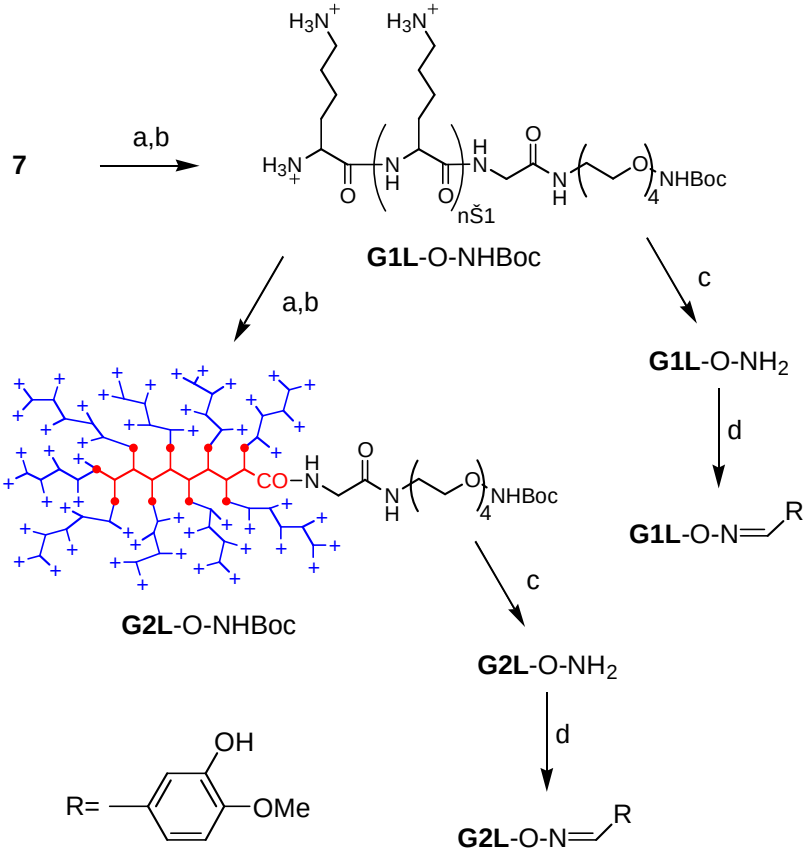
combined with their biodegradability and biocompatibility validate that DGLs are promising for many biological applications[9] either in their naked form or after overall or partial derivation (possibly by functionalization of the core or the surface). From this point of view, taking advantage the synthetic protocol to introduce a fixed number of functional groups on these objects is strongly appealing. With this aim, we conceived structures based on a DGL architecture involving a linking arm bearing a free amine group introduced as a potential initiator of DGL **G1** synthesis. Here we report the synthesis of a bifunctional tetraethylene glycol (TEG) linker to check the validity of this strategy using a masked aminooxy group, subsequently available to undergo a selective ligation giving an oxime bond[10] without competing interactions of the numerous free amines present in DGLs at low concentration. This group is in principle compatible with the conditions of DGL synthesis and its further ability to undergo a subsequent derivation by selective oxime formation may be used in ligation with a wide range of biochemical targets including antibodies.

The linker was synthesized starting from TEG **1** as shown in Scheme 1. The desymmetrization of diol **1** (introduced in large excess) was performed with TrCl (Tr = trityl) and pyridine.[11] The reaction afforded selectively the monoprotected compound **2**, which, upon the introduction of this bulky group, becomes more hydrophobic facilitating the recovery of the product by a simple extraction procedure. The protected TEG **2** was converted into azide **4** using a procedure adapted from Tahtaoui *et al.*[12] by mesylation of the free hydroxyl group with MsCl and Et_3N and then reaction with NaN_3 in acetonitrile. The azide **3** used as a masked amine precursor was functionalized at the other extremity of TEG after removal of trityl group protecting group. The alcohol **4** was activated by MsCl and the intermediate was reacted with Boc-NHOH and DBU[13] to afford the compound **5**,[14] which bears the desired protected aminooxy functionality. The Boc protective group was selected because of its resistance to the conditions of polymerization of Lys(Tfa)-NCA and deprotection of the Tfa group. Last, the amine termination was formed by reduction of the corresponding azide into amine in good yields, according to Staudinger's procedure.



