



UNIVERSITÉ EVRY VAL D'ESSONNE

Science et Ingénierie

LAMBE – Matériaux Polymères aux Interfaces

NNT : 2011EVRY0002

THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

Spécialité : Chimie et physicochimie des polymères

présentée par

Zahra ESKANDANI

Canaux symétriques à base de cyclodextrines amphiphiles : polymérisation divergente d'oxirane

Soutenue publiquement le 24 Janvier 2011

COMPOSITION DU JURY

Président :	M. AUVRAY L.	Directeur de recherche, Université Paris Diderot
Rapporteur :	M. SIX J.L	Maître de conférence, Nancy-Université
Rapporteur :	M. TILLOY S.	Professeur, Université d'Artois
Examineur :	M. GUEGAN P.	Professeur, Université d'Evry
Examineur :	Mme HUIN C.	Maître de conférence, Université d'Evry

Remerciements

Ce travail a été réalisé à l'Université d'Evry Val d'Essonne au sein de l'équipe MPI du laboratoire Lambe, dirigée par Mme Jeanine Tortajada, à qui j'exprime ma reconnaissance.

Je remercie tout naturellement Philippe Guégan, instigateur de ce projet de recherche, pour la confiance qu'il m'a accordée et qui par ses conseils ont permis de mener à bien ce travail. Je tiens également à remercier ma co-directrice de thèse et collègue de bureau, Cécile Huin, pour ses conseils notamment en électrophysiologie.

Je remercie les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail. Je remercie M. Loïc Auvray d'avoir accepté d'être le président de jury. Je le remercie également pour ses conseils scientifiques et pour ses qualités humaines. Je remercie M. Sébastien Tilloy et M. Jean-Luc Six qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de mon travail.

J'aimerais ensuite remercier Véronique Celton pour toute la caractérisation par RMN DOSY, sans qui cette partie n'aurait pas existé. Je tiens également à remercier mes collègues : M. Hervé Chéradame, Christine Guis, Nathalie Jarroux, Yassine El Ghoul, et tous les thésards du laboratoire (François, Benjamin, Emilie, Lisday, Bazoly, Céline, Elodie et Ruddy). Je tiens particulièrement à remercier mon collègue co-thésard, Pierre-Jean Roumanet, avec qui nous avons partagé de nombreuses anecdotes au sein du laboratoire. Enfin je n'oublie pas toutes les personnes que j'ai eu le plaisir de côtoyer au cours de ces années : Fabrice, Nezha (merci pour les conseils précieux durant les premiers mois de la thèse), Ghani, Jocelyne, Basile, Firat, Solo, Aurica, Marion, Mathieu, Renaud et j'ai une pensée émue pour Gabriel Gibrat. Je n'oublie pas Olek, notre spécialiste RMN.

Je tiens également à remercier Jérôme Mathé pour avoir répondu à mes nombreuses questions en électrophysiologie et pour avoir relu ce dernier chapitre de thèse. Je tiens plus largement à remercier l'équipe des physiciens : Juan Pelta (merci pour ton écoute et ton soutien), Linda Payet et Laurent Bacri pour leur disponibilité.

Je voudrais également remercier B. Desmazières, J-Y Salpin, W. Buchmann, V. Haldys pour m'avoir montré le fonctionnement de l'électrospray et avoir répondu à mes questions concernant cette technique. Je tiens également à remercier Emmanuelle Léon et Annie Le Gorande pour les conseils apportés concernant les enseignements.

Enfin je tiens à dédier cette thèse à mes amis proches et ma famille qui ont toujours cru en moi. Je les remercie pour leur soutien si précieux.

Table des matières

Table des matières.....	1
Liste des abbréviations.....	4
Introduction générale	5
Chapitre I : Etude bibliographique	9
I.1. Les canaux ioniques transmembranaires.....	11
I.1.1. Introduction	11
I.1.2. Conception de canaux artificiels	12
I.1.3. Canaux artificiels unimoléculaires et barrel-hoop bimoléculaires	15
I.1.4. Canaux artificiels à base de cyclodextrines	23
I.1.5. Techniques de caractérisation des pores et canaux membranaires	26
I.2. Modifications sélectives des α, β et γ-cyclodextrines.....	34
I.2.1. Architectures moléculaires à base de cyclodextrine.....	34
I.2.2. Stratégies de modification	34
I.2.3. Permodification des fonctions hydroxyle en positions 2, 6 en une étape	36
I.2.4. Méthodes de synthèse des per(2,6-méthyl)- α , β , γ -CDs	39
I.2.5. Conclusion sur les modes de synthèse.....	42
I.2.6. Polymères à cœur cyclodextrine et à branches poly(oxyde d'éthylène).....	43
I.3. Polymérisation anionique des oxiranes	48
I.3.1. Polymérisation anionique d'oxyde d'éthylène	48
I.3.2. Polymérisation anionique d'oxyde de propylène	50
I.4. Conclusion.....	53
Références bibliographiques	54
Chapitre II : Synthèse et caractérisation des amorceurs	63
II.1. Introduction.....	65
II.2. Choix de la méthode de modifications chimiques et stratégie de synthèse	65
II.3. Alkylation sélective des fonctions hydroxyle en positions 2 et 6.....	67
II.3.1. Comparaison de la réactivité des α , β , γ -cyclodextrines vis-à-vis de la réaction d'alkylation sélective.....	67
II.3.2. Synthèse des per(2,6-di-O-allyl)- α , β , γ -cyclodextrines.....	70
II.3.3. Isolation des per(2,6-di-O-allyl)- α , β , γ -cyclodextrines.....	74
II.3.4. Conclusion.....	80
II.4. Perméthylation des fonctions hydroxyle en position 3.....	80
II.4.1. Introduction	80
II.4.2. Expériences de perméthylation.....	81
II.4.3. Conclusion.....	84
II.5. Hydroboration oxydative des fonctions allyle.....	85
II.5.1. Introduction	85
II.5.2. Synthèse des per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD.....	85
II.6. Conclusion générale sur les modifications chimiques sélectives	89
Références bibliographiques	90

Chapitre III : Polymérisation anionique des oxiranes	93
III.1. Introduction.....	95
III.2. Polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène amorcée par l'alcool allylique.....	96
III.2.1. Présentation des polymérisations sur l'alcool allylique	96
III.2.2. Conclusion.....	99
III.3. Polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène amorcée la cyclodextrine native	100
III.3.1. Expériences de polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène amorcée par les CDs natives	101
III.3.2. Comparaison de la réactivité des différentes fonctions hydroxyle de la cyclodextrine vis-à-vis de la réaction de polymérisation anionique d'oxyde d'éthylène.....	103
III.3.3. Détermination des masses molaires moyennes des polymères en étoile	107
III.3.4. Conclusions sur les essais de polymérisations amorcées par les cyclodextrines natives	114
III.4. Polymérisations anioniques d'oxiranes amorcée par les dérivés de cyclodextrines	115
III.4.1. Introduction	115
III.4.2. Expériences de polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène amorcées par la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD.....	116
III.4.3. Extraction des polymères en étoile.....	118
III.4.4. Analyse spectroscopique par RMN DOSY des macromolécules.....	122
III.4.5. Aspect cinétique	128
III.4.6. Polymérisation anionique d'oxyde de propylène amorcée par la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -cyclodextrine	129
III.4.7. Conclusion sur les polymérisations anioniques d'oxiranes amorcées par les dérivés de cyclodextrines	131
III.5. Conclusion.....	132
Références bibliographiques	133
Chapitre IV : Application à l'étude des canaux ioniques	135
IV.1. Introduction.....	137
IV.2. Caractéristiques de la membrane lipidique modèle et des cyclodextrines testées.....	137
IV.3. Exploitation des résultats.....	140
IV.4. Essais préliminaires avec la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)-β-CD	142
IV.4.1. Introduction	142
IV.4.2. Exploitation des résultats et discussions.....	143
IV.5. Etude comparative du comportement des polymères en étoile de taille variable.....	144
IV.5.1. Introduction	144
IV.5.2. Exploitation des résultats et discussion	144
IV.6. Les canaux permanents	149
IV.6.1. Courant en fonction du temps pour différentes concentrations en ZE164	149
IV.6.2. Diamètres apparents des canaux permanents	153
IV.7. Structure moléculaire / activité.....	156
IV.8. Conclusion et perspectives.....	159
Références bibliographiques	161
Conclusions et perspectives.....	163

Chapitre V : Techniques expérimentales	167
V.1. Modifications des cyclodextrines	169
V.1.1. Caractéristiques et purification des produits utilisés	169
V.1.2. Synthèse des per(2,6-di- <i>O</i> -allyl)- α,β,γ -CDs	170
V.1.3. Synthèse des per(2,6-di- <i>O</i> -allyl-3- <i>O</i> -méthyl)- β -CDs.....	172
V.1.4. Synthèse des per(2,6-di- <i>O</i> -hydroxypropyl-3- <i>O</i> -méthyl)- β -CDs	173
V.2. Polymérisation anionique des oxiranes	173
V.2.1. Lavage et séchage du matériel.....	173
V.2.2. Préparation de l'agent de déprotonation.....	174
V.2.3. Réactions de polymérisation anionique des oxiranes	176
V.3. Expériences d'électrophysiologie	179
V.3.1. Généralités	179
V.3.2. Dispositif de mesure	180
V.3.3. Préparation des bicouches de lipides	181
V.3.4. Préparation des solutions.....	182
V.4. Techniques d'analyse	182
V.4.1. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	182
V.4.2. Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC).....	184
V.4.3. Spectrométrie de masse (ESI/MS).....	184

Liste des abréviations

BaO : oxyde de baryum
Ba(OH)₂.8H₂O : hydroxyde de baryum
CD : cyclodextrine
α-CD : alpha-cyclodextrine
β-CD : bêta-cyclodextrine
γ-CD : gamma-cyclodextrine
CCM : chromatographie sur couche mince
DDP : Différence de potentiel
DMF : diméthylformamide
DMPC : diméthyl phosphatidylcholine
DMSO : diméthylsulfoxyde
DPM : diphénylméthane
DPMK : diphényl méthyl potassium
DPPC : diphényl phosphatidylcholine
HMPT : hexaméthylphosphotriamide
MeI : Iodométhane
NaH : hydrure de sodium
OE : oxyde d'éthylène
OP : oxyde de propylène
PC : phosphatidylcholine
PG : phosphatidylglycol
POE : poly(oxyde d'éthylène)
POP : poly(oxyde de propylène)
POE-diOH : α, ω-dihydroxy-POE
THF : tétrahydrofurane

Introduction générale

Chez les êtres vivants, les canaux ioniques transmembranaires sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Ils sont impliqués dans le transport des ions à travers la membrane plasmique, et sont à l'origine de nombreux phénomènes d'excitabilité cellulaire comme les conductions nerveuses, les contractions musculaires ou encore les battements cardiaques. Leur fonctionnement anormal est à l'origine d'un certain nombre de maladies.

En raison de la complexité des canaux protéiques, de nombreux groupes de recherche ont développé au cours de ces dernières années des analogues artificiels. Initialement, l'approche synthétique des canaux ioniques est destinée à l'élucidation des conditions structurales minimales pour que l'ion passe à travers la membrane. Les canaux artificiels sont des modèles simplifiés de ce qui existe dans la nature. L'intérêt de les synthétiser est de contrôler la spécificité du pore : son diamètre, sa longueur, sa sélectivité, et ainsi à long terme comprendre parfaitement le fonctionnement des canaux naturels.

L'approche synthétique implique différentes stratégies, dont la plus simple consiste à modifier des molécules possédant une cavité ou de formes cycliques, comme dans le cas des éthers-couronnes, des calixarènes ou encore des cyclodextrines.

Au sein de l'équipe Matériaux Polymères aux Interfaces, des chercheurs se sont intéressés à la formation de canaux artificiels à base de cyclodextrines. Ces molécules cages présentent l'avantage de permettre un très grand nombre de possibilités de modifications chimiques, engendrant diverses conceptions architecturales. Ainsi, A. Benkhaled a décrit des cyclodextrines amphiphiles, composés de fonctions thiol sur la face primaire et de groupements hydrophobes triméthylsilane, sur la face secondaire. Sur le même principe, N. Badi a synthétisé des polymères en étoile composés de 7 chaînes de poly(oxyde d'éthylène) sur la face primaire et de 14 chaînes heptyle hydrophobes sur la face secondaire. Dans les deux cas, des études d'électrophysiologie ont mis en évidence de manière certaine la formation de véritables hémi-canaux. Si la formation des hémi-canaux s'est avérée être un succès, aucun canal permanent n'a été développé au sein du laboratoire.

L'objectif de cette thèse est la formation de nouveaux polymères en étoile à bras poly(oxyde d'éthylène), de nature amphiphile hydrosoluble, et d'architecture cylindrique, qui sont autant de propriétés indispensables à leur insertion dans les bicouches lipidiques à l'image des canaux permanents, c'est-à-dire avec des temps de résidence élevés.

Ce manuscrit comporte cinq chapitres. Le premier est consacré à l'étude bibliographique des canaux ioniques transmembranaires, de leur technique de caractérisation, ainsi qu'un rappel concernant les modifications chimiques sélectives en positions 2 et 6 des cyclodextrines suivi de la polymérisation anionique des oxiranes. Dans le second chapitre, est décrite la synthèse de macroamorceurs à partir de cyclodextrine native, les polymérisations anioniques d'oxiranes faisant l'objet du troisième chapitre. La capacité d'insertion dans les bicouches lipidiques de ces polymères en étoile amphiphiles et hydrosolubles est décrite dans le chapitre IV. Enfin, le dernier chapitre est consacré à la description des techniques expérimentales utilisées lors de ce travail.

Chapitre I : Etude bibliographique

I.1. Les canaux ioniques transmembranaires

I.1.1. Introduction

Dans les organismes vivants, les canaux transmembranaires jouent un rôle fonctionnel fondamental puisqu'ils permettent le transport d'ions de part et d'autre de la membrane. L'hypothèse de leur existence est émise en 1952 par Alan Hodgkin¹, dans le cadre de ses travaux sur la théorie de l'influx nerveux qui lui valent en 1963, conjointement avec Andrew Huxley, le prix Nobel de médecine². La confirmation de l'existence des canaux ioniques se fait quelques décennies plus tard avec le développement par Erwin Neher et Bert Sakmann de la technique d'enregistrement électrique connue sous le nom de « patch clamp », travaux récompensés par un prix Nobel en 1991^{3,4}. Les canaux ioniques participent ainsi à l'excitabilité cellulaire, à l'origine par exemple des conductions nerveuses, des contractions musculaires ou encore des battements cardiaques. Leur dysfonctionnement est donc source de nombreuses pathologies. Les grands axes de recherches actuels sont nés d'un besoin de comprendre les liens qui existent entre le fonctionnement de ces canaux ioniques et les maladies qui en découlent et d'apporter à long terme des remèdes efficaces.

Dans la nature, les exemples de canaux biologiques ne manquent pas et varient notamment de par leur sélectivité. Les canaux potassiques sont les canaux ioniques les plus présents dans les cellules. Ils forment des pores qui laissent passer uniquement les ions potassium du milieu intra- au milieu extracellulaire, à travers la membrane plasmique, ce qui est indispensable à de nombreuses fonctions de l'organisme telles que la sécrétion d'hormones comme l'insuline. Cet exemple montre la forte sélectivité de certains canaux ioniques. Il existe toutefois des canaux peu sélectifs, comme le canal nicotinique impliqué dans la contraction musculaire et qui laisse passer tous les ions positifs monovalents. Par ailleurs, certains canaux sont capables de s'ouvrir et de se fermer en réponse à un signal spécifique (voltage, ligand, mécanique). En outre, les canaux naturels se différencient de par leur architecture. Par exemple, les canaux potassiques, nicotiniques, ont en commun d'être des canaux transmembranaires, en opposition à la gramicidine, qui nécessite la rencontre de deux unités hélicoïdales pour former un canal. Malgré le grand nombre d'études dans ce domaine, de nombreuses interrogations restent à élucider et notamment la question du mode d'insertion dans les

membranes. C'est donc pour mieux comprendre le fonctionnement des modèles naturels et afin d'en reproduire à long terme les propriétés remarquables, que des chercheurs ont adopté une démarche de synthèse biomimétique. Le biomimétisme consiste à observer les modèles existants dans la nature, à tenter d'en comprendre les mécanismes et à étudier la possibilité d'en reproduire les formes, ou les processus afin d'en améliorer le potentiel pour diverses applications. En raison de la complexité des canaux ioniques naturels, des modèles artificiels ont été synthétisés.

Avant toute description de ces modèles, notons qu'un « canal ionique » artificiel laisse passer les molécules inorganiques tandis que le terme « pore » est utilisé pour le transport des molécules organiques. En outre, l'approche synthétique des analogues artificiels est destinée à créer des représentations simplifiées de la réalité, dont on pourra contrôler les spécificités comme le diamètre du pore, sa longueur ou encore sa sélectivité dans l'objectif d'applications dans le domaine de reconnaissance moléculaire⁵, de capteurs de réactions enzymatiques⁶, d'enzymes artificiels⁷, et dans les biocapteurs⁸. Enfin, certains canaux artificiels sont utilisés pour des activités antibiotiques^{9,10}.

Différentes stratégies de synthèse de canaux artificiels sont connues. Des chercheurs¹¹⁻¹³ ont modifié la structure des canaux naturels dans le but de leur apporter de nouvelles spécificités. Cependant, le terme artificiel n'est pas tout à fait approprié à ces molécules naturelles transformées. Les canaux synthétiques désignent les édifices complètement nouveaux qui sont en plein essor depuis plus d'une vingtaine d'années et qui font l'objet de la partie suivante. D'énormes progrès ont été réalisés dans la création de ces canaux synthétiques.

I.1.2. Conception de canaux artificiels

Plusieurs architectures de canal ionique ont été conçues par les chercheurs¹⁴. Il est à noter que des pores micellaires¹⁵⁻¹⁷ ont été synthétisés, mais nous ne ferons ici état que des canaux ioniques de structure bien définie et reproductible. Matile et al.¹⁴ ont proposé une classification permettant de recenser tous les types d'assemblages supramoléculaires récents, basée sur leur conception structurale (figure I-1).

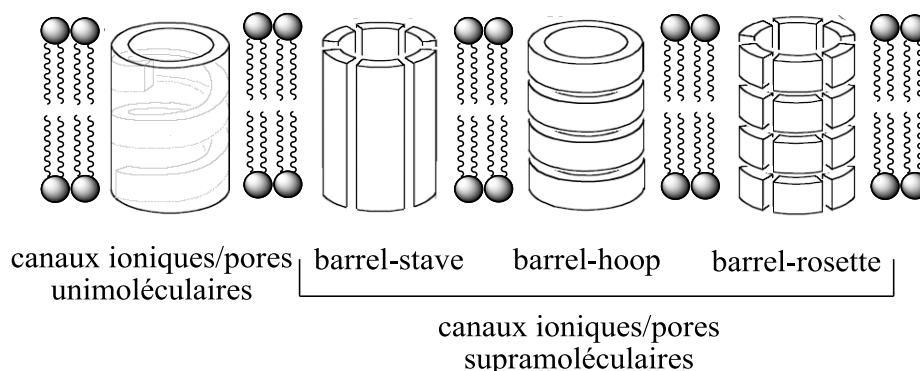


FIG. I.1 - Classification structurale des canaux ioniques¹⁴

La conception structurale la plus simple est celle des canaux unimoléculaires. Des découpes virtuelles verticales et/ou horizontales de celles-ci aboutissent à des assemblages supramoléculaires : « barrel-stave », « barrel-hoop » et « barrel-rosette ». Ces structures sont mieux connues par leur appellation anglophone, c'est la raison pour laquelle leur nom n'est pas traduit en français. Les stratégies de conception des pores « barrel-stave » consiste à auto-assembler, de manière cylindrique, des monomères linéaires, de forme bâtonnet.

Un exemple de modèle « **barrel-stave** » est rapporté par Matile¹⁸, et représenté sur la figure I-2.

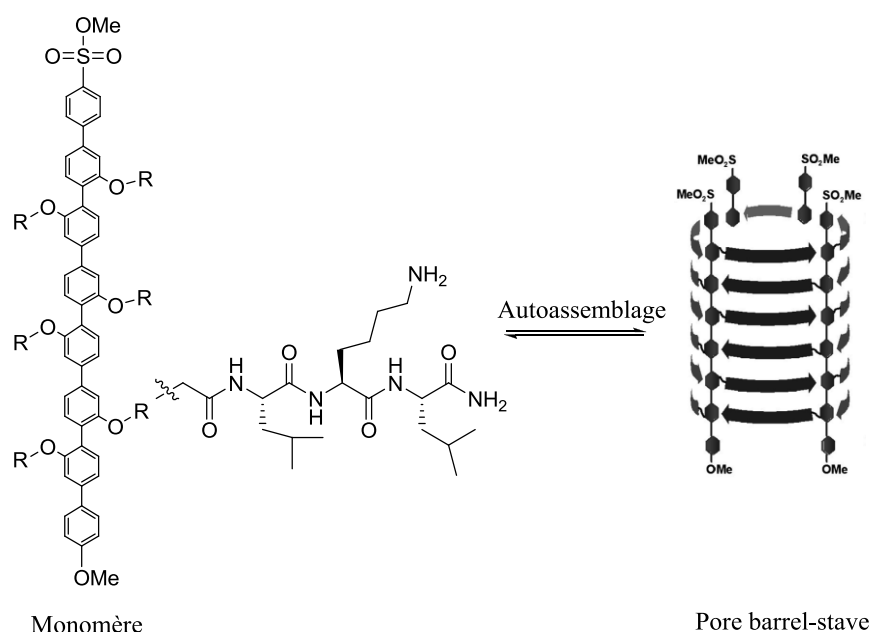


FIG. I.2 - Représentation schématique des barreaux β synthétiques autoassemblés par 4 monomères p-octaphényl¹⁸

Les barreaux β à baguette rigide, représentée sur la figure précédente, sont des assemblages supramoléculaires qui forment des pores dans des membranes lipidiques¹⁸. Chaque monomère est constitué d'une baguette rigide *p*-octaphényyle, de longueur comparable à l'épaisseur des bicouches lipidiques. Par ailleurs, sur chaque baguette rigide, sont attachés huit peptides qui forment des interactions intermoléculaires du type feuillet β pour aboutir à la formation des pores. Notons que la bicouche de lipides n'est pas homogène et possède une capacité à se déformer légèrement pour s'adapter au canal ou au pore formé.

Les assemblages supramoléculaires nommés « **barrel-hoop** » sont générés artificiellement par la superposition de monomères cycliques. Un exemple de motif « barrel-hoop » est apporté par Ghadiri, qui a utilisé des D, L- α -peptides pour engendrer des canaux artificiels^{19,20} (figure I-3, A).

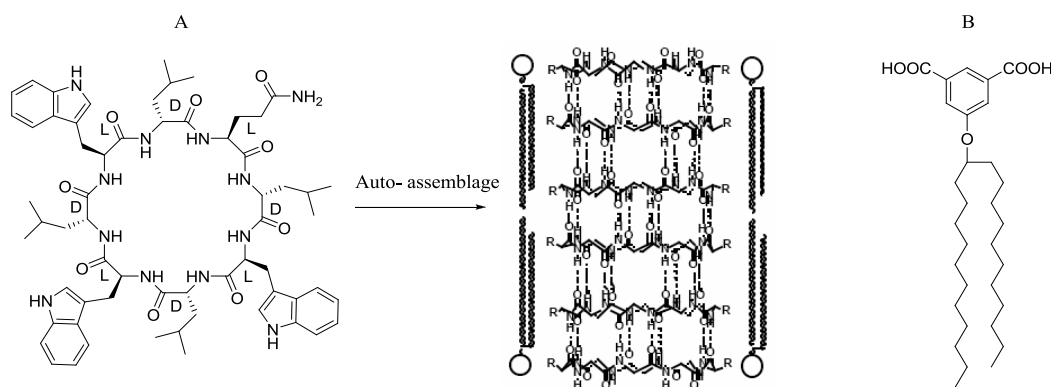


FIG. I.3 - Composés qui s'associent pour former des assemblages supramoléculaires de type A) barrel-hoop peptidique^{19,20} et B) barrel-rosette²¹

L'activité de ces canaux ioniques obtenus par l'auto-association de peptides est comparable à celle des canaux ioniques naturellement issus de la gramicidine A. Bien que les motifs barrel-hoop ont fait l'objet d'une attention particulière, les canaux ioniques barrel-rosette commencent tout juste à émerger.

Le modèle « **barrel-rosette** » est composé de petites molécules qui forment un canal avec une structure non précisée. Fyles et ses collaborateurs donnent l'exemple d'un dérivé isophtalique avec des propriétés de canal ionique²¹, comme montré sur la figure I-3, B.

De manière générale, la structure des canaux unimoléculaires est mieux définie que celle obtenue par assemblages supramoléculaires. Néanmoins, parmi ces derniers, les canaux bimoléculaires macrocycliques « barrel-hoop » présentent également des structures parfaitement définies.

I.1.3. Canaux artificiels unimoléculaires et barrel-hoop bimoléculaires

Tout d'abord, rappelons que par les termes « unimoléculaire » et « bimoléculaire », nous faisons référence, comme leur nom l'indique, aux nombres d'unités qui constituent le conduit dans lequel circulent les ions. Dans la suite du manuscrit, nous utiliserons indifféremment le terme « hémi-canal » ou « canal bimoléculaire » (en opposition à un « canal unimoléculaire »). Nous ne faisons donc en aucun cas ici allusion à la durée de vie du canal mais bien à la conception de l'architecture de la molécule d'intérêt.

Les macrocycles utilisés pour former des canaux unimoléculaires ou bimoléculaires sont les suivants : les cyclopeptides, les calixarènes, les résorcinarènes, les éthers-couronnes et enfin les cyclodextrines. Ces macrocycles sont modifiés chimiquement selon des méthodes de synthèse qui seront décrites dans le chapitre suivant. Nous avons procédé à une description exhaustive de toutes les molécules amphiphiles possédant un macrocycle et formant des canaux artificiels, qui sont recensés dans la littérature. Nous avons reportés, dans les tableaux suivants I-1 à I-5, leurs principales caractéristiques (structure, méthodes et techniques de caractérisation, incorporation dans des bicouches lipidiques de type vésicule ou plane, et le type de canal obtenu : hémi-canal ou canal transmembranaire unimoléculaire). Nous discuterons enfin de la relation qui existe entre la structure de ces dérivés et la formation de canaux ioniques.

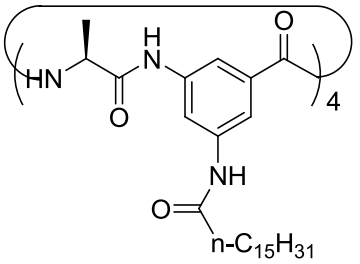
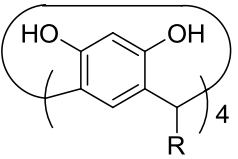
Structure des dérivés amphiphiles	Caractéristique structurale	Techniques de caractérisation structurale	Incorporation dans des bicouches lipidiques : techniques de caractérisation et caractéristiques du canal	Architecture du canal inséré	Réf
 <p>1</p>	<p>Cyclopeptide</p> <p>composé de 4 L-Alanine, chaînes latérales hydrophobes hexanedécanoyle</p>	<p>RMN ^1H et ^{13}C, MS, Analyse élémentaire</p>	<p>➤ Bicouche lipidique plane</p> <p>➤ Electrophysiologie</p> <p>➤ Caractéristiques : Sélectivité cationique, conductance : 9 pS</p>	Hémi-canal	22
 <p>2 $\text{R} = \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{O} \text{---} \text{C}_8\text{H}_{17}$</p> <p>3 $\text{R} = \text{---} \text{C}_6\text{H}_{13}$</p> <p>4 $\text{R} = \text{---} \text{C}_{10}\text{H}_{19}$</p>	<p>Résorcinarène</p> <p>Chaînes latérales lipophiles :</p> <p>2 : substituants phénoxyalkyle</p> <p>3 : groupes alkyle</p> <p>4 : chaînes cholate</p>	<p>RMN ^1H et ^{13}C, MS, Analyse élémentaire</p>	<p>➤ Bicouche lipidique plane de PC</p> <p>➤ Electrophysiologie</p> <p>➤ Caractéristiques :</p> <p>2 : épaisseur de la bicouche = 50Å, diamètre du pore = 0,5-1,7Å, ouverture : 35±10ms</p> <p>3 et 4 : temps de vie d'ouverture : 2,5-4,5s sans affecter la sélectivité K^+</p>	Hémi-canal	23 24 25 26

Tableau I-1 : Hémi-canaux obtenus par modification chimique de cyclopeptides²² et de résorcinarènes²³⁻²⁶

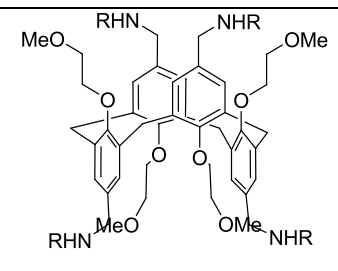
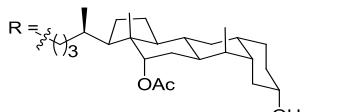
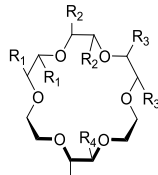
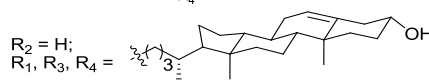
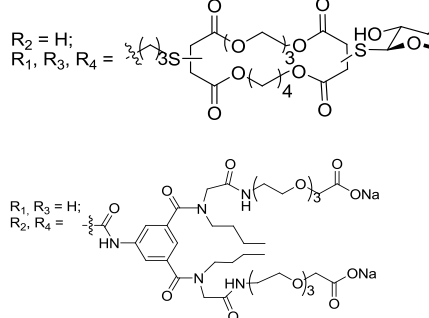
Structure des dérivés amphiphiles	Caractéristique structurale	Techniques de caractérisation structurale	Incorporation dans des bicouches : lipidiques, techniques de caractérisation, caractéristiques du canal	Architecture du canal inséré	Réf
 <p>5</p> 	<p>Calixarène</p> <p>R= chaînes cholate de longueur égale à 3,5 nm, sur les deux faces, suffisamment longs pour recouvrir la bicouche lipidique</p>	CCM, RMN ^1H et ^{13}C , MS	<p>➤ Vésicules PC/ PG</p> <p>➤ Techniques : Fluorescence, pH sensible, RMN ^{23}Na.</p> <p>➤ Caractéristiques : Activité, transport cationique H^+, Na^+.</p> <p>(La dépendance de concentration linéaire → mode d'action unimoléculaire)</p>	Canal unimoléculaire	27
 <p>6</p>  <p>7</p>  <p>8</p>	<p>Ether couronne</p> <p>6 : 6 unités cholestérol dans les 2 directions.</p> <p>7 : 6 unités bola-amphiphile dont le corps est macrocycle tétraester possédant une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Le glucose sert de tête polaire.</p> <p>8 : 4 groupements formés de multiples chaînes poly(oxyde d'éthylène), avec des extrémités acides tartriques.</p>	CCM, RMN ^1H et ^{13}C , MS, Analyse élémentaire, Pouvoir rotatoire	<p>➤ Vésicules unilamellaires (LUV)</p> <p>➤ Caractéristiques :</p> <p>6 : $^{23}\text{Na}^+$ NMR : Transport faible des cations dû à l'interaction entre l'éther couronne et le métal alcalin.</p> <p>7 : Méthode pH stat : transport sélectif de $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$.</p> <p>8 : RMN Li^+ : → Influx Na^+, efflux Li^+ : Le canal fonctionne comme un antiport échangeant les cations avec un rapport 1/1.</p>	Canal unimoléculaire	28 29 30

Tableau I-2 : Canaux unimoléculaires à partir de calixarènes²⁷ et d'éther couronnes²⁸⁻³⁰

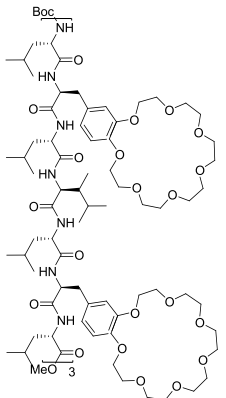
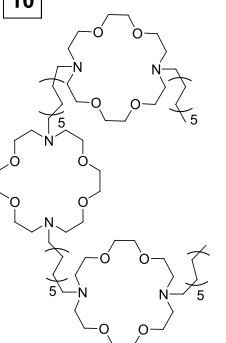
Structure des dérivés amphiphiles	Caractéristique structurale	Techniques de caractérisation structurale	Incorporation dans des bicouches lipidiques : techniques de caractérisation et caractéristiques du canal	Architecture du canal inséré	Réf
<div>9</div> 	<p>Ether couronne</p> <p>conjugué à un groupement peptidique qui adopte des conformations hélicoïdales dans la bicouche lipidique.</p>	<p>RMN ^1H et ^{13}C, ESI-MS</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bicouche lipidique plane DPPC ➤ Electrophysiologie ➤ activité cationique K^+ ➤ Vésicule PC/PG ➤ Méthode pH stat, RMN ^{23}Na 	<p>Canal unimoléculaire de conformation hélicoïdale</p>	31
<div>10</div> 	<p>Ether couronne</p> <p>Canal ionique tubulaire : « bras » terminal- couronne- espaceur- couronne- « bras » terminal</p>	<p>CCM, Pouvoir rotatoire, RMN ^1H et ^{13}C, ESI-MS, Analyse élémentaire</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Liposome DMPC ➤ Fluorescence ➤ Flux de cation Na^+ ➤ Transport des cations renforcé par des études RMN ^{23}Na <p>Activité : transport Na^+ / 28% gramicidine A</p>	<p>Canal unimoléculaire tubulaire</p>	32

Tableau I-3 : Canaux unimoléculaires obtenus par modification chimique de calixarènes³¹ et d'éther couronnes³²

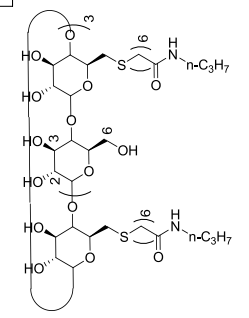
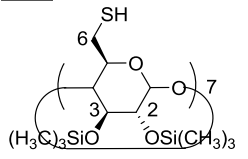
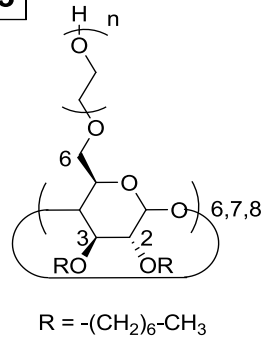
Structure des dérivés amphiphiles	Caractéristique structurale	Techniques de caractérisation structurale	Incorporation dans des bicouches lipidiques : techniques de caractérisation et caractéristiques du canal	Architecture du canal inséré	Réf
11 	Cyclodextrine 4 des 7 fonctions OH de la face I ^{aire} modifiées avec des groupements hydrophobes n-butrylamido-n-hexylsulfenyle de longueur 1,3 nm → épaisseur (totale) = 2,4nm solubilité dans l'eau : non	RMN ¹ H, IR, Analyse élémentaire	➤ Vésicule de lécithine d'œuf ➤ Fluorescence ➤ Caractéristiques : Transport de cations Co ²⁺ et de Cu ²⁺ Formation de canal dans une gamme de concentrations de 0-55 µM. Vitesse de passage des cations de 4.5×10 ⁴ s ⁻¹ (à 55 µM)	Hémi-canal	33
12 	Cyclodextrine 7 fonctions hydrophiles thiol sur la face I ^{aire} , ds=7. 14 groupes hydrophobes triméthylsilyl sur la face II ^{aire} , ds=14. Solubilité dans l'eau : non	RMN ¹ H et ¹³ C, ESI-MS	➤ Bicouche plane d'asolectine (4-8nm) ➤ Electrophysiologie ➤ Caractéristiques : Insertion des dérivés CD dans la bicouche	Hémi- canal	34
13  R = -(CH ₂) ₆ -CH ₃	Cyclodextrine β: n (OE) = 0, 12,39, 51, γ: n(OE) = 32 7 ou 8 chaînes POE sur la face I ^{aire} , ds= 7 ou 8 (β, γ). 14 ou 16 groupements heptylés, hydrophobes, ds= 14 ou 16 (β, γ)., épaisseur = 1.8 nm Solubilité dans l'eau : oui	RMN ¹ H et ¹³ C, ESI-MS, MALDI-TOF, SEC	➤ Bicouche plane de diphtanoyle (9nm) ➤ Electrophysiologie ➤ Caractéristiques : épaisseur de la membrane = 4-6 nm, d. (pore) = 1 Å Temps de vie: 2s	Hémi-canal	35 36

Tableau I-4 : Hémi-canaux obtenus par modification chimique des cyclodextrines³³⁻³⁶

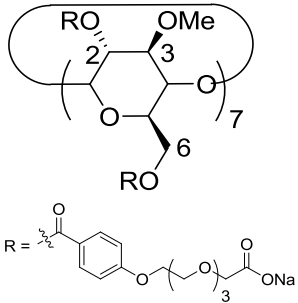
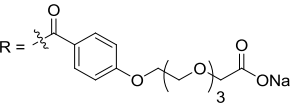
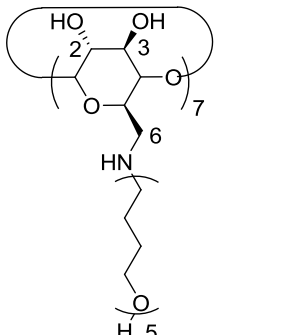
Structure des dérivés amphiphiles	Caractéristique structurale	Techniques de caractérisation structurale	Incorporation dans des bicouches lipidiques : techniques de caractérisation et caractéristiques du canal	Architecture du canal inséré	Réf
14  <p>R = </p>	<p>Cyclodextrine</p> <p>En position 2,6 : oligoéthers hydrophobes greffés, composé d'extrémités hydrophiles, ds = 14</p> <p>En position 3 : OMe, ds = 7</p> <p>Solubilité dans l'eau : non</p>	<p>CCM, Pouvoir rotatoire, RMN ^1H et ^{13}C, ESI-MS, Analyse élémentaire.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Vésicules ➤ Spectroscopie UV ➤ RMN ^{23}Na ➤ RMN ^7Li <p>Insertion dans les bicouches lipidiques mais le transport ionique est très faible.</p>	Canal unimoléculaire	37 38
15 	<p>Cyclodextrine</p> <p>7 chaînes oligoéther hydrophobe sur la face primaire, ds = 7.</p> <p>Groupements cationiques ammonium NH : sélectivité/ anions</p>	<p>RMN ^1H et ^{13}C, Pouvoir rotatoire, FAB-MS, Analyse élémentaire.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Vésicules ➤ RMN ^{23}Na : Corrélation linéaire entre les vitesses d'échanges de Na^+ et la concentration du canal ajouté → Canal monomoléculaire ➤ Fluorescence (HPTS): Sélectivité/ anions : $V(\text{transport}) : \text{I}^- < \text{Br}^- < \text{Cl}^- = \text{Na}^+$ <p>Activité : transport Na^+ / 36% gramicidin A</p>	Canal unimoléculaire	39

Tableau I-5 : Canaux transmembranaires unimoléculaires à cœur cyclodextrines³⁷⁻³⁹

I.1.3.1. Stratégies de synthèse d'un canal uni- ou bimoléculaire

Dans les tableaux I-1 à I-5, sont rapportées différentes molécules amphiphiles, de composition parfaitement définie par des techniques structurales, formant des canaux artificiels dans les bicouches lipidiques. D'après la littérature, **deux stratégies de synthèse** permettent l'obtention de molécules aux fonctionnalités remarquables.

La première stratégie consiste à fonctionnaliser sélectivement un macrocycle avec des groupements lipophiles, ce qui est le cas des molécules décrites dans les tableaux I-1, I-2, I-4 et I-5. Cette méthode est intéressante du fait des nombreuses possibilités de modification chimique des macrocycles et des différentes propriétés des canaux qui en découlent.

Rarement utilisée, mais innovante, la deuxième stratégie consiste à lier plusieurs macrocycles avec un groupement peptidique ou des chaînes alkyles, tel est le cas des molécules **9** et **10**, à base d'éther-couronnes (Tableau I-3).

I.1.3.2. Conditions de réalisation d'un canal uni- ou bimoléculaire

Au vu des tableaux précédents, **trois critères structuraux** communs à tous les exemples donnés, sont indispensables à la formation d'un canal :

- La présence d'un composé d'architecture cyclique (cyclopeptide, éther couronne) ou possédant une cavité (calixarène, resorcinarène et cyclodextrine) permettant le passage des ions.
- La nature amphiphile du composé inséré, et notamment l'existence d'une partie hydrophile qui améliore la solubilité de la molécule dans l'eau, et impose une localisation interfaciale.
- La taille de la molécule ou de l'ensemble des molécules devant être en adéquation avec la taille de la bicouche lipidique.

I.1.3.3. Conditions discriminatoires d'un canal uni- ou bimoléculaire

Aussi, nous pouvons constater que, selon la nature du canal souhaité (unimoléculaire ou bimoléculaire), la **conception structurale** de la molécule (le type de macrocycle et la longueur totale de la macromolécule) varie :

- Les hémi-canaux à base de cyclopeptides et de résorcinarènes

D'après le tableau I-1, les macrocycles choisis pour former des canaux bimoléculaires sont les cyclopeptides (**1**) et les résorcinarènes (molécules **2, 3, 4**). Ils sont fonctionnalisés sur une seule face avec des groupements hydrophobes de longueur égale à la moitié de celle de la bicouche lipidique. Ainsi, l'assemblage de deux unités implique une longueur totale comparable à l'épaisseur de la membrane, ce qui permet la formation d'un hémi-canal.