Scheme 1. Reagents and conditions: a) TrCl, pyridine, 45˚C, overnight, quantitative; b) MsCl, Et_3N, CH_2Cl_2, over night, 73%; c) NaN_3, CH_3CN, 95˚C, 48h, 76%; d) PTSA, MeOH, 87%; e) MsCl, Et_3N, CH_2Cl_2, over night, 88%; f) BocNHOH, DBU, 63%; g) PPh_3, CH_2Cl_2/H_2O, 60˚C, quantitative; h) Tfa-Gly, EDC, 66%; i) NH_3 in $MeOH/H_2O$, 40˚C, quantitative.

Before initiating the polymerization of Lys-NCA at pH 6.5, we introduced a *N*-terminal glycine residue by conventional peptide coupling of Tfa-Gly with *N*-ethyl-*N'*-(dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC). This modification was intended to improve the initiation rate in the pH 6.5 buffered polymerization mixture since the *N*-terminal glycine **6** [15] (p*K* 7.5–8) is likely to act as a better initiator than the original amino group (p*K* 9–10). The last step of this procedure was the mild removal of Tfa-protecting group by reaction with a mixture of NH_3 in MeOH/H_2O that led to compound **7**.[16] This molecule bears at one extremity the amine function which can initiate the polymerization of Lys(Tfa)-NCA to synthesize DGLs. Whereas, the other extremity bears a protected aminooxy substituent, able to react with aldehyde groups for a selective coupling to carrier proteins or antibodies.



Scheme 2. Formation of aminooxy-functionalyzed poly-lysine **G1L**-O-NH_2 and **G2L**-O-NH_2 and subsequent ligation with a model aldehyde RCHO (vanillin). Reagents and conditions: a) Lys(Tfa)-NCA, pH6.5; b) NH_3 in H_2O/MeOH (4:1), c) TFA; d) vanillin 0.1mM, pH 2 (TFA 0.1% v/v in water).

Lys(Tfa)-NCA was prepared as previously described,[5] from N^{α}-carbamoyl-N^{ε}-trifluoroacetyl lysine C-Lys(Tfa)[17] and its polycondensation was performed without isolating the NCA intermediate in aqueous media at pH 6.5 and 0°C leading to linear oligo-Lys(Tfa) **8** as a solid precipitate, which was characterized by MALDI-TOF mass spectrometry and ^{1}H NMR.[18] Tfa-protecting groups were removed by treatment with a solution of NH_3 in MeOH/H_2O affording the crude product in 40% overall yield from C-Lys(Tfa) with a structure consistent with the