- Les canaux unimoléculaires à base de calixarènes et d'éther-couronnes

Les tableaux I-2 et I-3 montrent que le choix des macrocycles pour former des canaux unimoléculaires s'est porté sur l'utilisation des calixarènes (**5**) et des éthers couronnes (composés **6 à 10**). Ils sont soit fonctionnalisés sur les deux faces, avec des groupements amphiphiles dont la longueur totale est comparable à celle de la bicouche lipidique (molécules **5 à 8**), soit plusieurs macrocycles sont liés ensemble à l'aide de groupement peptidique (**9**) ou de chaînes alkyle (**10**), engendrant ainsi des canaux unimoléculaires.

- Les canaux uni- et bimoléculaires à cœur cyclodextrine

L'analyse des tableaux I-4 et I-5 montre le cas particulièrement intéressant des cyclodextrines, qui ont permis de mettre en évidence par des techniques de caractérisation la formation aussi bien d'hémi-canaux (molécules **11, 12, 13**), que celle de canaux transmembranaires unimoléculaires (**14, 15**). Dans le cas des hémi-canaux, les cyclodextrines sont fonctionnalisées sur une seule face avec des groupements lipophiles (**11 à 13**), tandis que les seconds présentent la possibilité d'être fonctionnalisés soit sur une face (**14**), soit sur les deux (**15**). Dans tous les cas, la longueur totale de la molécule est en adéquation avec l'épaisseur de la bicouche lipidique.

Ainsi, les cyclodextrines ont permis de former aussi bien des canaux unimoléculaires que des hémi-canaux, contrairement aux macrocycles cités précédemment.

I.1.4. Canaux artificiels à base de cyclodextrines

I.1.4.1. Hémi-canaux

La formation d'hémi-canaux nécessite la rencontre de deux molécules amphiphiles. Les monomères s'insèrent de chaque côté de la bicouche lipidique, puis s'alignent de façon transitoire, grâce à la fluidité membranaire, pour former le canal ionique. Dans le tableau I-4, sont reportés les hémi-canaux à base de cyclodextrines, qui sont de manière générale fonctionnalisées sélectivement par des groupements lipophiles sur une face et hydrophiles sur la seconde face.

Une discussion sur les canaux synthétiques doit impérativement commencer par une description du composé pionnier de Tabushi³³ (**11**). Les cyclodextrines tétra-modifiées de celui-ci sont conçues pour s'insérer dans une seule couche lipidique. La structure a été conçue pour obtenir une molécule amphiphile avec des têtes polaires qui constituent aussi un portail d'entrée pour les cations. La β -CD native possède 14 groupements hydroxyle sur sa face secondaire et ces derniers seront en contact avec le milieu aqueux. Par ailleurs 4 des 7 groupements hydroxyle de la face primaire sont substitués par des groupements hydrophobes n-butyrylamido-n-hexylsulfényle de longueur égale à 1,3 nm. Ainsi la taille d'une telle molécule amphiphile est de 2,3 nm tête à queue (la taille d'une CD est de 0,8 nm, auquel il faut ajouter 0,2-0,3 nm, pour les groupements hydroxyle). Tabushi et al.³³ ont estimé la dimension du dimère à 4,8 nm. Dans les deux cas, de telles structures pourraient recouvrir aisément les 3,0-3,5 nm de bicouche lipidique. Par ailleurs, notons que les techniques de caractérisation des canaux ioniques par patch clamp qui permettent de suivre des événements uniques et le transport des cations Na^+ et K^+ , étant très peu développé dans les années 80, Tabushi et al.³³ ont alors évalué le transport des cations Cu^{2+} et Co^{2+} , par spectroscopie de fluorescence, à travers des membranes de lécithine d'œuf, dont les caractéristiques sont rapportées dans le tableau I-4. Notons qu'aucune information n'est donnée concernant la durée d'ouverture du canal.

La formation d'hémi-canaux par modification chimique des cyclodextrines, est reprise quelques décennies plus tard, par des chercheurs au sein du LAMBE. En effet, A. Benkhald³⁴ a décrit des cyclodextrines amphiphiles (**12**), composées de fonctions hydrophiles thiol sur la face primaire, en contact avec la solution saline, et de

groupements hydrophobes triméthylsilane, sur la face secondaire, entrant en interaction avec la partie hydrophobe des lipides membranaires.

Sur le même principe, des molécules amphiphiles (**13**) ont été synthétisées^{35,36}, en fonctionnalisant la face secondaire des CD avec 14 chaînes heptyle hydrophobes et la face primaire avec des groupements poly(oxyde d'éthylène). Ces derniers permettent notamment d'améliorer la solubilité du composé dans l'eau, ce qui a pour conséquence un meilleur contrôle de l'insertion dans les bicouches lipidiques.

Dans les deux cas, des études d'électrophysiologie ont mis en évidence de manière certaine la formation de véritables hémi-canaux, ainsi que leurs caractéristiques²⁹⁻³¹.

I.1.4.2. Canaux unimoléculaires

Dans le tableau I-5, est rapporté le cas des canaux transmembranaires à base de dérivés cyclodextrines. En 1995, Lehn et al.^{37,38} sont les premiers à synthétiser un dérivé de cyclodextrine (**14**) permettant la formation de canaux unimoléculaires. Pour cela, ils fonctionnalisent la β -cyclodextrine native avec des groupements oligo-éther, sur les deux faces du macrocyle. La conception des chaînes latérales est réalisée de sorte que la structure terminale possède i) un groupement chromophore détectable par UV, permettant de détecter les molécules lors de leur insertion dans les bicouches lipidiques ii) une unité oligo(oxyde d'éthylène) flexible de longueur égale à 1,5 nm capable d'interagir avec les cations et enfin iii) un groupement terminal (fonctions ester, acide ou carboxylate, de polarité différente) de nature hydrophile, permettant d'assurer une orientation transversale de la molécule dans les bicouches lipidiques. La longueur totale selon l'axe moléculaire est égale à 5 nm, ce qui est proche de la taille de la bicouche lipidique. La synthèse de cette molécule sera discutée dans le prochain chapitre.

Par la suite, Gin et son équipe³⁹ rapporte le cas d'une cyclodextrine modifiée sur une seule face (composé **15**). Les fonctions hydroxyle de la face primaire ont été fonctionnalisées avec des chaînes oligo-éther hydrophobes, suffisamment longues pour qu'une molécule s'étende sur toute l'épaisseur de la bicouche. Par ailleurs, un anneau de cations ammonium a été positionné en position 6 de la CD. Des mesures par spectroscopie RMN ²³Na ont montré que, malgré la présence des cations ammonium, le flux de Na⁺ est fortement facilité à travers des membranes de vésicule de phosphatidylcholine de jaune d'œuf (EYPC). Néanmoins, des mesures par spectroscopie

de fluorescence, sensible au pH, montre que le composé amphiphile, présente une sélectivité anionique exposée aux vitesses de transport à travers les membranes vésiculaires selon l'ordre suivant : $V_{I^-} < V_{Br^-} < V_{Cl^-}$. Les ions Cl^- et Na^+ sont transportés à la même vitesse. Ce canal unimoléculaire est doté d'une capacité de transport du Na^+ équivalente à 36% de celle de la gramicidine A.

Enfin, au sein de notre laboratoire, des polymères en étoile amphiphiles ont été synthétisés³⁵, conçus de manière à former des canaux unimoléculaires (figure I-4).

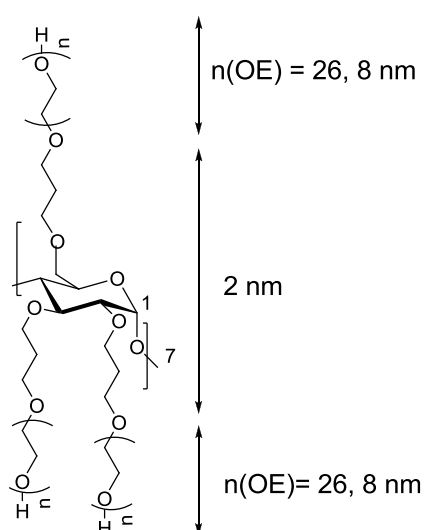


FIG. I.4 - Structure des polymères en étoile à 21 branches amphiphiles

La macromolécule est composée de 21 branches amphiphiles, composées chacune d'un groupement propyl-poly(oxyde d'éthylène) avec 26 unités oxiranes obtenu par polymérisation anionique. La synthèse de cette molécule sera discutée dans le paragraphe II.4.b concernant les polymères en étoile à cœur CD et à branches poly(oxyde d'éthylène). La taille totale de la molécule étirée est ainsi estimée à 18 nm, ce qui est très supérieure à la taille de la bicouche lipidique plane estimée à 4-6 nm. La technique d'électrophysiologie utilisée au laboratoire n'a pas permis de mettre en évidence la formation de canaux unimoléculaires, c'est pourquoi nous n'avons pas reporté cette molécule dans le tableau I-5. L'échec de l'insertion de ce polymère dans les membranes lipidiques peut être attribué à son architecture asymétrique et/ou à sa taille importante.

I.1.5. Techniques de caractérisation des pores et canaux membranaires

Au cours du paragraphe précédent, nous avons vu que la mise en évidence d'un canal fonctionnel, s'effectue grâce au développement de plusieurs techniques de caractérisation⁴⁰. Les spectroscopies RMN ^{23}Na et fluorescence dans les vésicules, ainsi que les expériences d'électrophysiologie dans les bicouches lipidiques planes sont des méthodes couramment utilisées par les chercheurs, et font l'objet de la discussion qui suit.

I.1.5.1. Spectroscopie RMN ^{23}Na

Cette technique utilise des vésicules lamellaires larges (LUV), à l'extérieur desquelles est ajouté un agent de déplacement paramagnétique (le dysprosium Dy^{3+}) qui complexe les ions Na^+ , ce qui permet de séparer les déplacements chimiques des ions Na^+ intra- et extra-vésiculaires (figure I-5)⁴¹⁻⁴⁵. En présence d'un canal synthétique, le flux de sodium à travers celui-ci se caractérise alors par un élargissement linéaire des pics, directement proportionnel à la vitesse du transport des ions Na^+ . Néanmoins, les canaux qui sont suffisamment larges pour laisser passer l'agent de déplacement, ne peuvent être caractérisés par cette méthode.

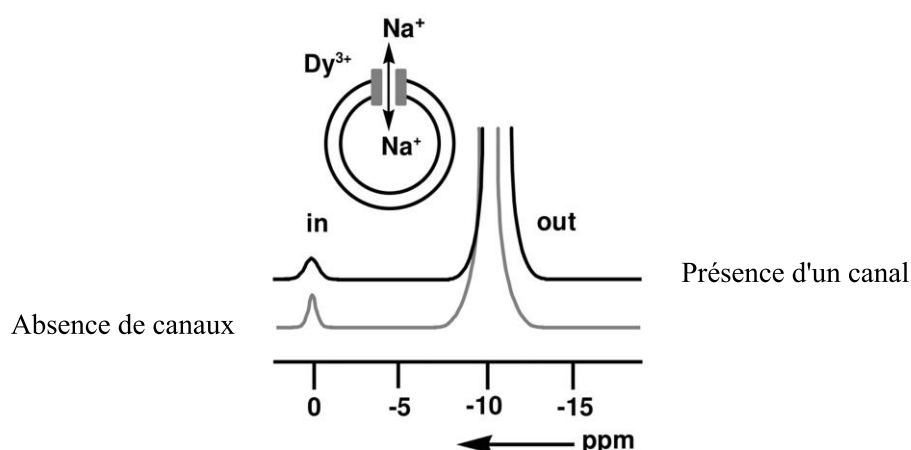


FIG. I.5 - Flux de sodium à travers les canaux ioniques
et conséquence sur le spectre RMN ^{23}Na

I.1.5.2. Spectroscopie de fluorescence

Cette méthode, très souvent utilisée pour caractériser les canaux ioniques ou les pores, utilise comme dans le cas précédent les vésicules lamellaires. Ces dernières sont marquées avec un ou plusieurs colorants fluorescents. Il existe des colorants qui sont insérés à l'intérieur de la vésicule (C_I), des colorants externes (C_E) et enfin d'autres qui peuvent être insérés dans la membrane (C_M), comme l'illustre la figure I-6, A.

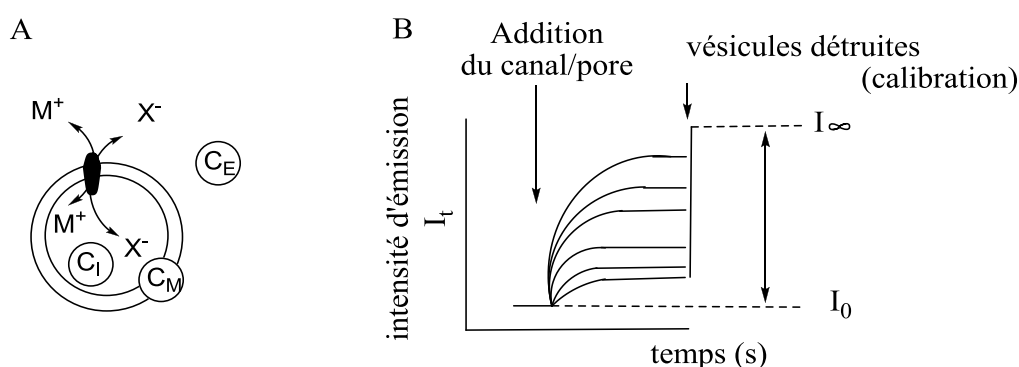


FIG. I.6 - A) Représentation schématique des flux ioniques en présence de colorants fluorescents et d'un canal ionique B) Analyse⁴⁰

De manière générale, les colorants membranaires sont principalement, mais pas uniquement, utilisés pour les études structurales; les sondes fluorescentes externes pour révéler des caractéristiques spécifiques (comme la sensibilité au voltage); enfin les plus couramment utilisés sont les colorants fluorescents internes, tels que le sel de 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium (HPTS), le 8-aminonaphtalene-1,3,6-trisulfonate (ANTS) ou le 5(6)-carboxyfluoresceine (CF), employés pour déterminer l'activité d'un canal⁴⁰.

Afin de déterminer l'activité du canal ionique synthétique, le changement de l'émission de fluorescence des colorants internes, en réponse à l'ajout de canaux ioniques synthétiques aux LUVs, est souvent mesuré en fonction du temps à différentes concentrations, comme illustré sur la figure I-6, B. La calibration se fait, en déterminant l'émission I_∞ du fluorophore libre à la fin de chaque expérience par l'addition d'un détergent comme le triton X-100.

De manière générale, aussi bien pour les bicouches planes ou vésiculaires, l'échec de la détection de l'activité ne signifie pas que le canal ionique ou le pore n'existe pas. Plus le

pore ou le colorant est sélectif, plus il est difficile d'étudier l'activité dans les LUVs. En d'autres termes, les canaux ioniques les plus intéressants sont les plus difficiles à détecter. Les essais avec le **HPTS** sont en général les premiers réalisés du fait de leur faible sélectivité⁴⁶⁻⁴⁸. Le HPTS est un fluorophore sensible au pH ($pK_a=7.3$) (figure I-7, A).

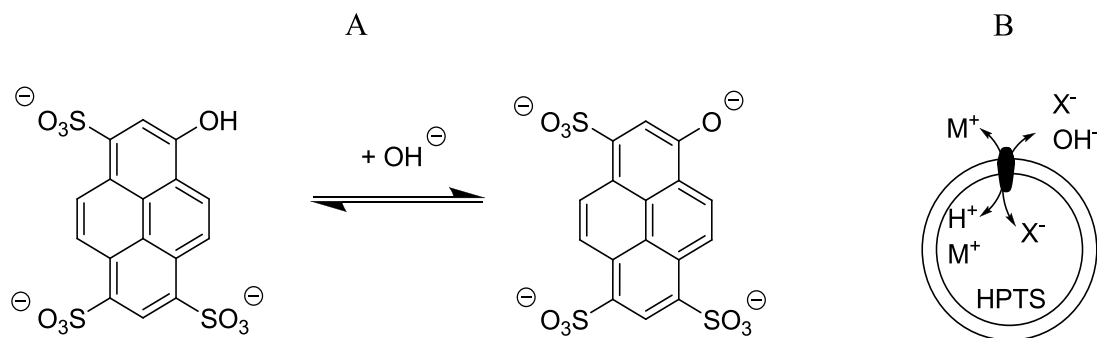


FIG. I.7 - A) Structure et déprotonation du composé fluorescent HPTS, pH dépendant
B) Représentation schématique des flux ionique en présence de HPTS intra vésiculaire et d'un canal membranaire⁴⁶⁻⁴⁷

A pH plutôt acide (pH=6), il devient fortement fluorescent, alors que c'est l'inverse qui se produit à des pH plus basiques. En d'autres termes, le niveau d'excitation du HPTS permet la détection des changements de pH dans la vésicule. L'activité des canaux ioniques synthétiques est déterminée, après introduction du colorant dans la vésicule, en suivant l'affaîssement d'un gradient de pH appliqué entre l'intérieur et l'extérieur du liposome. En réponse à cette impulsion externe, un canal synthétique peut accélérer l'augmentation du pH intra vésiculaire en facilitant l'efflux de proton ou l'influx d'ions OH⁻ (figure I-7, B). Une compensation de charge (par exemple un influx de cation pour un efflux de proton ou un efflux d'anion pour un influx d'OH⁻) est alors nécessaire par transport de type antiport, ce qui a pour conséquence une variation de pH et donc de la fluorescence de l'HPTS. Par ailleurs, le mouvement de paire d'ions unidirectionnel est osmotiquement défavorisé (symport OH⁻/ M⁺ ou X⁻/H⁺). Enfin, l'efficacité du transport est quantifiée par comparaison entre l'intensité de la fluorescence obtenue grâce à l'addition de la molécule d'intérêt et celle obtenue après disparition totale du gradient de pH (pH intérieur et extérieur de nouveau identiques).

Dans les essais avec le fluorophore **CF**, les LUVs sont chargées avec ces derniers à des concentrations assez élevées pour permettre leur agrégation et inhiber ainsi la

fluorescence⁴⁹ (figure I-8, A). En présence d'un canal, l'efflux de CF aboutit à la dilution du fluorophore, et donc la disparition des agrégats est détectée comme une augmentation de l'émission de fluorescence des CF.

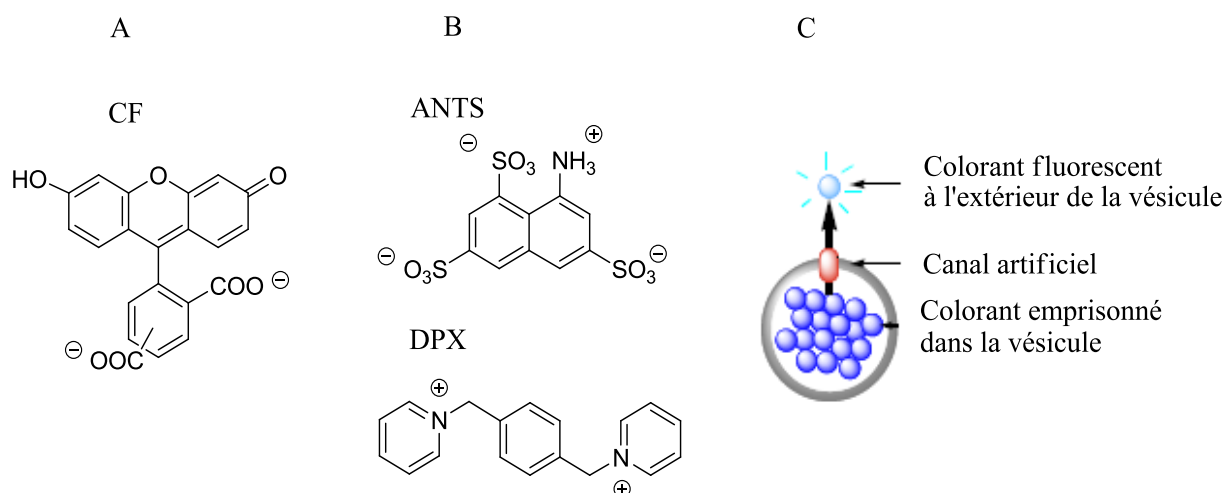


FIG. I.8 - Structure des composés fluorescents : A) CF⁴⁹ B) la paire ANTS/DPX⁵⁰

C) Représentation schématisée de l'augmentation de la fluorescence grâce à la fuite des colorants à travers le canal.

Dans les essais **ANTS/DPX**, le fluorophore ANTS est entravé dans les LUV_s en même temps que son inhibiteur⁵⁰, inhibant ainsi la fluorescence (figure I-8, B). En présence d'un pore assez large, l'efflux de HPTS aboutit à la dilution du fluorophore et donc la disparition des paires d'ions est détectée par une augmentation de l'émission de fluorescence de l'ANTS.

Enfin, contrairement aux molécules HPTS, qui sont entravées dans les vésicules, les fluorophores ANTS/DPX et CF sont sensibles aux diamètres du pore. Les canaux ioniques ou les pores de diamètres non suffisamment larges pour laisser passer ces fluorophores, ne peuvent être caractérisés par cette méthode.

Ainsi la spectroscopie de fluorescence permet d'accéder aux caractéristiques fonctionnelles des canaux ioniques ou pores étudiés⁴⁰ : la dépendance au pH (par le suivi de l'activité de canaux ioniques portant des charges acides ou basiques en fonction du pH), la dépendance au voltage (par polarisation membranaire et suivi de l'activité en fonction de la tension), et la sélectivité aux ions (par gradient de sel).

I.1.5.3. Electrophysiologie

La technique d'électrophysiologie consiste à mesurer les courants électriques à travers une bicouche lipidique plane⁴⁰. Le dispositif conventionnel (figure I-9) comporte deux compartiments, remplis chacun d'une solution aqueuse d'électrolytes, typiquement une solution de KCl 1M. Une différence de potentiel est appliquée entre les deux compartiments par l'intermédiaire de deux électrodes Ag/AgCl. La bicouche lipidique est formée dans un trou de faible diamètre ($\geq 150\mu\text{m}$) entre les deux compartiments, en déposant une bulle de lipide préalablement solubilisé dans du décane. La membrane ainsi produite, est suffisamment résistante pour permettre les études des canaux ioniques.

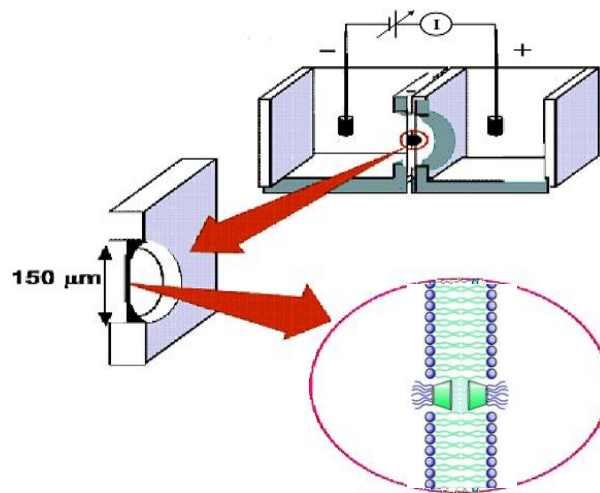


FIG. I.9 - Représentation schématique de la cellule de mesure comprenant deux compartiments séparés par un trou

Une bicouche lipidique plane agit comme un isolant : il en résulte que le passage des anions X^- et des cations M^+ à travers la bicouche lipidique est impossible. En présence d'un canal, les flux ioniques produisent, en réaction au potentiel appliqué, un signal discret d'une intensité comprise entre quelques pico et quelques nano ampères, comme indiqué sur la figure I-10(A). Si le courant ionique revient brusquement au niveau de celui de la membrane isolante, nous sommes irréfutablement en présence d'un pore unique.

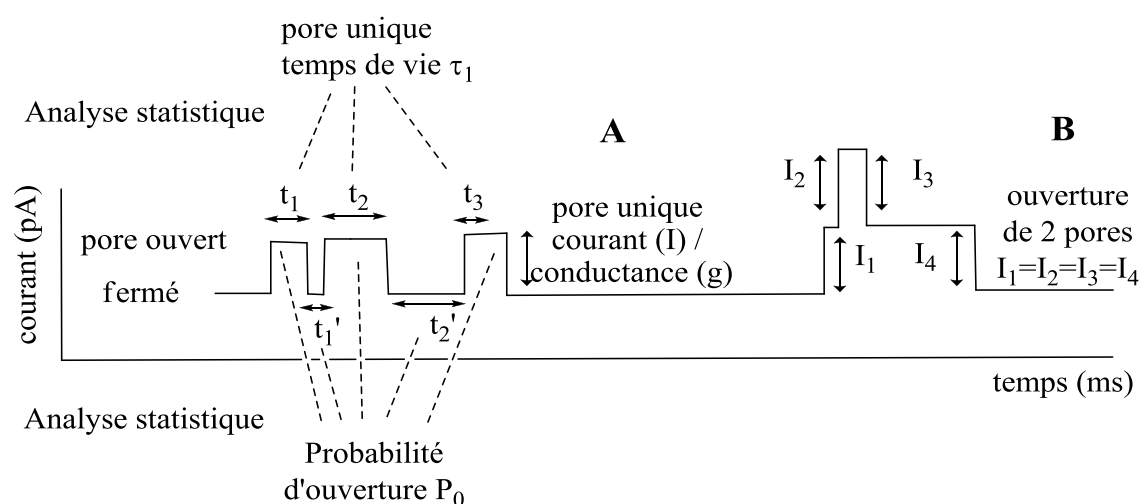


FIG. I.10 - Chromatogramme montrant le saut de courant sous l'effet de la formation du canal et le passage d'ions lors de l'application d'un potentiel positif ⁴⁰.

Les événements en intensité observés se produisent de manière aléatoire (analyse statistique) et sont caractéristiques des phénomènes de canaux obtenus à l'échelle unique. L'observation de deux ou plusieurs transitions de molécules uniques de même magnitude ($I_1=I_2=I_3=I_4$) est caractéristique de l'ouverture simultanée de deux pores identiques (figure I-10, B). Les paramètres clés obtenus lors de ces mesures électriques sont la conductance du pore g (résistance $R = 1/g$), le temps de vie τ_1 (somme des temps d'ouverture du pore), et la probabilité d'ouverture P_0 (temps de vie du pore sur le temps de l'expérience) d'un canal ionique unique.

La conductance g informe sur la facilité pour les canaux ou les pores à transporter les ions et est liée au diamètre apparent d du pore selon l'équation de Hill :

$$\frac{1}{g} = \frac{l\rho}{[\pi(d/2)^2]} + \frac{\rho}{d} \quad (1)$$

g = conductance du canal unique ; l = longueur du canal ; ρ = résistivité de la solution d'enregistrement (pour KCl 1M=0,0894 $\Omega.m$) ; d = diamètre du pore

Il est admis que le temps de vie est le temps « moyen » qu'un canal reste ouvert. De plus, le temps de vie du canal unique révèle sa stabilité thermodynamique. Des valeurs typiques des temps de vie sont de l'ordre de la milliseconde pour les canaux synthétiques, et sporadiquement de l'ordre de la seconde.

La probabilité de détecter des canaux ioniques ouverts P_0 et la dépendance de la concentration en monomère est directement liée au mécanisme de formation du pore.

Ainsi, la loi de Hill décrit la dépendance de l'activité d'un pore à la concentration en monomère :

$$\text{Log } Y = n \log C_M - n \log K_D \quad (2)$$

Y = activité fractionnelle ; C_M = concentration en monomère ; n = coefficient de Hill,
 K_D = constante de dissociation des macromolécules

De manière générale, lorsque le coefficient de Hill n est supérieure à 1 (faible probabilité d'ouverture P_o), cela signifie que le canal formé est bimoléculaire, tandis que pour $n=1$, le canal est monomoléculaire.

Enfin, si le diamètre du pore est suffisant, cette technique permet de détecter le passage non seulement des ions, mais aussi de molécules, voir même de polymères.

Ainsi, l'électrophysiologie est une méthode très sensible, permettant d'étudier les canaux à l'échelle unique, et de remonter aux caractéristiques suivantes : le diamètre du pore (Loi de Hill 1) ou le nombre de molécules qui constituent le canal (Loi de Hill 2), mais aussi les caractéristiques citées pour la spectroscopie de fluorescence à savoir : la dépendance au pH, à la tension, et la sélectivité aux ions. Notons que la détection du canal à l'échelle unique permet de montrer de manière certaine, grâce à des agents bloquants des canaux ioniques, que nous sommes bien en présence d'ionophores formateurs de canaux et non pas d'ionophores transporteurs.

I.1.5.4. Conclusion et choix de la technique de caractérisation

Ainsi trois méthodes sont couramment utilisées par les chercheurs pour caractériser les canaux ioniques. La spectroscopie de fluorescence avec marquage de vésicules lamellaires larges (LUVs) peut apporter des informations sur l'influx ou l'efflux d'ions et de molécules à travers les canaux ioniques, ainsi que sur leurs structures, dépendant des colorants fluorescents utilisés. Les expériences vésiculaires ont l'avantage de ne pas requérir d'équipement spécial. Ils fournissent une vue d'ensemble globale des activités et sont suffisants pour identifier la plupart des caractéristiques clés. L'électrophysiologie demande une dextérité spécifique et coûte du temps. De plus, de fréquents artefacts nécessitent des contrôles et des interprétations prudentes des résultats. Cependant,

l'électrophysiologie est une méthode très sensible, présentant l'avantage de pouvoir montrer la présence d'un canal à l'échelle unique, permettant d'accéder à des aperçus mécanistiques plus approfondis que par spectroscopie. Enfin, nous avons vu que la méthode d'électrophysiologie permet de déterminer le diamètre du pore, le nombre de molécules qui constituent le canal ou le pore et enfin elle détecte le passage de différents ions, mais aussi de macromolécules. C'est pourquoi, nous avons fait le choix de cette technique au sein de notre laboratoire, afin d'étudier les caractéristiques des canaux artificiels à base de cyclodextrines sélectivement modifiées.

I.2. Modifications sélectives des α , β et γ -cyclodextrines

Nous avons décrit différentes familles de cyclodextrines amphiphiles permettant l'obtention de canaux membranaires. Ces molécules sont obtenues grâce à des modifications chimiques des cyclodextrines natives.

I.2.1. Architectures moléculaires à base de cyclodextrine

Les familles de molécules amphiphiles se distinguent selon la ou les positions persubstituées (figure I-11).

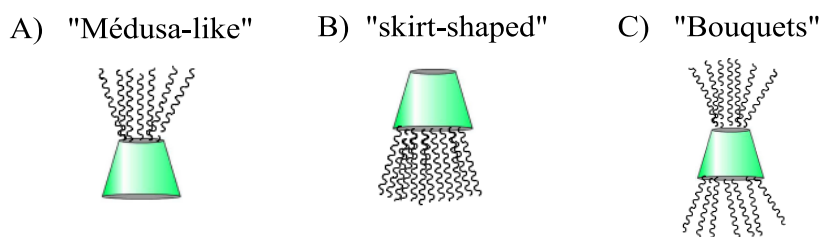


FIG. I.11 - Représentation des familles de cyclodextrines amphiphiles

- Les "médusa-like" : persubstitution sur la face primaire (en 6)⁵¹
- Les "skirt-shaped" : persubstitution sur la face secondaire (en 2 et 3)⁵²
- La persubstitution sur toutes les positions (2, 3 et 6)⁵³
- Les "molécules bouquets" : Persubstitution en 2 et en 6⁵⁴

Pour obtenir ces architectures, des modifications sélectives sur la cyclodextrine doivent être entreprises, sujet du paragraphe suivant.

I.2.2. Stratégies de modification

La difficulté des modifications sélectives provient principalement du grand nombre de fonctions hydroxyle portées par la CD (18 pour l' α -CD, 21 pour la β -CD, 24 pour la γ -CD), ainsi que de leur différence de réactivité⁵⁴. En milieu faiblement basique, les

fonctions hydroxyle en position 6 de classe primaire, sont plus réactives que les fonctions hydroxyle secondaires en position 2 et 3. En outre, celles de la position 3, à l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine, sont les moins accessibles. En présence d'une base forte, l'ordre de réactivité est inversé, et les fonctions hydroxyles, les plus acides, engendrent des alcoolates très réactifs. Des modifications sélectives sont donc possibles grâce à la différence de réactivité des fonctions hydroxyle qui, cependant, rendent difficile l'obtention de CDs sélectivement modifiées avec un haut degré de pureté et de bons rendements. Malgré ces obstacles, un très grand nombre de publications⁵⁴ traite des méthodes de substitution possibles. Les principaux types de modification chimique des groupes hydroxyle sont décrits sur la figure I-12.

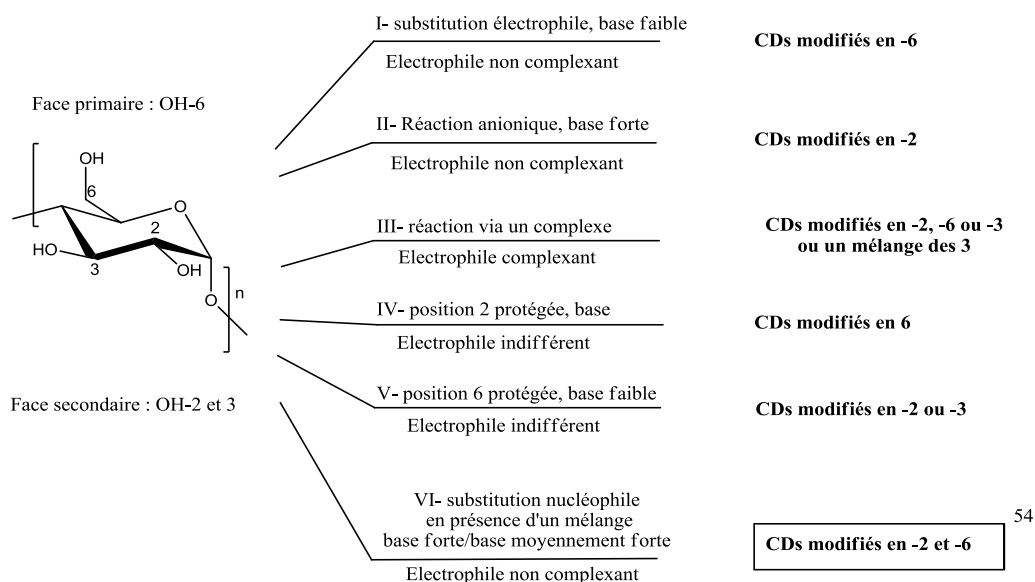


FIG. I.12 - Présentation générale des méthodes de modifications chimiques des CDs⁵⁴

La méthode la plus délicate est certainement la modification sélective en 2,6⁵⁴, qui permet notamment d'obtenir des composés possédant 7 groupements alkyle de part et d'autre du cône tronqué de la cyclodextrine. Cependant, cette catégorie est peu décrite dans la littérature, car ce type de modifications est complexe. En effet, il engendre des produits de degré de substitution variable, uniquement séparables par des techniques de purification complexes. Pour illustrer ces modifications sélectives, nous allons développer dans la partie qui suit les permodifications des fonctions hydroxyle en position 2,6, reportées dans la littérature.

I.2.3. Permodification des fonctions hydroxyle en positions 2, 6 en une étape

Nous avons répertorié de manière exhaustive les réactions d'estérification et d'éthérification en positions 2 et 6 des molécules α , β et γ -CDs, par une synthèse en une étape (figure I-12, VI).

I.2.3.1. Estérification

Les seuls exemples de réaction d'estérification, rapportés par la littérature, sont ceux qui permettent l'obtention de dérivés diacylés⁵⁵ comme les per (2,6-di-O-pivaloyl)- α -CD synthétisés par réaction des CDs natives avec le chlorure de pivaloyl dans la pyridine durant 24h (figure I-13). Cette réaction est sélective du fait de l'encombrement des groupements pivaloyl.

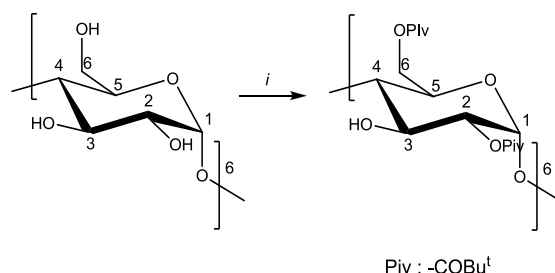


FIG. I.13 - Réaction de pivaloylation sélective en 2, 6⁵⁰ (i) Me₃CCOCl, Pyridine, 24h.

I.2.3.2. Ethérification

I.2.3.2.1. Silylation sélective : per (2,6-di-O-TBDMS)- α , β , γ -cyclodextrine

Les cyclodextrines peuvent être sélectivement « silylées » sur toutes les positions 2 et 6, en affectant que très peu les positions 3, grâce à la faible réactivité de l'halogénure d'alkyle encombré employé, le tert-Butylchlorodimethylsilane (TBDMSCl)^{56,57}. Une fois les per (2,6-di-O-TBDMS)- α , β , γ -CD synthétisées, il est possible de les faire réagir avec des halogénures de benzyle ou d'alkyle dans des conditions basiques fortes pour former les dérivés per (2-O-alkyle-3,6-di-O-silyl)- α , β , γ -CD⁵¹.

I.2.3.2.2. Alkylation sélective : per (2,6-di-O-alkyl)-cyclodextrine

Une procédure directe permet l'obtention de dérivés per(2,6-di-O-alkyl)-CDs. Elle consiste à tirer profit de la plus grande réactivité des fonctions hydroxyle en positions 2 et 6 vis-à-vis des fonctions hydroxyle en position 3. De manière générale, la cyclodextrine est traitée avec de l'hydroxyde de sodium ou de baryum, et un halogénure d'alkyle dans du DMSO ou un mélange DMSO/DMF pour aboutir à l'obtention de la per(2,6-di-O-alkyl)-CD. La littérature rapporte la préparation d'un grand nombre de dialkylcyclodextrines allant de la diméthyl-CD jusqu'à la *n*-octyl-CD⁵⁸⁻⁶⁵. Le tableau I-6 rapporte les cas des dérivés per(2,6-di-O-alkyl) isolés par élution sur une colonne chromatographique, sauf dans le cas du dérivé octylé dont le protocole de synthèse et le rendement ne sont pas communiqués.

Nom	Groupements alkyle	Rdt	Réf
per (2,6-di-O-méthyl)- α -CD	-CH ₃	13%	59
per (2,6-di-O-éthyl)- β -CD	-CH ₂ -CH ₃	20%	59,62
per (2,6-di-O-butyl)- β -CD	-(CH ₂) ₃ -CH ₃	40%	64
per (2,6-di-O-isopentyl)- β , γ -CD	-(CH ₂) ₃ -(CH ₃) ₂	26%	64
per (2,6-di-O-pentyl)- β -CD	-(CH ₂) ₄ -CH ₃	43%	64
per (2,6-di-O-octyl)- β -CD	-(CH ₂) ₇ -CH ₃	NC	63
per (2,6-di-O-benzyl)- β -CD	-CH ₂ -C ₆ H ₆	29%	37
per (2,6-di-O-allyl)- β -CD	-CH ₂ -CH=CH ₂	36%-17%	58,64,65

Tableau I-6 : Composés per(2,6-di-O-alkyl)-CDs rapportés dans la littérature⁵⁸⁻⁶⁵

Comme le suggère Bansal⁶⁴, de manière générale, les produits obtenus après purification sur colonne chromatographique sont en réalité des mélanges de composés de degrés de substitutions variables, ce qui montre la faible sélectivité de la réaction d'alkylation, que nous avons vérifié dans le cas de l'allylation.

Le composé per(2,6-di-*O*-allyl)- β -CD présente l'avantage de posséder des extrémités insaturées réactives permettant des modifications ultérieures. En 1976, Bergeron et al.⁵⁷ décrivent pour la première fois la synthèse de la per (2,6-di-*O*-allyl)- β -CD (figure I-14).

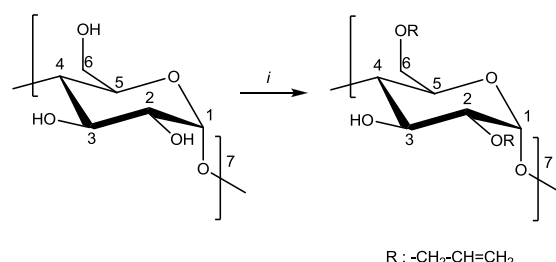


FIG. I.14 - Méthode de synthèse de la per (2,6-di-*O*-allyl)- β -CD (i) BaO/ Ba(OH)₂, Br-allyl, DMF/DMSO ⁵⁷

La réaction consiste à faire réagir la β -CD native avec une suspension de BaO/ Ba(OH)₂, bromure d'allyle dans un mélange DMF/DMSO, durant 48h. Après une purification sur colonne chromatographique, la structure du composé est déterminée par spectroscopie RMN et IR, et celui-ci est attribué à la per(2,6-di-*O*-allyl)- β -CD, avec un rendement de 71%.