functionalized linear peptide **G1L**-O-NHBoc by capillary electrophoresis (CE) analysis,[19] which was compared to that of the peptide **G1** previously prepared in the absence of initiator.[5] The second generation of functionalized dendrigraft poly-L-lysines (DGL) was synthesized using **G1L**-O-NHBoc as a macro-initiator of Lys(Tfa)-NCA polymerization according to the work-up described earlier.[5] After removal of Tfa protecting groups, the new dendritic material **G2L**-O-NHBoc was shown by CE[19] to exhibit a pattern different from that of the non-functionalized material **G2**.[5] A proof of principle of the ability of the synthesized materials **G1L**-O-NH_2 and **G2L**-O-NH_2 to undergo a ligation with compounds bearing an aldehyde group was obtained by studying their reaction with vanillin which presents a characteristic UV spectrum with a maximum of absorption at 300 nm. To this aim, the Boc-protecting groups of **G1L**-O-NHBoc and **G2L**-O-NHBoc were removed by treatment with trifluoroacetic acid (TFA) and 100 μM aqueous solutions of the resulting materials **G1L**-O-NH_2 and **G2L**-O-NH_2 acidified to pH~2 with TFA (0.1% v/v) were incubated at room temperature with 100 μM vanillin using a procedure similar to that generally used for biomolecules.[20] The RP HPLC analysis[21] of the reaction medium at 48 h indicated a decrease in free vanillin (48% and 26% for **G1L**-O-NH_2 and **G2L**-O-NH_2, respectively) coupled with the formation of products with an absorption at 300 nm, characteristic of a vanillin derivative, and at a retention time consistent with those observed for the non-functionalized materials **G1** and **G2** (Fig. 2)**.** The additional LC/MS(ESI) analysis of **G1L**-O-NH_2 reaction solutions using conditions similar to those of the HPLC analysis of Fig. 2 confirmed the attribution of HPLC peaks to the oxyamine-derivatized dendrigraft (n = 2–6; e.g. *m/z* 453.84, *z* = 2, n=5) and the presence oxime adducts (n = 2–6; e.g. *m/z* 456.81, *z* = 2, n = 4; 520.84, *z* = 2, n = 5) in the absence or presence of vanillin, respectively. The specificity of the oxyamine function of **G1L**-O-NH_2 and **G2L**-O-NH_2 (with respect to the numerous free amino groups) in reacting with the aldehyde group of vanillin was demonstrated by the absence of ligated products starting from **G1** and **G2** species (Fig. 2). The results of these experiments indicate (*i*) that native DGLs **G1** and **G2** do not lead to the formation of a ligated product by reaction of amines on an aldehyde and (*ii*) that the ligation between DGLs bearing an aminooxy-functionalized PEG arm is effective at the sub-millimolar concentrations required for the reactions of functionalized biomacromolecules.

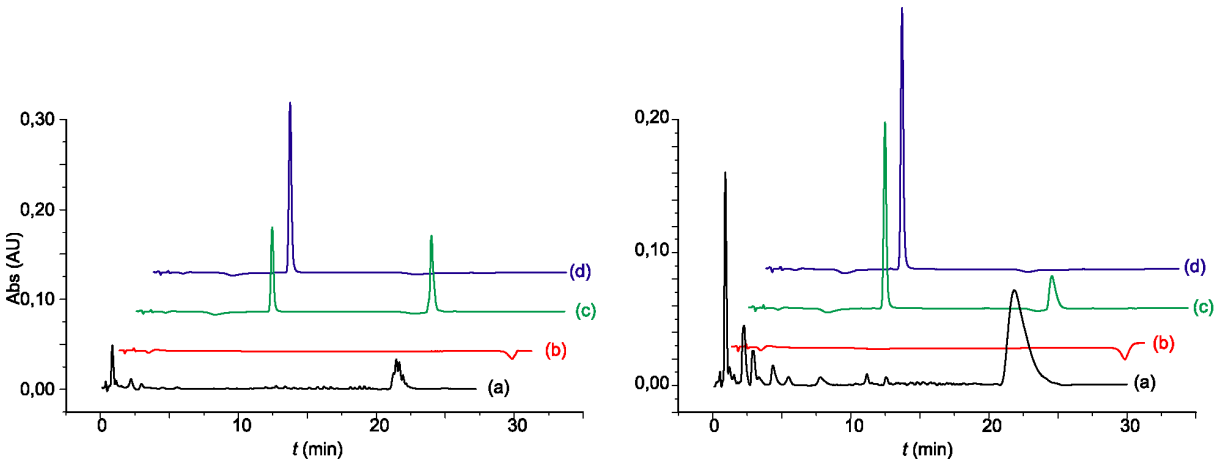


Figure 2. RP HPLC monitoring[21] of the ligation of vanillin onto aminooxy-functionalized poly-lysines **G1L**-O-NH_2 (left panel) and **G2L**-O-NH_2 (right panel). (a) 0.1 mM **GxL**-O-NH_2 (**x** = **1** or **2**) in water at pH 2 (UV detection 210 nm); (b) 0.1 mM of **GxL**-O-NH_2 in water at pH 2 (UV detection 300 nm); (c) 48 h reaction of 0.1 mM of **GxL**-O-NH_2 and 0.1 mM of vanillin in water at pH 2 and r.t. (UV detection 300 nm); (d) 48 h reaction of 0.1 mM of the corresponding native **Gx** (**x** = **1**, left panel or **2**, right panel) and 0.1 mM of vanillin in water at pH 2 and r.t. (UV detection 300 nm).