Quelques décennies plus tard, et avec de nouvelles techniques de caractérisation, comme la spectrométrie de masse, Bansal et al.⁶⁴ ont montré que le produit final obtenu selon la méthode de Bergeron (avec des temps de réaction de 92h) est en réalité un mélange de composés avec des degrés de substitutions variables. Cette réaction est de nouveau adaptée par Stoddart et al.⁶⁵, qui ont proposé des temps de réaction de 20h, et ont obtenu le produit désiré pur avec un rendement de seulement 17%. Dans les deux cas, les auteurs font état de la faible sélectivité de la réaction, de la complexité des purifications, des faibles rendements obtenus à l'issue de ces derniers et de la combinaison indispensable de la spectroscopie RMN et de la spectrométrie de masse pour une bonne appréciation du degré de pureté.

Les composés per(2,6-di-*O*-alkyl)-CDs ont été obtenus pour la plupart en une étape et ont abouti à des mélanges de produits. Le cas des per(2,6-di-*O*-méthyl)- α , β , γ -CDs est intéressant, car il a été très largement étudié et la littérature rapporte 2 méthodes de synthèse supplémentaires pour l'obtention de ce composé.

I.2.4. Méthodes de synthèse des per(2,6-méthyl)- α,β,γ -CDs

Nous avons vu que la méthode en une étape proposée par Takeo et al.⁶⁶ a abouti à la per(2,6-di-O-méthyl)- α -CD avec un rendement de 13%.

I.2.4.1. Dérivatisation à fin de purification

La première alternative à la méthode originelle est proposée également par Takeo et al.⁶⁶, et a pour but d'améliorer la pureté des produits et le rendement de la réaction, par une synthèse la plus courte possible, exploitant pour cela les connaissances en chimie de la CD. La synthèse des per(2,6-di-O-méthyl)- α, β, γ -CDs, obtenus par cette méthode est décrite selon le schéma réactionnel présenté sur la figure I-15.

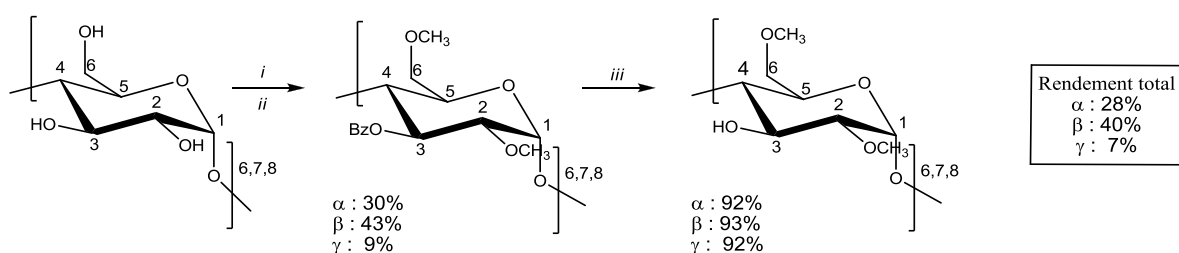


FIG. I.15 - Méthode améliorée de synthèse des per(2,6-di-O-méthyl)- α, β, γ -CDs⁶⁶ (i)

BaO, Ba(OH)₂, MeI, DMF, de 3 à 5h, Tamb, (ii) NaH, BzBr, DMF, 1h30, Tamb

(iii) MeOH/ acide acétique, 10% Pd/C, 2h, Tamb

La synthèse est composée de 3 étapes :

(i) la méthylation des fonctions hydroxyle en positions 2 et 6 suivie d'une recristallisation ou d'une colonne chromatographique, qui conduit à un mélange de produits de degré de substitution variable (ii) la benzoylation des mélanges précédents (iii) et enfin la déprotection des groupements benzyle.

Les produits per (2,6-di-O-méthyl)- α, β, γ -CDs sont obtenus avec des rendements totaux de 28%, 40% et 7% respectivement. La benzoylation est donc menée à des fins de purification mais aboutit finalement à des rendements faibles pour le dérivé γ -CD

I.2.4.2. Synthèse multi-étape

La seconde méthode consiste à réaliser une série d'étapes de protection et de déprotection afin de modifier sélectivement les fonctions hydroxyle en positions 2 et 6. Le schéma réactionnel de la synthèse des per(2,6-di-O-méthyl)- α , β -CDs proposé par Takeo et al.⁶⁷, est reporté sur la figure I-16.

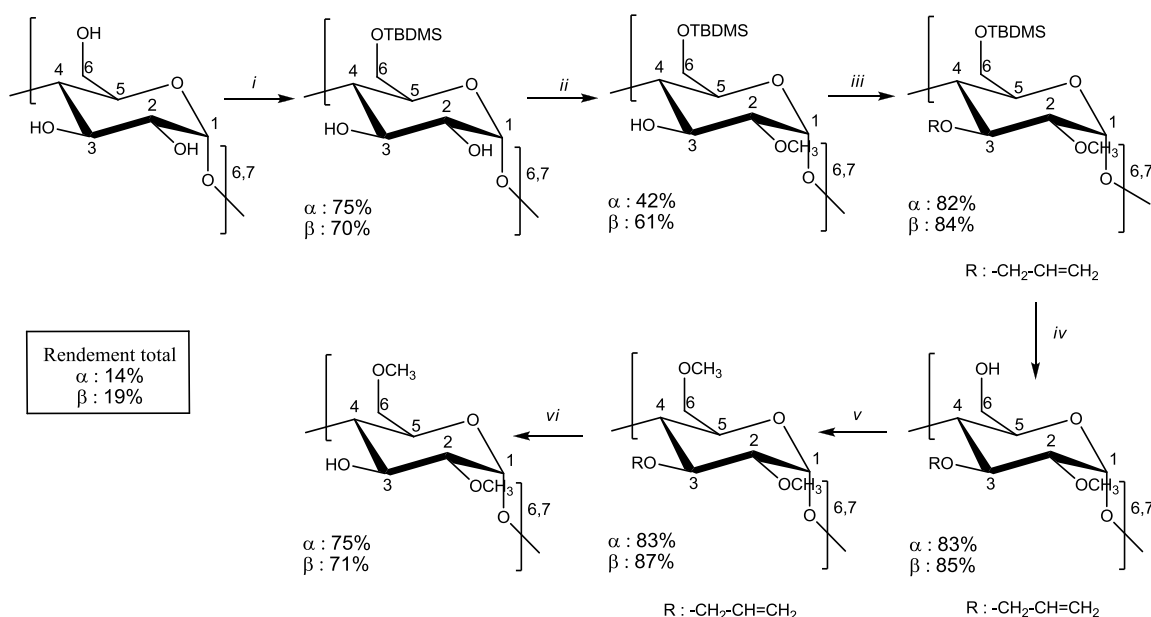


FIG. I.16 - Méthode de synthèse des per(2,6-di-O-méthyl)-(α , β)-CDs⁶⁷ : (i) TBDMSCl, DMF/Imidazole, 30 min, Tamb (ii) MeI, BaO, Ba(OH)₂, DMF (iii) oxolane/DMF, NaH, bromure d'allyle (iv) TBAF dans oxolane (v) DMF, NaH, MeI (vi) tris(triphenylphosphine)rhodium(I), 1,4-diazabicyclo[2.2.2]-octane.

Les dérivés sont obtenus selon les étapes suivantes :

(i) protection des fonctions hydroxyle en position 6, avec des groupements silyle, (ii) méthylation des fonctions hydroxyle en position 2, (iii) allylation des fonctions hydroxyle en position 3, (iv) désilylation, (v) méthylation des fonctions hydroxyle en position 6 et enfin (vi) déallylation.

Les composés per (2,6-di-O-méthyl)- α , β -CDs sont obtenus en 6 étapes et suite à 6 colonnes chromatographiques de réalisation fastidieuse avec des rendements finaux faibles : 14% (α) et 19% (β), comparés aux rendements élevés obtenus à chacune des étapes de la synthèse.

Par ailleurs, les dérivés γ -CDs ont été modifiés par une série de protection et déprotection, qui diffèrent cependant du cas précédent, notamment par sa première étape de protection. Le schéma réactionnel est proposé par Ashton et al.⁵⁷ et reporté sur la figure I-17.

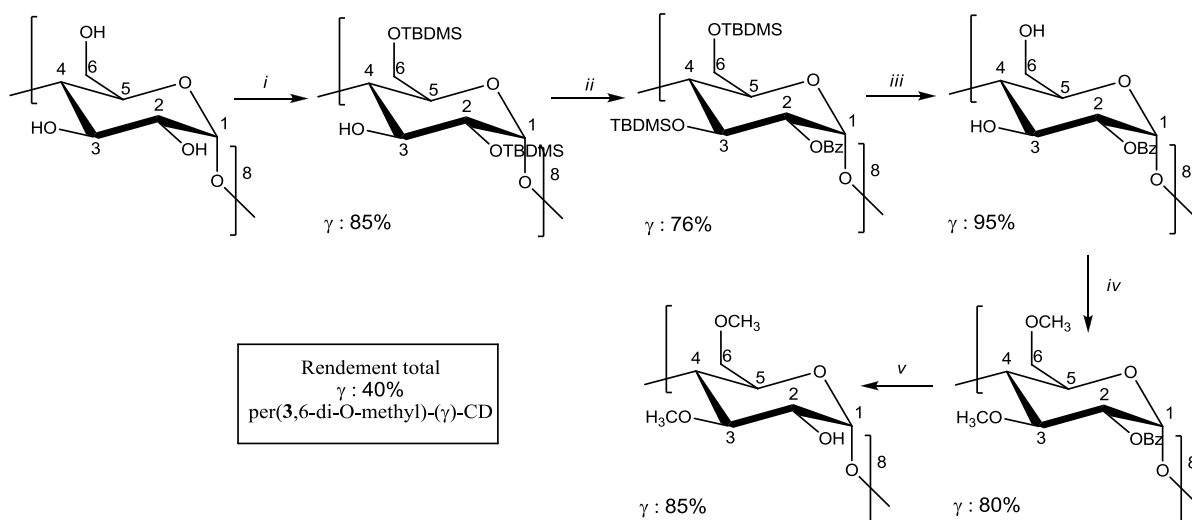


FIG. I.17 - Méthode de synthèse des per(3,6-di-O-méthyl)-(γ)-CDs⁵⁷ (i) TBDMSCl, DMAP, DMF/pyridine, 18 h, 100°C (ii) BzBr, MeI, THF, 19h, reflux (iii) Bu₄NF, THF, Tamb, 20h (iv) NaH, THF, MeI, 13h, reflux (v) MeOH, 10% Pd/C, 2h, Tamb.

L'obtention de ces composés se fait selon les étapes suivantes :

(i) protection des fonctions hydroxyle en positions 2 et 6, avec des groupements silyle, (ii) benzylation des fonctions hydroxyle OH-2, (iii) déprotection, (iv) méthylation des fonctions hydroxyle en position 3, 6 et enfin (v) débenzylation.

Après 5 étapes et autant de colonnes chromatographiques, le composé final obtenu est en réalité la **per (3,6-di-O-méthyl)-γ-CD**, avec un rendement de 40%. Le produit obtenu a été méthylé en position 3 et non pas en position 2, comme attendu. En effet, il a été montré⁵⁶ que sous des conditions basiques, la benzylation des composés per(2,6-di-O-tert-butylmethylsilyl)-γ-CD a lieu en même temps que la migration des groupements *tert*-butylmethylsilyl de la position 2 à la position 3 offrant ainsi le dérivé per(2-O-benzyl-3,6-di-O-tert-butylmethylsilyl)-γ-CD. Par cette méthode, le nombre d'étapes et de purification est très important.

I.2.5. Conclusion sur les modes de synthèse

Le tableau I-7 récapitule les caractéristiques des synthèses (nombre d'étapes, de colonnes chromatographiques ou de recristallisations, rendement total) selon la méthode utilisée (originelle ou alternative) des différents dérivés per(2,6-di-O-alkyl)-CDs rapportés dans la littérature.

	Nombre d'étapes ; Nombre de recristallisation et/ou de colonnes chromatographiques ; Rendement total (%)			Réf
1 étape	per(2,6-di-O-ALKYL)-β-CD			65 65 65 37 58 64 65
	1 étape, 1 colonne chromatographique			
	BUTYLE : <u>40%</u> (mélange de 5 produits)			
	PENTYLE : <u>26%</u> (mélange de 4 produits)			
	ISOPENTYLE : <u>43%</u> (mélange de 3 produits)			
	BENZYLE : <u>29%</u>			
	ALLYLE : <u>71 %</u> <u>36%</u> (mélange de 5 produits) <u>17%</u>			
1 étape	per(2,6-di-O-méthyl)-α-CD	per(2,6-di-O-méthyl)-β-CD	per(2,6-di-O-méthyl)-γ-CD	66
	1 étape, 1 recristallisation, 1colonne chromatographique <u>13%</u>	-	-	
Dérivati-sation	3 étapes, 1 recristallisation, 2 colonnes chromatographiques <u>28%</u>	3 étapes, 1 recristallisation, 2 colonnes chromatographiques <u>40%</u>	3 étapes, 3 colonnes chromatographiques <u>7%</u>	66
Multi-étape	6 étapes, 6 colonnes chromatographiques <u>14%</u>	6 étapes, 6 colonnes chromatographiques <u>19%</u>	5 étapes, 5 colonnes chromatographiques <u>42%</u> per(3,6-di-O-méthyl)-(γ)-CD	α :67 β : 67 γ :57

Tableau I-7 : Méthode originelle et méthodes alternatives de la synthèse des per(2,6-di-O-alkyl)-CDs

Ainsi, d'après le tableau précédent, trois méthodes peuvent être envisagées pour synthétiser des per(2,6-di-O-alkyl)- β -CDs. La méthode originelle conduit généralement à des mélanges de produits de degré de substitutions variables. La première méthode alternative mise en place pour augmenter le rendement et le degré de pureté du produit

final convient peu aux dérivés γ -CDs, obtenu avec 7% de rendement. La seconde méthode demande un très grand nombre d'étapes, autant de colonnes chromatographiques et a un coût élevé, pour obtenir finalement des rendements de 14% et 19% pour les dérivés α - et β -CDs. C'est pourquoi la méthode originelle, en une seule étape, reste la méthode de choix pour la plupart des synthèses de per(2,6-di-O-alkyl)-CDs, comme l'indique le nombre important de dérivés obtenus par cette méthode. Cependant, cette dernière doit être impérativement améliorée afin d'obtenir des produits parfaitement purs et avec de bons rendements pour les applications envisagées. Elle doit également être adaptée aux trois cyclodextrines (α -, β -, γ -CDs), ce qui n'est généralement pas le cas. Par exemple, les dérivés per(2,6-di-O-allyl)-CDs n'ont été que très peu étudié sur les composés β -CD et jamais sur les α - et γ -CDs.

I.2.6. Polymères à cœur cyclodextrine et à branches poly(oxyde d'éthylène)

Nous avons vu la synthèse de cyclodextrines modifiées qui peuvent servir d'amorceur à l'obtention de macromolécules à branches POE. Il convient donc de rappeler les principales méthodes de synthèses des polymères en étoile à coeur cyclodextrine et à branches POE.

I.2.6.1. Méthode convergente

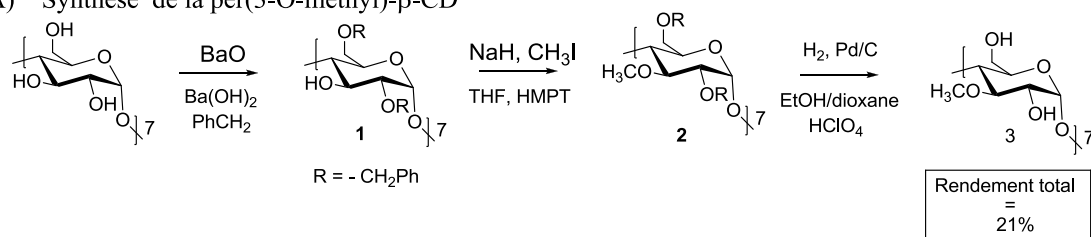
Initialement, Lehn et al.³⁷ ont synthétisé des molécules « bouquets », de structure symétrique et parfaitement définie. Ces composés ont été obtenus par greffage d'un nombre équivalent de chaînes poly(oxyde d'éthylène) modifiées de part et d'autre du cône tronqué de la cyclodextrine perméthylée en position 3 (figure I-18, molécule **13**). Les schémas réactionnels de l'obtention de la per(3-O-méthyl)- β -CD, des greffons, ainsi que la condensation de ces derniers, sont décrits respectivement sur la figure I-18 A, B et C.

La synthèse de la per(3-O-méthyl)- β -CD (**3**) consiste initialement à « benzyler » sélectivement les fonctions hydroxyle en positions 2 et 3 (**1**, 29%), puis à méthyler la fonction 3 (**2**, 75%), et enfin à déprotéger les groupements benzyle par hydrogénolyse (100%). Le produit final (**3**) est obtenu avec un rendement total de 21%.

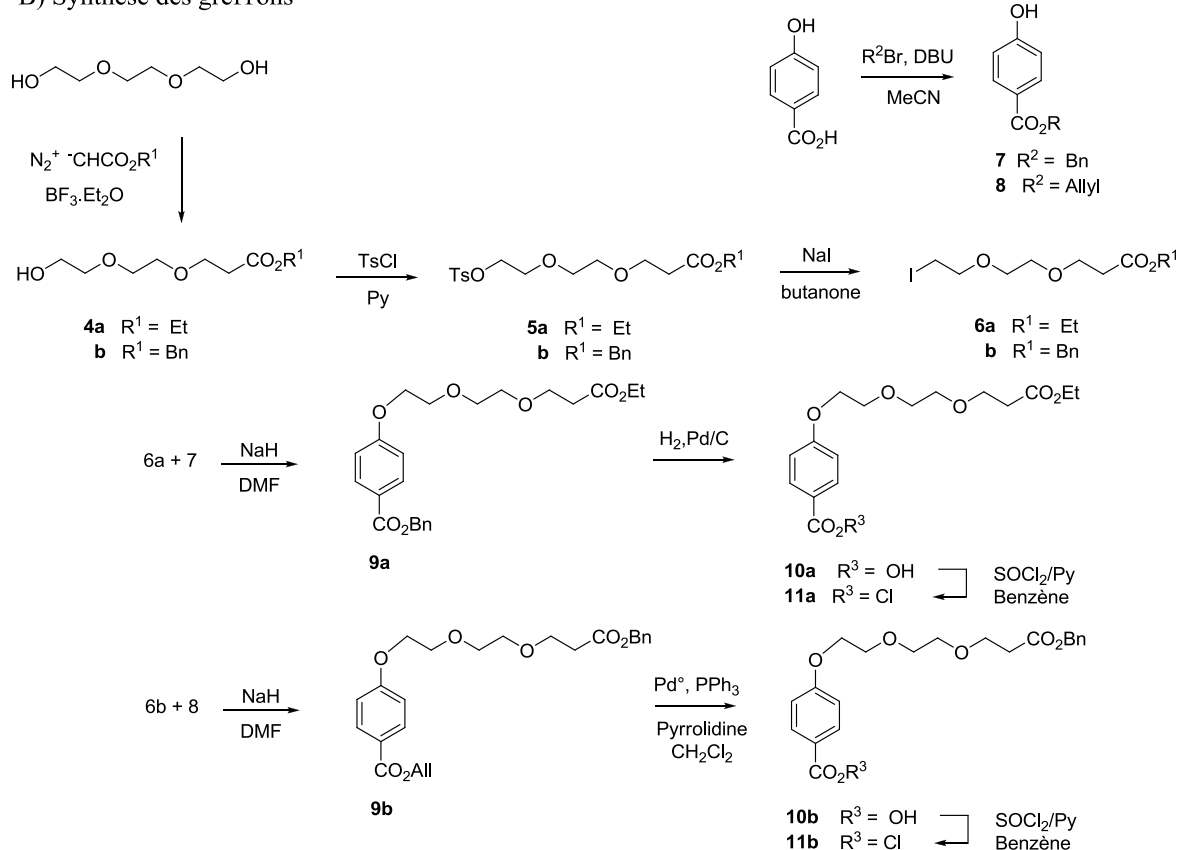
La synthèse des greffons se fait en plusieurs étapes (figure I-18, B). Tout d'abord, la réaction consiste à faire réagir des éthyles ou benzyles diazoacétates avec du triéthylèneglycol afin de former les éthyles et benzyles hydroesters **4a** et **4b**, respectivement. Ces derniers sont alors transformés via le (tosyloxy)ester correspondant **5** en iodoesters **6a** et **6b**, respectivement. Les halogénoesters **6a** et **6b** ont été condensés avec le 4-hydroxybenzoate **7** et **8** pour aboutir aux diesters **9a** et **9b** qui permettent d'obtenir respectivement par hydrogénolyse ou par isomérisation catalytique les acides désirés **10** correspondants.

Enfin, les per-estérifications des dérivés per(3-O-méthyl)- β -CD (**3**) par des réactions répétitives avec les chlorures d'acyles **11** ont permis d'obtenir les molécules **12** (figure I-18, C). Par ailleurs, le composé **13** est obtenu par hydrogénolyse du tétradécaéthyle ester **12b**.

A) Synthèse de la per(3-O-méthyl)- β -CD



B) Synthèse des greffons



C) Greffage et obtention des molécules "bouquets"

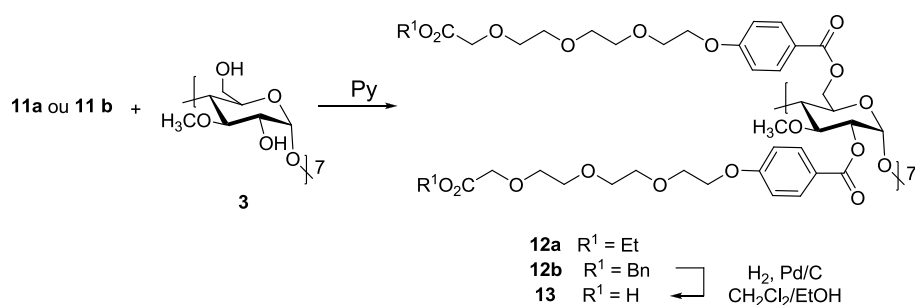


FIG. I.18 - Synthèse³⁷ A) de la per(3-O-méthyl)- β -CD et B) des greffons (C) et des molécules « bouquets » (i) acyl chloride, per(3-O-méthyl)- β -CD, 4-(diméthylamino)pyridine, pyridine, 7 jours, 60°C.

Malgré l'aspect structurel qui permet d'obtenir des polymères en étoile bien définis, la méthode convergente proposée ici requiert un très grand nombre d'étapes et aboutit à une faible production. Une alternative à cette méthode est la polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène sur des cyclodextrines ou des dérivés de CD, qui fait l'objet de la discussion qui suit.

I.2.6.2. Méthode divergente

Afin d'obtenir des polymères en étoile à cœur cyclodextrine, une nouvelle approche a été proposée pour la première fois en 1995 par Topchieva et al.⁶⁸. La polymérisation anionique d'oxyde d'éthylène sur des cyclodextrines natives initiée par ces auteurs et améliorée au sein de notre laboratoire^{34,35}, a permis d'obtenir des polymères en étoile à 21 branches (**1**), comme reportés sur la figure I-19 (voie 1). Cependant les résultats obtenus n'ont pas permis de statuer sur les positions modifiées des cyclodextrines.

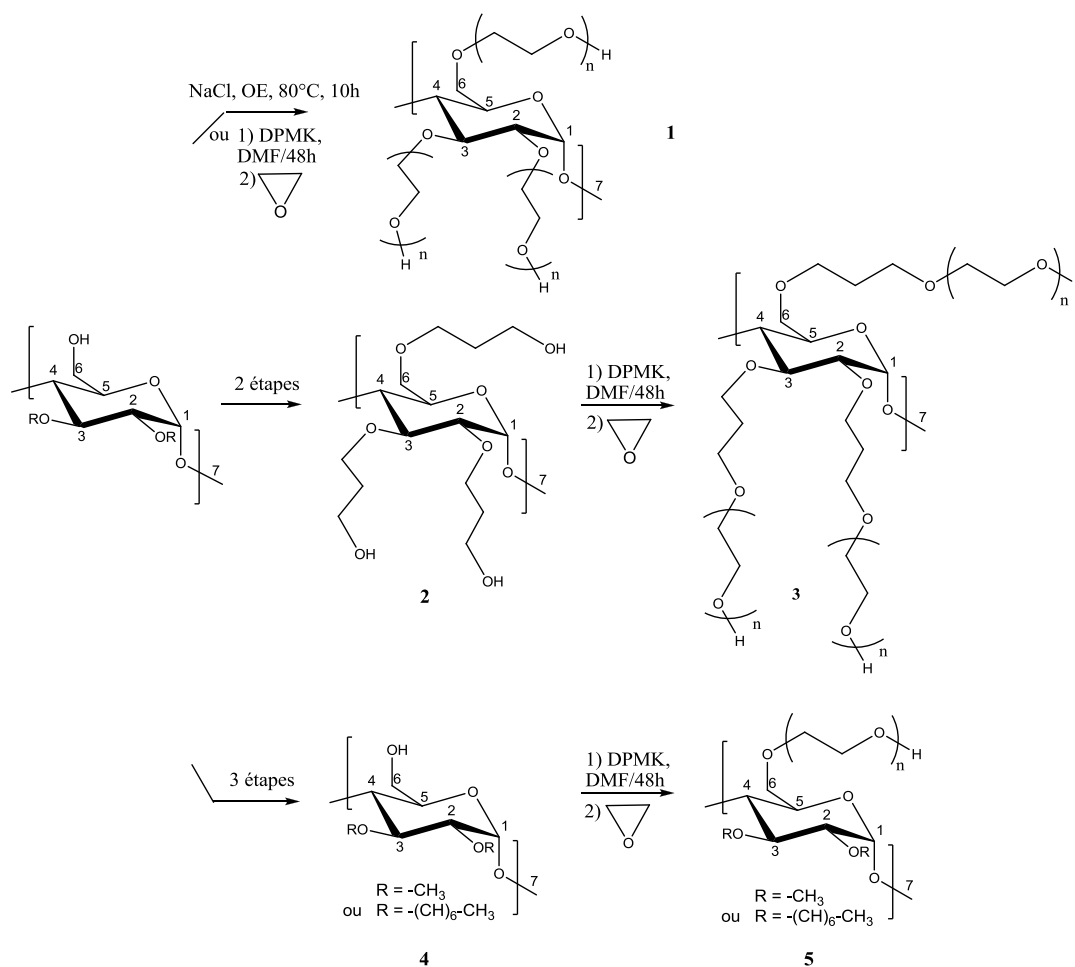


FIG. I.19 - Polymérisation anionique d'oxyde d'éthylène à partir de dérivés de cyclodextrines^{34,35,67, 69}

Afin d'obtenir un contrôle du nombre de branches par CD, il est important de synthétiser des amorceurs possédant des fonctions hydroxyle de réactivité comparables, ce qui n'est pas le cas des fonctions hydroxyle des unités glucopyranose de la CD. C'est pourquoi des modifications chimiques de cyclodextrines ont été entreprises de manière à générer des fonctions hydroxyle de réactivité semblable⁷² et ont permis d'obtenir notamment le per(2,3,6-tri-O-hydroxypropyl)- β -CD (**2**). Les stratégies de synthèse développées permettent également d'introduire à convenance des fonctions hydrophobes^{34,35}, comme dans le cas des amorceurs per(2,3-di-O-méthyl)- β -CD et per(2,3-di-O-heptyl)- β -CD (**4**). Il a été démontré^{34,35} que la polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène amorcée par ces dérivés est obtenue en utilisant un défaut d'agent déprotonant. Dans ces conditions de synthèse, la polymérisation est contrôlée, et le nombre de branches par polymère en étoile correspond à celui escompté. Ainsi des polymères en étoile à 21 branches (**3**) et 7 branches (**5**) ont été obtenus à partir des amorceurs **2** et **4**.

Au sein de notre laboratoire, les chercheurs ont démontré que ces polymérisations sont vivantes et les polymères ainsi obtenus présentent 7 ou 21 branches de POE par CD, ce qui permet de mettre en évidence la versatilité de cette approche de synthèse. Il convient donc d'étudier plus en détails la polymérisation anionique des oxiranes afin d'optimiser les synthèses envisagées.

I.3. Polymérisation anionique des oxiranes

La polymérisation anionique offre à la fois d'énormes opportunités tout en étant un véritable défi pour les chimistes. L'intérêt d'une telle polymérisation est de permettre dans certaines conditions :

- Le contrôle de la masse molaire,
- Une faible polymolécularité des polymères obtenus,
- La possibilité de préparer des copolymères à blocs et de fonctionnaliser l'extrémité active.

C'est donc un moyen très efficace d'obtenir de nouveaux matériaux avec une architecture parfaitement contrôlée et des fonctions spécifiques. Les difficultés de ce type de polymérisation sont dues aux conditions expérimentales rigoureuses⁷⁰ (séchage extrême des solvants et du monomère, travail sous vide poussé).

Les poly(oxyde d'éthylène) (POE) et poly(oxyde de propylène) (POP) sont couramment utilisés dans l'industrie (cosmétiques, détergents, peintures) ou dans la chimie fondamentale⁷¹⁻⁷³, car ils autorisent l'obtention de copolymères à blocs amphiphiles. Cette chimie est donc extrêmement versatile et permet, selon les proportions des oxiranes et leurs répartitions, d'obtenir des homopolymères ou des copolymères de structure et de masse molaire parfaitement contrôlée, présentant des propriétés spécifiques selon l'application souhaitée.

I.3.1. Polymérisation anionique d'oxyde d'éthylène

La polymérisation anionique est une polymérisation en chaîne pour laquelle le centre actif est associé à un contre-ion tel que le sodium, le potassium ou le césium. La polymérisation anionique comporte alors trois étapes : la réaction d'amorçage, la propagation et enfin la réaction de terminaison provoquée par exemple par l'acide chlorhydrique ou bien par l'eau (figure I-20).

Le mécanisme d'amorçage correspond à l'attaque nucléophile de l'oxanion (ion libre ou paire d'ions) sur le cycle qui va conduire à son ouverture. La réaction de polymérisation peut s'écrire comme sur la figure I-20, B.

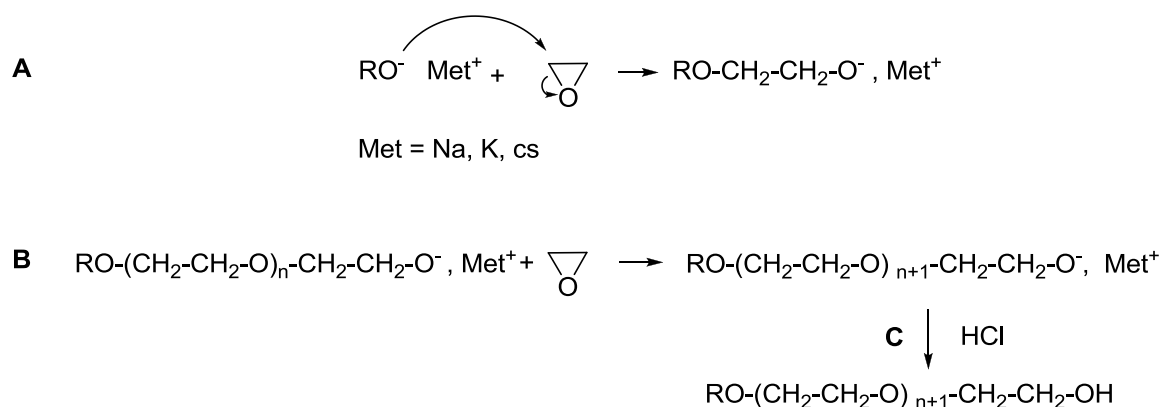


FIG. I.20 - Réactions (A) d'amorçage et (B) de propagation et (C) de terminaison

Lors de cette réaction, le milieu réactionnel a une grande influence sur la cinétique de la polymérisation anionique. En effet, les centres actifs (figure I-21) sont sous trois formes⁷⁴ : des agrégats (**A**), des paires d'ions plus ou moins séparées par le solvant (**B**), ou des ions libres (**C**). Ces espèces sont en équilibre les unes par rapport aux autres mais avec des vitesses d'échange très élevées par rapport à la vitesse de croissance des chaînes. Ainsi toutes les fonctions alcoolates, présentes dans le milieu, vont démarrer la polymérisation instantanément.

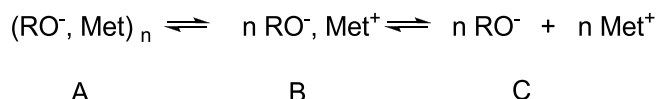


FIG. I.21 - Espèces propageantes en polymérisation anionique

Les paramètres suivants ont une influence non négligeable sur la cinétique⁷⁴ :

➤ Polarité du solvant :

La polymérisation est d'autant plus rapide que le solvant est polaire. En effet, les solvants polaires déplacent l'équilibre vers les paires d'ions et les ions libres, ces derniers étant de loin les espèces les plus actives.

➤ Nature du contre-ion :

Dans un solvant polaire, la polymérisation est d'autant plus rapide que le contre-ion est volumineux (potassium, césium). Des études montrent que la constante de dissociation K des paires d'ions décroît lorsque la taille du contre-ion diminue. L'augmentation de K augmente ainsi la vitesse de polymérisation car elle entraîne une augmentation très importante de la concentration en ions libres (très réactifs).

I.3.2. Polymérisation anionique d'oxyde de propylène

I.3.2.1. Mécanisme : amorçage, propagation et transferts

De manière générale, les temps de production sont plus longs pour les dérivés oxypropylés que pour les composés éthoxylés, car l'étape d'amorçage est plus lente lors de la polymérisation anionique de l'oxyde de propylène⁷² et des réactions de transferts ont lieu durant la polymérisation.

En catalyse basique, l'étape d'amorçage implique l'attaque nucléophile de l'alcoolate sur l'oxyde de propylène, qui se passe préférentiellement sur le carbone le moins substitué⁷⁵⁻⁷⁷ (figure I-22, voie 1), ce qui aboutit à la formation majoritaire d'un composé avec une fonction alcoolate secondaire⁷⁸, moins réactif vis-à-vis des oxiranes que les fonctions alcoolate de classe primaire.

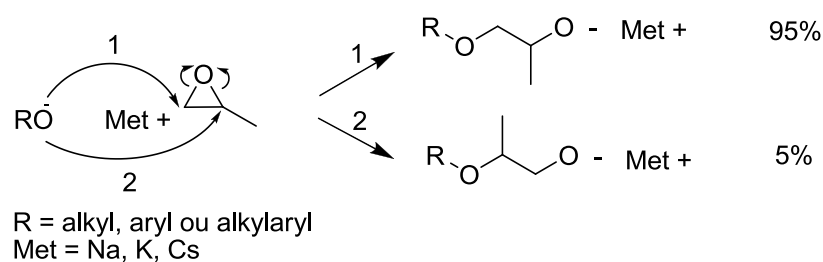


FIG. I.22 - La réaction d'amorçage de l'oxyde de propylène

L'étape de propagation peut s'écrire de la façon suivante :

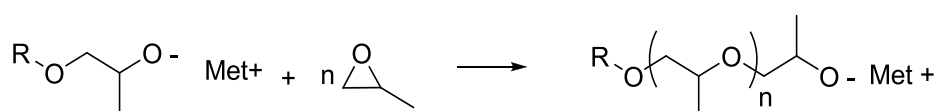


FIG. I.23 - La réaction de propagation de l'oxyde de propylène

Enfin, contrairement à la polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène, l'approche « vivante » ne peut être qualifiée pour ce type d'oxirane. En effet, la polymérisation anionique de l'oxyde de propylène est accompagnée par une importante réaction de transfert au monomère.

I.3.2.2. Réactions de transfert

De par leur très grande basicité, les centres actifs alcoolates peuvent venir arracher un proton sur le monomère, ce qui a pour conséquence la formation d'un nouvel amorceur porteur d'une double liaison, nommé alcoolate allylique (ou alcoolate propénylique)⁷⁹⁻⁸⁵, comme illustré sur la figure I-24, A.

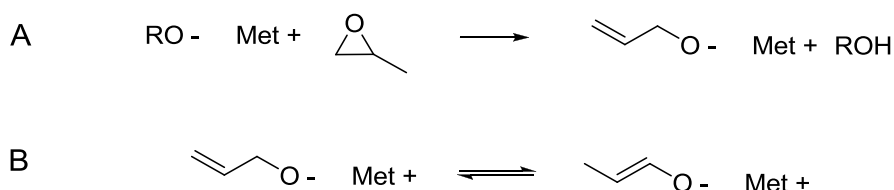


FIG. I.24 - A) Réaction de transfert au monomère, B) Isomérisation

L'alcoolate 1-propényl (figure I-24, B) engendre ensuite, par réarrangement en présence de base, un nouvel amorceur dans le milieu réactionnel : l'alcoolate 2-propényl.

Ces alcoolates allyliques (figure I-25) vont démarrer ainsi la polymérisation de nouvelles chaînes de poly(oxyde de propylène) avec une fonction allyle en bout de chaînes. Ces nouvelles fonctions alcoxyates créées vont donc contribuer à augmenter l'indice de polymolécularité du milieu, et ainsi diminuer la masse molaire moyenne.

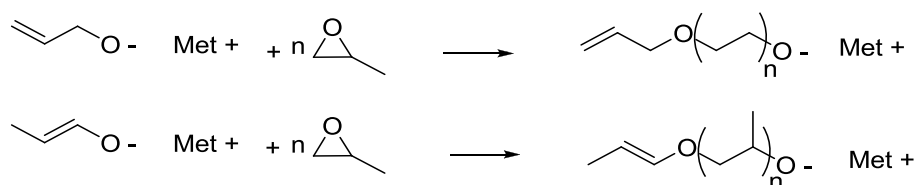


FIG. I.25 - Produits secondaires

L'occurrence de ces réactions de transferts est dictée par les paramètres⁸⁹ suivants :

I.3.2.3. Température de réaction

Afin de limiter la teneur en insaturés, les températures de réaction seront plus basses que dans le cas de l'éthoxylation. Dans l'industrie, par exemple l'oxypropylation se fait de 100 à 125°C, contre 150-160°C pour l'éthoxylation.

I.3.2.4. Nature du contre-ion

La teneur en insaturés décroît lorsque le rayon de l'ion métal augmente. Ainsi le transfert diminue selon l'ordre suivant : $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$. De manière générale, les alcoolates de lithium ne sont jamais utilisés car ils sont pratiquement inactifs du fait de leur agrégation. Pour les polymérisations anioniques de l'oxyde de propylène, les deux agents déprotonants les plus utilisés sont l'hydroxyde de sodium (NaOH) et l'hydroxyde de potassium (KOH), avec une préférence pour ce dernier, car le contre-ion est plus volumineux. Quant à l'hydroxyde de césium et l'hydroxyde de rubidium, ils permettent une forte diminution de la teneur en insaturés, dans le cas de POP de masses molaires élevées. Cependant, en raison de leur rareté et de leur coût d'achat très élevé, ils sont très peu utilisés.

I.3.2.5. Agents complexants

Afin d'augmenter la vitesse de polymérisation, des agents complexants, de type éther couronnes⁸⁷ ou cryptands peuvent être utilisés dans les oxyalkylations de manière générale. Ils agissent en complexant le contre-ion alcalin et en dissociant l'anion propageant, ce qui diminue les réactions de transfert et permet ainsi d'accroître les masses molaires. Ainsi l'équilibre thermodynamique en faveur du complexe favorise la polymérisation anionique vivante en améliorant sa cinétique.

I.4. Conclusion

Comprendre le fonctionnement des canaux ioniques naturels et trouver à long terme des thérapies aux canalopathies sont des axes de recherche en plein essor. En effet, ces transporteurs jouent un rôle fonctionnel primordial dans le bon fonctionnement de l'organisme. Pour cela, les chercheurs ont choisi une approche biomimétique, consistant à synthétiser des modèles artificiels en s'inspirant des architectures naturels. Les canaux à base de macrocycles, et notamment de cyclodextrine, sont des candidats potentiels très intéressants, car ils permettent l'obtention de canaux d'architecture variable. En effet la diversité du diamètre de la CD permet d'obtenir des pores de tailles différentes, mais également le nombre important de fonctions hydroxyle qui le constituent, et de réactivité différente, permettent des modifications sélectives très intéressantes d'un point de vue de la conception structurale.

Afin de former des canaux unimoléculaires, la première étape va consister à synthétiser des dérivés de cyclodextrines amphiphiles, possédant un nombre équivalent de fonctions hydroxypropyle sur chacune des faces, qui permettent de rendre les fonctions hydroxyle des cyclodextrines équiréactives. Ces composés ainsi formés vont servir de macroamorceurs à la polymérisation anionique d'oxiranes, afin d'améliorer leur caractère amphiphile et leur solubilité dans l'eau, dans le but final d'étudier, par électrophysiologie, leur aptitude à s'insérer dans des bicouches lipidiques, à l'image des canaux transmembranaires.