In summary, we have reported the synthesis of a Boc-aminooxy-TEG-amine in 9 steps. We also demonstrated that this compound is suitable to initiate the oligomerization of Lys(Tfa)-NCA and allows the formation of structures bearing a single aminooxy group subsequently useful for selective ligations with aldehydes. In spite of the number of lysine amino groups on the surface of DGL, no interference compromizing the ligation selectivity was observed at low concentrations, as needed for the synthesis of bioconjugates.

Acknowledgments

The authors thank the Agence Nationale de la Recherche for support to the Dendrimat project through the Functional Materials and Innovative Processes (MatetPro) Program.

References and notes

1. Teerstra S. J.; Gauthier M. *Prog Polym. Sci*. **2004**, 29, 277-327.
2. Vögtle, F.; Richart, G.; Werner, N. *Dendrimer Chemistry*; Roe, P., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2009.
3. Fréchet, J. M. J.; Ihre, H.; Davey, M.; Ch. 24 In *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*; Frechet, J. M. J., Tomalia, D. A. Eds.; Wiley Series in Polymer Science; John Wiley and Sons: West Sussex, U.K., 2001.
4. Kee, R. A.; Gauthier, M.; Tomalia, D. A. In *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*; Frechet, J. M. J.; Tomalia, D. A., Eds.; Wiley Series in Polymer Science; John Wiley and Sons: West Sussex, U.K., 2001.
5. Collet, H.; Souaid, E.; Cottet, H.; Deratani, A.; Boiteau, L.; Dessalces, G.; Rossi, J.-C.; Commeyras, A.; Pascal R. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 2309-2316.

6. Cottet, H.; Martin, M.; Papillaud, A.; Souaid, E.; Collet, H.; Commeyras, A. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3235-3243.

7. Klok, H.-A.; Rodriguez-Hernandez, J. *Macromolecules* **2002**, *35*, 8718-8723; Rodriguez-Hernandez, J.; Gatti, M.; Klok, H.-A. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 249-258.

8. Tsogas, I.; Theodossiou, T.; Sideratou, Z.; Paleos, C. M.; Collet, H.; Rossi, J. C.; Romestand, B.; Commeyras, A. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3263-3270.

9. Romestand, B.; Rolland, J.L.; Commeyras, A.; Coussot, G.; Desvignes, I.; Pascal, R.; Vandenabeele-Trambouze O. *Biomacromolecules* **2010**, submitted.

10. Rose, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30-33; For a recent review on ligation methods see: Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998.

11. Menger F. M.; Lu H.; Lundberg D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007,** 129, 272-273.

12. Tahtaoui, C.; Parrot, I.; Klotz, P.; Guillier, F.; Galzi, J. L.; Hibert, M.; Ilien, B. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4300-4315.

13. Albrecht, S., Defoin, A., Tarnus, C. *Synthesis* **2006**, 1635-1638.

14. Experimental procedure for the synthesis of compound **5**: to a cold solution (0ºC) of **4** (1 g, 4.56 mmol) and triethylamine (0.76mL, 5.47 mmol, 1.2 eq) in CH_2Cl_2 (6.2 mL), was added MsCl (0.39 mL, 5.02 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was stirred at 0ºC for 2 hours and r.t. overnight, then filtered and the filtrate solution was concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (EtOAc/hexane, 90/10) to give a colourless liquid (1.19 g, 88%). A fraction of this compound (340 mg, 1.14 mmol) was reacted in THF (0.6 mL) with BocNHOH (213 mg, 1.60 mmol, 1.4eq) and DBU (0.26 mL, 1.72 mmol, 1.5 eq) according to the procedure of Ref. 13. CH_2Cl_2 (10 mL) was added and the organic layer was washed with 2M NH_4Cl (4 × 5 mL) and brine (2 × 5 mL), dried (Na_2SO_4) and concentrated. The product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/petroleum ether, 1/3) to give compound **5** as a brown oil (241 mg, 63%). 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 1.41 (s, 9H, C*H*$_3$); 3.32 (t, *J* = 5.03 Hz, 2H, C*H*$_2$); 3.60-3.73 (m, 12H, C*H*$_2$O); 3.98 (t, 2H, C*H*2); 7.8 (1H, s, N*H*). ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 28.15 (*C*H_3); 50.59 (*C*H_2N_3); 69.15; 69.96; 70.48; 70.54; 70.6; 81.27 (C); 156.7 (*C*=O). HRMS (ESI+): calcd.: $C_{13}H_{27}N_4O_6$ = 335.1931; found: 335.1925.