Références bibliographiques

1. Hodgkin, A.L.; The ionic basis of nervous conduction, *Nobel Lecture* **1963**.
2. Huxley, A.F.; The quantitative analysis of excitation and conduction in nerve, *Nobel Lecture* **1963**.
3. Neher, E.; Ion Channels For Communication Between And Within Cells, *Nobel Lecture* **1991**.
4. Sakmann, B.; Elementary Steps In synaptic Transmission Revealed By Currents Through Single Ion Channels, *Nobel Lecture* **1991**.
5. Baudry, Y.; Bollot, G.; Gorteau, V.; Litvinchuk, S.; Mareda, J.; Nishihara, M.; Pasini, D.; Perret, F.; Ronan, D.; Sakai, N.; Shah, M. R.; Som, A.; Sorde', N.; Talukdar, P.; Tran, D.-H.; Matile, S.; Molecular recognition by synthetic multifunctionalpores in practice: are structural studies really helpful? *Adv. Funct. Mater.* **2006**, 16, 169–179.
6. Sakai, N.; Mareda, J.; Matile, S.; Rigid-rod molecules in biomembrane models: from hydrogen-bonded chains to synthetic multifunctional pores. *Acc. Chem. Res.* 2005, 38, 79–87.
7. Som, A.; Matile, S.; Rigid-rod b-barrel ion channels with internal “cascade blue” cofactors – catalysis of amide, carbonate, and ester hydrolysis. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 22, 3874–3883.
8. Husaru, L.; Schulze, R.; Setiner, G.; Wolff, T.; Habicher, W. D.; Salzer, R.; Potential analytical applications of gated artificial ion channels. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 382, 1882–1888.
9. Fernandez-Lopez, S.; Kim, H.-S.; Choi, E. C.; Delgado, M.; Granja, J. R.; Khasanov, A.; Kraehenbuehl, K.; Long, G.; Weinberger, D. A.; Wilcoxon, K. M.; Ghadiri, M. R.; Antibacterial agents based on the cyclic d,l-a-peptide architecture. *Nature* **2001**, 412, 452–455.
10. Leevy, W. M.; Gokel, M. R.; Hughes- Strange, G. B.; Schlesinger, P. H.; Gokel, G. W.; Structure and medium effects on hydrophile synthetic ion channel toxicity to the bacterium *E. coli*. *New J. Chem.* **2005**, 29, 205–209.
11. Yamamoto, Y.; Nagasaki, Y.; Kato, M.; Kataoka, K.; Surface Charge modulation of Poly(ethylene glycol)-poly(D, L-lactide) block copolymer micelles: conjugaison of charged peptides, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* **1999**, 16, 135-146.

12. Futaki, S.; Zhang, Y.; Kiwada, T.; Nakase, I.; Yagami, T.; Oiki, S.; Sugiura, Y.; Gramicidin based channel systems for the detection of protein-ligand interaction, *Bioorg. and Med. Chem.* **2004**, *12*, 1343-1350.
13. Woolley, G. A.; Wallace, B. A., Model ion channels: Gramicidin and alamethicin, *J. Membr. Biol.* **1992**, *129*, 109.
14. Sisson, A.L. ; Raza Shah, M. ; Bhosale, S.; Matile, S.; Synthetic ion channels and pore (2004-2005), *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, *35*, 1269-1286.
15. Gelman, M. A.; Weisblum, B.; Lynn, D. M.; Gellman, S. H.; Biocidal activity of polystyrenes that are cationic by virtue of protonation, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 557-560.
16. Ilker, M. F.; Schule, H.; Coughlin, E. B.; Lipid Membrane Disruption Activities, *Macromolecules* **2004**, *37*, 694-700.
17. Ilker, M.F.; Nusslein, K.; Tew, G. N.; Bryan Coughlin, E.; Hemolytic Antibacterial Activities of Amphiphilic Polynorbornene Derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (48), 15870-15875.
18. Sakai, N., Mareda, J., Matile, S.; Rigid-rod molecules in biomembrane models: from hydrogen-bonded chains to synthetic multifunctional pores, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 79-87.
19. Clark, T. D.; Buehler, L. K.; Ghadiri, M. R.; Self-assembling cyclic b3-peptide nanotubes as artificial transmembrane ion channels, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 651-656.
20. Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, L. K.; Artificial transmembrane ion channels from self-assembling peptide nanotube, *Nature* **1994**, *369*, 301-304.
21. Fyles, T. M.; Knoy, R.; Muellen, K.; Sieffert, M.; Membrane activity of isophthalic acid derivatives: Ion channel formation by a low molecular weight compound, *Langmuir* **2001**, *17*, 6669-6674.
22. Ishida, H.; Qi, Z.; Sokabe, M.; Donowaki, K.; Inoue, Y.; Molecular design and synthesis of artificial ion channels based on cyclic peptides containing unnatural amino acids, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2978-2989.
23. Wright, A. J.; Matthews, S. E.; Fischer, W. B.; Beer, P. D.; Novel resorcin[4]arenes as potassiumselective ion-channel and transporter mimics, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3474-3481.
24. Chen, W.-H.; Nishikawa, M.; Tan, S.-D.; Yamamura, M.; Satake, A.; Kobuke, Y.; Tetracyanoresorcin[4]arene ion channel shows pH dependent conductivity change, *Chem. Commun.* **2004**, 872-873.

25. Tanaka, Y.; Kobuke, Y.; Sokabe, M.; A non-peptidic ion channel with K⁺ selectivity, *Angew. Chem. Int.* **1995**, 34, 693–694.
26. Yoshino, N.; Satake, A.; Kobuke, Y.; An artificial ion channel formed by a macrocyclic resorcin[4]arene with amphiphilic cholic acid ether groups, *Angew. Chem. Int.* **2001**, 40, 457–459.
27. Maulucci, N.; De Riccardis, F.; Botta, C. B.; Casapullo, A.; Cressina, E.; Fregonese, M.; Tecilla, P.; Izzo, I.; Calix[4]arene-cholic acid conjugates: a new class of efficient synthetic ionophores, *Chem. Commun.* **2005**, 1354–1356.
28. Pechulis, A. D.; Thompson, R. J.; Fojtik, J. P.; Schwartz, H. M.; Lisek, C. A.; Frye, L. L.; The design, synthesis and transmembrane transport studies of a biomimetic sterol-based ion channel, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 1893–1901.
29. Fyles, T. M.; James, T. D.; Kaye, K. C.; Activities and modes of action of artificial ion channel mimics, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 12315–12321.
30. Jullien, L.; Lehn, J.-M.; The “chundle” approach to molecular channels: synthesis of a macrocyclebased molecular bundle, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 3803–3806.
31. Otis, F.; Voyer, N.; Polidori, A.; Pucci, B.; End group engineering of artificial ion channels, *New J. Chem.* **2006**, 30, 185–190.
32. Murillo, O.; Watanabe, S.; Nakano, A.; Gokel, G. W.; Synthetic models for transmembrane channels: structural variations that alter cation flux, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7665–7679.
33. Tabushi, I.; Kuroda, Y.; Yokota, K.; A,B,D,F-tetrasubstituted β -cyclodextrin as artificial channel compound, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 4601–4604.
34. Benkhaled, A. ; Synthèse de cyclodextrines amphiphiles appliquées à la modification de surfaces métalliques ou des membranes biologiques modèles, *Thèse de doctorat d l’université d’Evry-Val-d’Essonne* **2004**. Bacri, L., Benkhaled, A., Guégan, P., Auvray, L. ; *Langmuir* **2005**, 21, 5842.
35. Badi, N. ; Polymérisation anionique de l’oxyde d’éthylène amorcée par des cyclodextrines modifiées : application à l’étude des canaux artificiels, *Thèse de doctorat de l’université d’Evry-Val-d’Essonne* **2006**.
36. Badi, N.; Auvray, L.; Guégan, P.; Synthesis of Half-Channels by the Anionic Polymerization of Ethylene Oxide Initiated by Modified Cyclodextrin, *Advanced Materials* **2009**, 21, 40, 4054-4057.

37. Canceill, J.; Jullien, L.; Lacombe, L.; Lehn, J-M; Synthesis of Bouquet-Shaped Molecules Based on a β -Cyclodextrin Core, *Helvet. Chim. Acta*, **1992**, 75, 791-812. Pregel, M. J.; Jullien,
38. Pregel, M. J.; Jullien, L.; Canceill, J.; Lacombe, L.; Lehn, J.-M.; Channel-type molecular structures, Part 4. Transmembrane transport of alkali-metal ions by ‘bouquet’ molecules, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1995**, 2, 417–426.
39. Madhavan, N.; Robert, E. C.; Gin M. S.; A highly active anionselective aminocyclodextrin ion channel, *Angew. Chem. Int.* **2005**, 44, 7584–7587.
40. Matile, S.; Sakai, N.; The characterization of Synthetic Ion Channels and Pores, *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, **2007**, 391-416.
41. Riddell, F. G.; Hayer, M. K.; The monensin-mediated transport of sodium ions through phospholipid bilayers studied by ^{23}Na -NMR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 817, 313–317.
42. Espinola, C. G.; Delgado, M.; Martin, J. D.; Synthetic flux-promoting polyether models: cation flux dependence on polyoxyethylene chain length, *Isr. J. Chem.* **2000**, 40, 279–288.
43. Murillo, O.; Watanabe, S.; Nakano, A.; Gokel, G. W.; Synthetic models for transmembrane channels: structural variations that alter cation flux, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7665– 7679.
44. Pregel, M. J.; Jullien, L.; Lehn, J.-M.; Towards artificial ion channels: transport of alkali metal ions across liposomal membranes by “bouquet” molecules, *Angew. Chem.* **1992**, 31, 1637–1640.
45. Gupta, R. K.; Gupta, P.; Direct observation of resolved resonances from intra- and extracellular sodium- 23 ions in NMR studies of intact cells and tissues using dysprosium(III)tripolyphosphate as paramagnetic shift reagent, *J. Magn. Reson.* **1982**, 47, 344–350.
46. Kano, K.; Fendler, J. H.; Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces: pH gradients across phospholipid vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, 509, 289–299.
47. Clement, N. R.; Gould, J. M.; Pyranine (8-hydroxy-1,3,6- pyrenetrisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles, *Biochemistry* **1981**, 20, 1534–1538.

48. Menger, F. M.; Davis, D. S.; Persichetti, R. A.; Lee, J.-J.; *Synthetic flux-promoting compounds. Exceeding the ion-transporting ability of gramicidin*, **1990**, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 2451–2452
49. Carmichael, V. E.; Dutton, P. J.; Fyles, T. M.; James, T. D.; Swan, J. A.; Zojaji, M.; Biomimetic ion transport: a functional model of a unimolecular ion channel, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 767–769.
50. Das, G.; Matile, S.; Transmembrane pores formed by synthetic p-octiphenyl b-barrels with internal carboxylate clusters: regulation of ion transport by pH and Mg²⁺-complexed 8-aminonaphthalene-1,3,6- trisulfonate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 5183–5188.
51. Szejtli, J.; Past, Present, and future of cyclodextrine research, *Pure Appl. Chem.* **2004**, 76 (10), 1825-1845.
52. Duchêne, D.; Wouessidjewe, D.; Ponchel, G.; Cyclodextrins and carrier systems, *J. controlled Release* **1999**, 62, 263-268.
53. Canceill, J.; Jullien, L.; Lacombe, L.; Lehn, J-M; Synthesis of Bouquet-Shaped Molecules Based on a β -Cyclodextrin Core, *Helvet. Chim. Acta*, **1992**, 75, 791-812.
54. Khan, A. R.; Forgo, P.; Stine, K. J.; D'Souza, V. T.; Methods for selective modification of Cyclodextrins, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1977-1996.
55. Santojo-Gonzalez, F.; Isac-Garcia, J.; Vargas-Berenguel, A.; Robles Diaz, R.; Calvo-Flores, F.G.; Selective pivaloylation and diphenylacetylation of cyclomalto-oligosaccharides, *Carbohydr. Res.* **1994**, 262, 271-282.
56. Coleman, A.W.; Zhang, P.; Ling, C. ; Parrot-Lopez, H. ; Galons, H.; the use of chlorodimethylhexylsilane for protecting the hydroxyl groups in cyclomaltoheptaose (β -cyclodextrin), *Carbohydr. Res.* **1992**, 224, 307-309.
57. Ashton Peter R. ; Boyd Sue E., Gattuso Giuseppe, Hartwell Edward Y., Koeniger Rainer, Spencer Neil, Stoddart J. Fraser; A Novel Approach to the Synthesis of Some Chemically-Modified Cyclodextrins, *J. Org. Chem.* **1995**, 60 (12), 3898–3903
58. Bergeron, R.; Melley, M. P.; Machida, Y.; Selective alkylation of cycloheptaamylose, *Bioorg. Chem.* **1976**, 5, 121.
59. Irie, T. ; Fukunaga, K. ; Pitha, J. ; Uekama, K. ; Fales, H. M. ; Sokolowski, E. A. ; Alkylation of cyclomalto-oligosaccharides (cyclodextrins) with dialkyl sulfate-barium hydroxide: Heterogeneity of products and the marked effect of the size of the macrocycle, *Carbohydr. Res.* **1989**, 192, 167.

60. Armstrong, D. W.; Chang, C.; Relevance of enantiomeric separations in food and beverage analyses, *J. Agric. Food Chem* **1990**, 38, 1674.
61. Armstrong, D. W.; Li, W.; Capillary gas chromatographic separation of enantiomers with stable dipentyl- α -, β - and γ -cyclodextrin-derivatized stationary phases, *Anal. Chim. Acta* **1990**, 234, 365.
62. Hirayama, F.; Kurihara, M.; Horiuchi, Y.; Utuski, T.; Uekama, K.; Yamasaki, M.; Preparation of heptakis(2,6-di-O-ethyl)- β -cyclodextrin and its nuclear magnetic resonance spectroscopic characterization, *Pharm. Res.* **1993**, 10, 208.
63. Bates, P. S., Parker, D., Patti, A. F. Synthesis and spectroscopic characterisation of lipophilic octylated α -, β - and γ -cyclodextrin derivatives; *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, **1994**, 657.
64. Bansal, P. S.; Francis, C. L.; Hart, N. K.; Henderson, S. A.; Oakenfull, D.; Robertson, A. D.; Simpson, G. W., Regioselective alkylation of β -cyclodextrin, *Aust. J. Chem.* **1998**, 51, 915-923.
65. Fulton, D.A.; Stoddart, J.F.; Synthesis of cyclodextrin-based carbohydrate clusters by photoaddition reactions, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8309-8319.
66. Takeo, K.; A convenient preparation of per-2,6-di-O-methylcyclomalto-oligosaccharides, *Carbohydr. Res.*, **1989**, 200, 481-485.
67. Takeo, K.; Mitoh, H.; Uemuera, K.; Selective chemical modification of cyclomalto-oligosaccharides via *tert*-butylmethylsilylation, *Carbohydr. Res.* **1989**, 187, 203-221.
68. Topchieva, I. N. ; Mischnick, P. ; Kühn, G. ; Polyakov, V. A. ; Elezkaya, S. V. ; Bystryzky, G. I. ; Karezin, K. I. ; Novel derivatives of cyclodextrins, modified with poly(ethylene oxide) and their complexation properties, *Bionconjugate Chem.* **1998**, 9, 676-682.
69. Badi, N. ; Guégan. P.; Per-O-(3-hydroxy)propyl - β -cyclodextrin : a cyclodextrin derivative bearing only primary hydroxyl groups, *Carbohydr. Res.*, **2007**, 14,1989-1991.
70. Uhrig, D.; Mays, J. W.; Experimental techniques in high-vacuum anionic polymerization, *J. Polymer Science: part A: Polymer Chemistry* **2005**, 43, 6179-6222.
71. Levene, P. A.; Walti, A. J.; On condensation products of propylene oxide and of glycidol, *Biol. Chem.* **1927**, 75, 325.
72. Boileau, S.; Anionic Ring-opening Polymerization: Epoxides and Episulfides, *Comprehensive Polymer Science, Pergamon Press: Oxford* **1989**, 32, 467.

73. Billouard, C.; Carlotti, S.; Desbois, P.; Deffieux, A.; "Controlled" High-Speed Anionic Polymerization of Propylene Oxide Initiated by Alkali Metal Alkoxide/Trialkylaluminum Systems, *Macromolecules* **2004**, 37, 4038-4043.
74. Fontanille, M. ; Gnanou, Y. ; Chimie et physico-chimie des polymères, *Ed. Dunod* **2002**, 283-300.
75. Price, C. C.; Carmelite, D. D.; Reactions of Epoxides in Dimethyl Sulfoxide catalyzed by Potassium *t*-Butoxide, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 4039-4044.
76. Blanchard, L. P.; Hornof, V.; Moinard, J.; Tahiani, F.; Anionic Polymerization of Propylene Oxide, *J. Polym. Sci. Chem.* **1979**, 10, 3089.
77. Banks, P.; Peters, R.H.; Polymerization and Crosslinking of Epoxides: base-Catalyzed Polymerization of phenyl Glycidyl Ether, *J. Polym. Sci. Part A1* **1970**, 8, 2595.
78. Mercier, J.P. ; Maréchal, E. ; Chimie des polymères: synthèses, réactions, dégradations, *Traité des matériaux* **1993**.
79. Price, C. C.; Saint Pierre, L. E. ; The room Temperature Polymerization of Propylene Oxide, *J. Am. chem. Soc.* **1956**, 78, 3432.
80. Dege, G.J. ; Harris, R.L. ; MacKenzie, J.S.; Terminal Unsaturation In Polypropylene Glycol, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 3374.
81. Simons, D.M. ; Verbanc, J.J. ; The Polymerization of Propylene Oxide, *J. Polym. Sci.* **1960**, 44, 303.
82. Gee, G.; Higginson, W.C.E.; Taylor, K.J.; Trenholme, M. W.; *J. Chem. Soc.* **1956**, 83, 4787.
83. Steiner, E. C.; Pelletier, R. R.; Trucks, R. O.; A Study of the Polymerization of propylene Oxide catalyzed by Anhydrous Potassium Hydroxide, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 4678.
84. Price, C.C.; Akkapeddi, M.K.; Kinetics of Base-Catalysed Polymerization of Epoxides in Dimethyl Sulfoxide and Hexamethylphosphoric Triamide, *J. Amer. Chem. Soc.* **1972**, 94, 3972.
85. Price, C.C.; Polyethers, *Acc.Chem Res.* **1974**, 7, 294.
86. Gagnon, S. D., Propylene oxide and higher 1,2-epoxide polymers, *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering* **1985**, 2d ed.; Kruschwitz, J.I., Ed. Wiley-Interscience: New-York,; 6, 273-307

87. Quirk, R. P.; Lizarraga, G. M.; Anionic synthesis of well-defined, poly[(styrene)-*block*-(propylene oxide)] block copolymers, *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, *201*, 1395-1404.

Chapitre II :

Synthèse et caractérisation des amorceurs

II.1. Introduction

L'utilisation des cyclodextrines (CD) comme amorceur de polymérisation anionique est tout à fait récente¹. Cette approche divergente permet l'obtention de nouveaux polymères en étoile à cœur CD. Afin d'obtenir un contrôle du nombre de branches par macromolécule, il est important de synthétiser des amorceurs possédant des fonctions hydroxyle de réactivité équivalente, ce qui n'est pas le cas des fonctions hydroxyle des unités glucopyranoses de la CD^{2,3}. Nous avons reporté dans le chapitre précédent la synthèse de composés per(2,3-di-O-heptyl)- β -CD² et per-2,3,6-tri-O-(3-hydroxypropyl)- β -CD^{3,4}, à l'origine de polymères en étoile à 7 et 21 branches respectivement. Nous présentons dans ce chapitre la synthèse de la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD, amorceur de la polymérisation de l'oxyde d'éthylène permettant d'obtenir des polymères en étoile à 14 branches et à cœur cyclodextrine selon une méthode divergente. Cette conception structurale a été envisagée par Lehn et al.^{5,6}, qui ont synthétisé des macromolécules symétriques, par greffage de per(3-O-méthyl)- β -CD avec des chaînes oligo(oxyéthylène) modifiées.

L'amorceur est donc conçu de manière à être de nature amphiphile, d'aspect symétrique et composé d'extrémités hydroxyle de même classe, condition indispensable pour une polymérisation anionique contrôlée. La synthèse de cette molécule implique des modifications sélectives, qui font l'objet de la discussion de la partie qui suit.

II.2. Choix de la méthode de modifications chimiques et stratégie de synthèse

Nous avons vu dans la partie bibliographique qu'il existe plusieurs méthodes de modifications sélectives des cyclodextrines. La méthode en une étape consiste à utiliser des réactifs qui ne fournissent aucune discrimination entre les différentes fonctions hydroxyle, ce qui engendre un nombre important de produits difficilement isolables⁷. Une dérivatisation des molécules obtenues à des fins de purification conduit à des rendements faibles dans le cas des dérivés γ -CDs (7%)⁷. Une alternative consiste à utiliser une série de protection et de déprotection en plusieurs étapes⁸. Cependant, cette méthode nécessite un très grand nombre d'étapes et autant de colonnes

chromatographiques. C'est pourquoi la méthode la plus couramment utilisée pour synthétiser les 2,6 dialkylcyclodextrines est la méthode réalisée en une seule étape⁹⁻¹⁶. Néanmoins, des améliorations doivent être apportées à cette méthode, pour les applications envisagées.