15. Experimental procedure for the synthesis of compound **6**: PPh_3 (345 mg, 1.32 mmol, 2eq) was added to azide **5** (220 mg, 0.658 mmol) in THF/H_2O (8:2, 6.30 mL) and stirred at 60ºC for 24 hours. Then, the mixture was concentrated under vacuum and EtOAc (10 mL) was added to the residue. The organic layer was extracted with 10% $KHSO_4$ (3 x 2 mL). The mixed aqueous layers were brought to pH 9 with Na_2CO_3 and the resulting solution was freeze-dried. The solid residue was treated with EtOAc, salts were removed by filtration and the filtrate was concentrated under vacuum. The oily residue containing a free amino group (230 mg, 0.746 mmol) was acylated using Tfa-Gly (152 mg, 0.895 mmol, 1.2 eq) in the presence of EDC (243 mg, 1.26 mmol, 1.7 eq) in THF (5.7 mL). The reaction mixture was stirred at r.t. for 3 days. Then, THF was removed under vacuum, CH_2Cl_2 (20 mL) was added and the organic layer was washed with 10% $KHSO_4$ (2 x 20 mL), brine (10 mL) and dried (Na_2SO_4). The residue was purified by silica gel chromatography (CH_2Cl_2/MeOH, 98:2 to 90:10, v/v) to give the product

6 as a yellow oil (227 mg, 66%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 1.40 (s, 9H, C*H*$_3$), 3.41 (t, 2H, C*H*$_2$), 3.50-3.72 (m, 12H, C*H*$_2$O), 3.90 (m, 4H, C*H*$_2$ONH + NHC*H*$_2$CO), 7.21 (s, 1H, N*H*), 7.62 (s, 1H, N*H*), 8.01 (s, 1H, N*H*). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 28.19 (*C*H$_3$); 39.56 (CH$_2$*C*H$_2$NH); 42.45 (*C*H$_2$NH); 68.98 (*C*H$_2$ONH); 69.50; 69.80; 70.10; 70.17; 70.32; 70.36; 75.20; 81.75 (*C*); 115.74 (q, *C*F$_3$); 157.11 (O-NH-*C*=O); 157.45 (q, CF$_3$*C*=O); 167.07 (CH$_2$*C*=O). HRMS (ESI+): calcd.: $C_{17}H_{31}F_3N_3O_8$ = 462.2063; found: 462.2069.

16. Experimental procedure for the synthesis of compound **7**: the Tfa-protected linker **6** (200 mg, 0.43 mmol) was stirred at 40ºC overnight in presence of 5 mL of solution of 28%NH_3/H_2O/MeOH (7:14:4). NH_3 and MeOH were removed under vacuum and the resulting aqueous solution was freeze dried. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 1.38 (s, 9H, C*H*$_3$); 3.38 (t, 2H, C*H*$_2$); 3.49-3.69 (m, 14H, C*H*$_2$O + NHC*H*$_2$CO); 3.92 (m, 2H, C*H*$_2$); 6.07 (s, 2H, N*H*$_2$); 8.16 (s, 1H, N*H*-CO); 8.45 (s, 1H, N*H*). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 28.04 (*C*H$_3$); 39.09 (*C*H$_2$NH); 41.25 (*C*H$_2$NH$_2$); 68.27 (*C*H$_2$ONH); 69.69; 69.81; 69.92; 70.21; 70.34; 75; 81.56 (*C*); 157.96 (O*C*=O); 167.75 (CH$_2$*C*=O). HRMS (ESI+): calcd.: $C_{15}H_{32}N_3O_7$ = 366.2240; found: 366.2238.

17. Taillades, J.; Boiteau, L.; Beuzelin, I.; Lagrille, O.; Biron, J.-P.; Vayaboury, W.; Vandenabeele-Trambouze O.; Giani, O.; Commeyras, A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, 1247-1254.

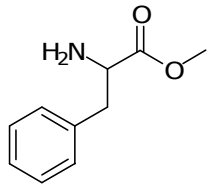
18. MALDI-TOF MS (CHCA matrix): m/z = 1060.4, 1284.5, 1508.6, 1732.6, 1956.7, 2180.6, 2409.6; H-[Lys(Tfa)]$_n$-Gly-(CH$_2$-CH$_2$-O)$_4$-NHBoc Na^+ (n = 3 to 9). **G1L-ONH-Boc:** NMR ^{1}H (D_2O, 300 MHz) δ = 1,2-1.8 (30H, m,CH$_2$ α,β,γ) ; 1.36 (9H, s, CH$_3$ Boc) ; 2,89 (10H , m, CH2 $_\delta$) ; 3,32 (2H, m, <u>CH$_2$</u>-NH) ; 3,60 (12 H, m, CH$_2$) ; 3,81 (2H , m, CH$_2$ Gly) ; 3,91 (2H, m, <u>CH$_2$</u>-O-NH-) ; 4,19 (5H, m, CH α).

19. CE analyses: fused silica capillaries of dimensions 50 μm i.d. × 58.5 cm length (50 cm to detector window). Prior to use, new capillaries were conditioned by washing with 1M NaOH (930 mbar for 30 min), 0.1M NaOH (930 mbar for 20 min), then background electrolyte (930 mbar for 10 min). The background electrolyte was aqueous phosphate buffer (H_3PO_4 125 mM + NaH_2PO_4 125 mM, pH 2.5). DGL samples were made of 5 g L^{-1} solutions of polymer in background electrolyte, then hydrodynamically injected by application of a positive pressure 18 mbar for 9 sec. Separations were carried out at 25°C by applying a constant voltage of +20 kV with UV detection at λ = 200 and 214 nm. RT G1: 4.3 to 4.8 min., RT **G1L**-O-NH-Boc : 5.3 to 5.8 min. RT G2 : 8-10 min and RT **G2L**-O-NH-Boc: 15-18 min.

20. Dirksen, A.; Dawson, P.E. *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 2543-2548.

21. Hypersil BDS C18 (50 × 2.1mm, 3 μm); flow 0.2 mL min^{-1}; eluent A: water TFA 0.1% v/v; B: CH_3CN TFA 0.1% v/v; 100% to 0% A in 40 min.

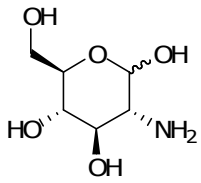
Annexe III : Amorceurs utilisés dans le chapitre II



Phe-OMe (**AM1**)

pKa = **7,4**

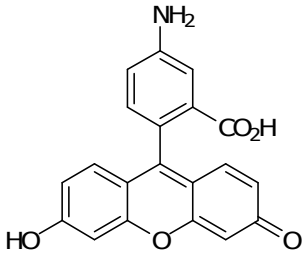
Solubilité aqueuse = **4,62 g/L**



Glucosamine (**AM2**)

pKa amine = **7,8**

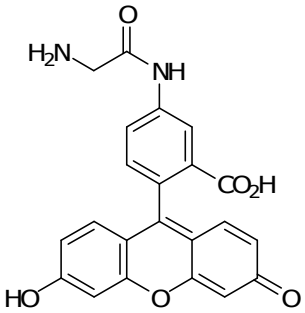
Solubilité aqueuse = **270 g/L**



Fluorescéinamine (**AM3**)

pKa amine = **3,3**

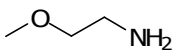
Solubilité aqueuse = **0,032 g/L**



5-(aminoacétamido)fluorescéine (**AM4**)

pKa amine = **7,9**

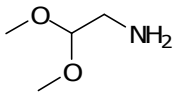
Solubilité aqueuse = **0,054 g/L**



2-méthoxyéthylamine (**AM5**)

pKa = **9,2**

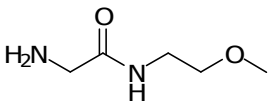
Solubilité aqueuse = **50 g/L**



2,2-diméthoxyéthylamine (**AM6**)

pKa = **8**

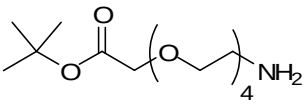
Solubilité aqueuse = **80 g/L**



2-amino-*N*-(2-méthoxyéthyl)acétamide (**AM7**)

pKa = **8,2**

Solubilité aqueuse = **150 g/L**



14-amino-3,6,9,12-tétraoxatétradécan-1-oate de tert-butyle (**AM8**)

pKa = **9,6**

Solubilité aqueuse = **72,6 g/L**

RESUME

Les dendrimères greffés de L-lysine (DGL) sont des matériaux aux applications potentielles variées (agents antibactériens, antifongiques, …). Ces dendrimères greffés sont obtenus selon un procédé original mis au point au laboratoire, basé sur la polymérisation des *N*-carboxyanhydrides (NCA) de L-lysine. Le travail effectué au cours de cette thèse a pour objectif d'explorer les différents modes de modification des DGL et d'en évaluer la faisabilité.
Pour ce faire, dans une première partie, nous avons détaillé le processus de synthèse et de polymérisation en milieu hétérogène des NCA. Cela nous a permis, ensuite, en modulant la nature de l'agent d'amorçage de la polymérisation des NCA, d'examiner la possibilité d'introduire de nouvelles fonctionnalités (fluorophore, bras de liaison adapté à la ligation) sur la première génération de DGL. Cela a nécessité, en amont, la synthèse d'un bras espaceur hétérobifonctionnel de type polyéthylène glycol. Par la suite, une ligation de type oxime entre les nouveaux DGL de 1ère et de 2e génération et une molécule modèle a été réalisée afin de valider cette approche. Enfin, nous avons pu démontrer que ces dendrimères greffés pouvaient être fonctionnalisés en surface par divers substrats (sucre, guanidine, acide aspartique, acide succinique) leur conférant de nouvelles propriétés et ouvrant ainsi un vaste champ d'application pour ces macromolécules.

TITLE: Research for specific methods of fonctionalization of L-lysine dendrigraft (DGL)

ABSTRACT

L-lysine Dendrigraft (DGL) are materials with various potential applications (antibacterial, antifungal, ...). These dendrigrafts are obtained by an original process, developed in our laboratory, based on the polymerization of *N*-carboxyanhydrides (NCA) of L-lysine. The work carried out during this thesis was aimed at exploring different methods of modification of DGL and assessing their feasibility.
In the first part, we detailed the process of synthesis and polymerization of NCAs in an heterogeneous medium. This allowed us then by modulating the initiator of NCA polymerization to introduce new features (fluorophore, spacer adapted to the ligation) on the first generation of DGL. This required, upstream, the synthesis of a heterobifunctional polyethylene glycol type spacer. Subsequently, an oxime ligation between the new 1st and 2nd generation of DGL and an aldehyde model has been conducted to validate this approach. Finally, we demonstrated that these dendrigrafts could be functionalized on the surface by various substrates (sugar, guanidine, aspartic acid, succinic acid) giving them new properties and opening up a wide scope of applications for these macromolecules.

DISCIPLINE : Chimie organique, minérale et industrielle

MOTS-CLES

***N*-carboxyanhydride, dendrimères greffés, L-lysine, ligation oxime, polymérisation**

2010, Nicolas LARCHER

Institut des Biomolécules Max Mousseron, Equipe Dynamique des Systèmes Biomoléculaires Complexes, UMR 5247, Université Montpellier II