Dans ce chapitre, nous décrivons la synthèse d'un nouvel amorceur de la polymérisation anionique d'oxyde d'éthylène : le per(2,6-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD. La synthèse de ces dérivés de CDs est réalisée en trois étapes selon le schéma réactionnel reporté sur la figure II-1.

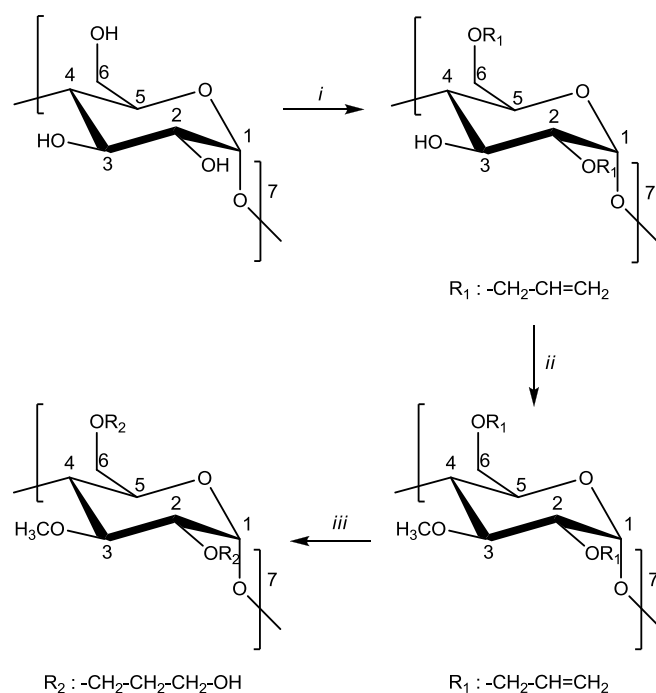


FIG. II.1 - Stratégie de synthèse de la (per-2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD :
(i) BaO/Ba(OH)₂, bromure d'allyle, DMF/DMSO, (ii) NaH, iodométhane, DMF, (iii) 9-BBN, THF, NaOH, H₂O₂, 60°C

La première étape consiste à « allyler » sélectivement les fonctions hydroxyle en positions 2 et 6, selon la méthode proposée par Bergeron et. al.⁹ Cette réaction est revisitée et adaptée aux α - et γ -CDs, afin de déterminer de nouvelles conditions pour une synthèse en une seule étape avec des rendements élevés. Le dérivé per(2,6-di-O-allyl)- β -CD va ensuite réagir avec de l'iodométhane pour aboutir à la per(2,6-di-O-allyl-3-O-méthyl)- β -CD. Les groupements allyle sont finalement oxydés afin d'obtenir un nouveau dérivé CD, composé de 7 fonctions hydroxyle, situées de chaque côté du cône

tronqué et possédant une réactivité semblable pour des polymérisations anioniques d'oxiranes ultérieures.

II.3. Alkylation sélective des fonctions hydroxyle en positions 2 et 6

Nous avons vu dans le chapitre précédent, qu'initialement cette réaction a été décrite par Bergeron⁹ puis revisitée par Bansal¹⁵ et Stoddart¹⁶, qui ont modifié les temps de réaction, passant respectivement de 92h à 20h, contre 48h dans les conditions de Bergeron⁹. Les produits purifiés ont été obtenus avec des rendements respectifs de 36% (il est précisé qu'il s'agit en réalité d'un mélange) et de 17% et ont été caractérisés par spectrométrie de masse (contrairement à Bergeron), technique importante dans l'estimation de la pureté du produit. En outre, les deux chercheurs ont fait état de la difficulté à obtenir un produit final, parfaitement pur, avec de bons rendements. Comme le suggère Bansal, cette stratégie n'est pas clairement statistique, et des améliorations restent toujours à entreprendre pour obtenir des dérivés de CD parfaitement isolés, avec des rendements appropriés aux applications macromoléculaires. Avant de revisiter la synthèse des per(2,6-di-O-allyl)- β -CDs et de l'étendre aux α - et γ -CDs, une étude comparative de la réactivité des différentes CDs, dans la réaction d'alkylation s'impose.

II.3.1. Comparaison de la réactivité des α, β, γ - cyclodextrines vis-à-vis de la réaction d'alkylation sélective

La synthèse des per(2,6-di-O-allyl)- α , β , γ -CDs est conduite dans les conditions de réaction proposées par Bergeron⁹. Le traitement du mélange obtenu est mené de manière à enlever uniquement les produits inorganiques. Les produits bruts sont alors analysés par spectrométrie de masse par ionisation électrospray, afin de déterminer la sélectivité de la réaction¹⁰. En spectrométrie de masse, l'hypothèse suivante est émise : les espèces de même nature chimique sont ionisées de la même manière, alors l'intensité du pic correspond à la proportion relative du produit dans le mélange. La figure II-2 présente les spectres ESI/MS des composés ZE2 (α), ZE5 (β) et ZE104 (γ) et suggère ainsi que le

profil des spectres dépend de la famille de cyclodextrine (α , β , γ -CDs) utilisés pour la réaction.

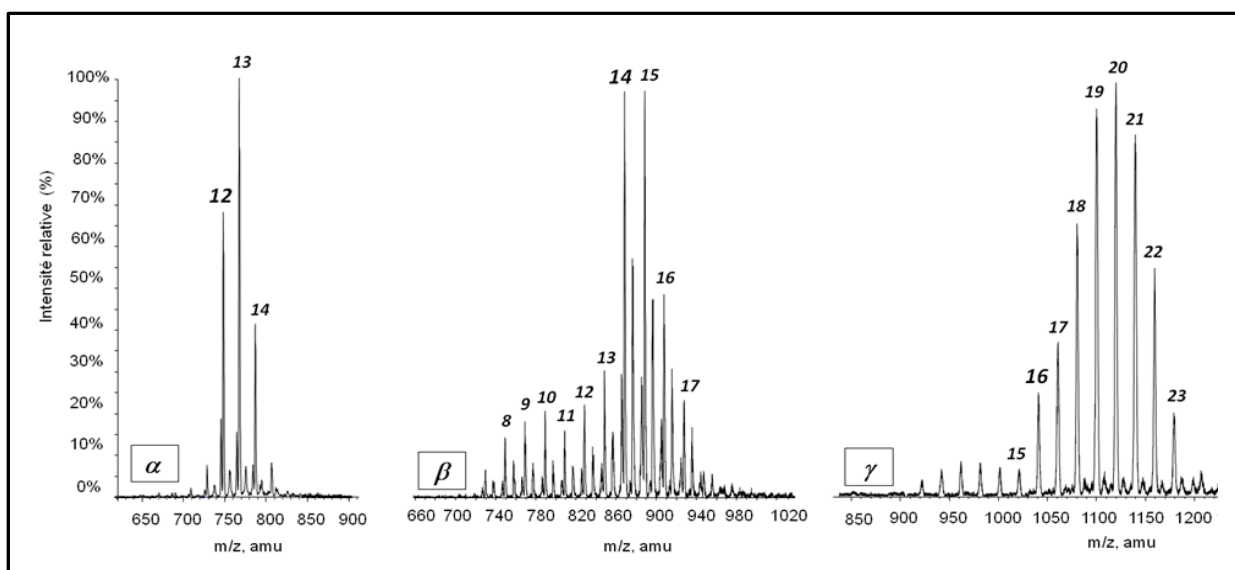


FIG. II.2 - Spectres ESI-MS des produits bruts ZE2 (α), ZE5 (β), ZE104 (γ) obtenus dans les conditions de synthèses reportées par Bergeron⁹ pour la per(2,6-di-O-allyl)- β -CD ([BaO]/[OH_{2,6}]=2,6 éq ; [Ba(OH)₂]/[OH_{2,6}]=1,3 éq. ; [Br-allyl]/[OH_{2,6}]=4,7 éq. ; temps de réaction = 2 jours, T_{amb}). Les chiffres au-dessus des pics correspondent au nombre de groupements allyle par CD.

Les spectres ESI/MS montrent l'hétérogénéité des produits bruts, composés d'espèces qui diffèrent par leur degré de substitution. Trois types de molécules sont caractérisés : le produit désiré de degré de substitution d.s. attendu (égal à 12, 14, 16 pour les dérivés α , β , γ -CDs respectivement) et deux familles de composés « secondaires » : les produits « sous-substitués » (d.s. < d.s. attendu) et « sur-substitués » (d.s. > d.s. attendu). Quatre paramètres caractéristiques de la distribution des produits dans le mélange peuvent être calculés à partir des spectres de masse :

- Le degré de substitution moyen :
$$\overline{d.s.} = \frac{\sum (I \times d.s.)}{\sum I} \quad (1)$$

(avec I = intensité du pic et d.s. = degré de substitution du composé)

Le degré de substitution moyen $\overline{d.s.}$ représente la proportion relative des produits secondaires dans le mélange. Par exemple lorsque celui-ci est supérieur au d.s. attendu, les dérivés « sur-substitués » sont présents majoritairement dans le mélange. Ainsi, le but est d'obtenir le degré de substitution moyen le plus proche de celui attendu. Par ailleurs,

le nombre de substituants par unité glucose peut être calculé, en divisant le $\overline{d.s.}$ par le nombre d'unités glucose qui composent chaque CD (6, 7 et 8 pour les dérivés α , β , γ -CDs respectivement). Enfin, plus ce facteur s'éloigne de 2, plus les fonctions hydroxyle en position 3 de la cyclodextrine sont modifiées.

- L'écart-type : $\sigma^2 = \overline{d.s.} \times \overline{d.s_1} - \overline{d.s.}^2$ (2)

$$\overline{d.s_1} = \frac{\sum (1 \times d.s.^2)}{\sum (1 \times d.s.)} \quad (3)$$

- Ce paramètre est représentatif de l'homogénéité de la distribution. L'écart-type est d'autant plus faible que la distribution est étroite. Ainsi, il tend vers zéro avec l'augmentation de la pureté.

- Le pourcentage d'intensité des pics : $I_{(d.s.=n)} = \frac{I_{(d.s.=n)}}{\sum I}$ (4)

(avec n = 12, 14, 16 pour α , β , γ -CDs respectivement)

Ce paramètre représente la proportion du produit désiré dans le mélange.

Ces deux derniers paramètres caractérisent la sélectivité de la réaction, qui fait l'objet de la discussion qui suit.

- La sélectivité de la réaction : $S = \frac{I_{(ds=n)}}{\sigma^2}$ (5)

(avec n = 12, 14, 16 pour α , β , γ -CDs respectivement)

Plus ce paramètre est élevé, plus la réaction est sélective.

Les paramètres définis sont calculés pour les produits bruts ZE2, ZE5 et ZE104 (figure II-2), qui ont été synthétisés selon les conditions expérimentales de Bergeron⁹. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau II-1.

Exp ^{ce}	$\overline{d.s.}$	Nombre de substituant par glucose	$I_{(ds=n)}$ %	σ^2	S
ZE2 (α)	12,8	2,1	29	1,0	29
ZE5 (β)	13,8	1,9	30	5,5	5,5
ZE104 (γ)	19,1	2,4	5	6,8	0,7

Tableau II-1 : Paramètres caractéristiques de la distribution des produits dans les mélanges ZE2, ZE5 et ZE104, synthétisés dans les conditions expérimentales de Bergeron⁹

La comparaison du nombre de substituants par glucose permet de constater une différence de réactivité vis-à-vis de la réaction d'allylation dans les conditions de

Bergeron⁹, entre les trois grandes familles de cyclodextrine. Cette différence de réactivité peut être classée selon l'ordre suivant : $\gamma (2,4) > \alpha (2,1) > \beta (1,9)$, tandis que l'ordre de la sélectivité de la réaction, obtenu par le rapport du pourcentage de l'intensité du pic de la molécule d'intérêt sur l'écart-type, est le suivant : $\alpha (29) > \beta (5,5) > \gamma (0,7)$.

Ces résultats montrent que, pour les applications envisagées, il est indispensable d'entreprendre des améliorations de la sélectivité des réactions d'allylation afin de minimiser les temps de purification et d'augmenter le rendement de la réaction.

II.3.2. Synthèse des per(2,6-di-O-allyl)- α,β,γ -cyclodextrines

De nombreuses réactions, menées dans des conditions expérimentales variables, ont été entreprises afin d'améliorer la sélectivité de la réaction d'allylation. Le tableau II-2 récapitule les résultats obtenus et tend à montrer l'amélioration de la sélectivité dans des conditions bien précises, pour chaque famille de cyclodextrine.

	Exp ^{ce}	$\frac{[\text{BaO}]}{[\text{OH}_{2,6}]}$ (Eq.)	$\frac{[\text{BaOH}_2]}{[\text{OH}_{2,6}]}$ (Eq.)	$\frac{[\text{X-allyl}]}{[\text{OH}_{2,6}]}$ (Eq.)	Temps de réaction (jours)	T° (C)	$\overline{d.s.}$	I _(ds = n) (%) n=12,14,16 pour α,β,γ- CDs	σ ²	S
β- CD	ZE5	2.6	1.3	4.7(X=Br)	<u>2</u>	RT	13,7	30	5,5	5,5
	ZE98	2.6	1.3	4.7(X=Br)	2	<u>7</u>	12,9	19	4,1	4,6
	ZE97	<u>1.3</u>	1.3	6.7(X=Br)	5	RT	14,8	31	4,1	7,6
	ZE69	<u>2.6</u>	1.3	<u>4.7(X=Br)</u>	<u>5</u>	RT	14,7	35	2,8	13
	ZE48	2.6	1.3	6.7(X=Cl)	5	RT	12,1	7	1,2	5,8
	ZE55	2.6	1.3	10.7(X=Cl)	5	RT	12,8	19	1,8	11
	ZE52	2.6	1.3	<u>6.7(X=Br)</u>	5	RT	14,9	42	1,3	32
γ- CD	ZE104	2.6	1.3	4.7(X=Br)	<u>2</u>	RT	19.1	5	6,8	0,7
	ZE93	2.6	1.3	<u>6.7(X=Br)</u>	<u>5</u>	RT	19.5	7	4.9	1,4
	ZE95	2.6	1.3	<u>4.7(X=Br)</u>	5	RT	19.5	8	3.2	2,5
	ZE171	2.6	1.3	6.7(X=Cl)	<u>5</u>	RT	15.3	22	2.6	8,4
	ZE172	2.6	1.3	<u>6.7(X=Cl)</u>	<u>13</u>	RT	16.4	27	2.3	12
	ZE173	2.6	1.3	<u>8.7(X=Cl)</u>	13	RT	16.5	27	1.8	15
	ZE174	2.6	1.3	<u>10.7(X=Cl)</u>	13	RT	16.8	33	1.6	21
α- CD	ZE2	2.6	1.3	4.7(X=Br)	<u>2</u>	RT	12,8	29	1	29
	ZE121	2.6	1.3	4.7(X=Br)	4h	RT	12,4	58	0,5	116

Tableau II-2 : Modification des paramètres expérimentaux de l'allylation sélective et résultats des différents paramètres ($\overline{d.s.}$, I, σ², S) caractéristiques de la distribution des produits dans les mélanges

II.3.2.1. Optimisation des conditions de synthèse de la per(2,6-di-O-allyl)-β-cyclodextrine

D'après le tableau II-2, la sélectivité de la réaction d'allylation dans les conditions expérimentales de Bergeron est faible (ZE5, S=5,5), ce qui confirme une distribution

large (10 produits majoritaires) et non symétrique des produits, précédemment observés sur la figure II-2.

Nous pouvons constater qu'une augmentation du temps de réaction (ZE5/ZE69) et une augmentation de la quantité de bromure d'allyle (ZE169/ZE52) permettent une amélioration significative de la sélectivité ($S=32$ pour ZE52). En effet, dans ces conditions expérimentales, la réaction d'allylation est totale, ce qui permet de s'affranchir des composés « sous-allylés ». Le spectre ESI/MS du composé ZE52 (figure II-3) montre la présence d'uniquement 4 produits majoritaires dans le mélange, contre 10 initialement (ZE5), ce qui facilite l'isolation du composé désiré de d.s.=14.

Enfin, les paramètres suivants : température (7°C , ZE98), quantité d'oxyde de baryum (1,3 éq/ $\text{OH}_{2,6}$, ZE97) et chlorure d'allyle (moins réactif que le bromure d'allyle, ZE48 et ZE55) n'ont que très peu d'incidence sur l'amélioration de la sélectivité.

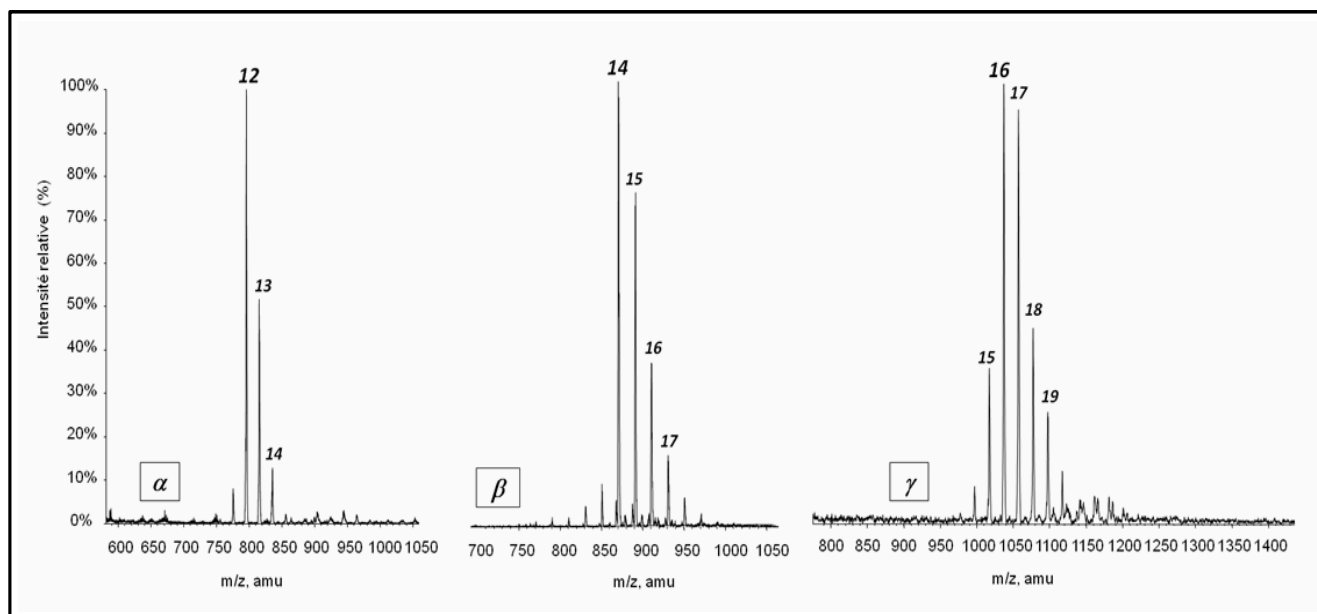


FIG. II.3 - Spectres ESI-MS des produits bruts ZE121 (α), ZE52 (β), ZE174 (γ) obtenus dans les conditions de synthèses optimisées. Les chiffres au-dessus des pics correspondent au nombre de groupements allyle par CD

II.3.2.2. Application à la synthèse de la per(2,6-di-O-allyl)- γ,α -cyclodextrine

Le tableau II-2 montre que la sélectivité, dans les conditions de réaction de Bergeron en présence de γ -CD, est très faible (ZE104, $S=0,7$). Notons que le spectre ESI/MS de ce produit, reporté sur la figure II-2, a montré précédemment une distribution très large et non centrée sur le degré de substitution escompté. Les conditions expérimentales des réactions ZE104, ZE93 et ZE95, en présence de bromure d'allyle, n'ont pas été concluantes. Une deuxième série d'expériences effectuées en présence de chlorure d'allyle (ZE171, ZE172, ZE173 et ZE174), connu pour être moins réactif que son homologue bromé, a abouti à une nette amélioration de la sélectivité. En effet, nous pouvons observer qu'une augmentation des temps de réaction (ZE171/ZE172) et une augmentation de la quantité de chlorure d'allyle (ZE172/ZE173/ZE174) ont conduit à de très bons résultats. En effet, la sélectivité pour le composé ZE174 est égale à 21 (contre $S=0,7$ pour ZE104). Le spectre ESI/MS de ce composé est reporté sur la figure II-3 et montre une distribution étroite (avec uniquement 5 produits majoritaires) et parfaitement centrée sur le produit désiré de d.s. = 16 majoritaire dans le mélange.

Les résultats de la sélectivité pour la famille des α -CDs, reportés dans le tableau II-2, montrent qu'une diminution des temps de réaction (ZE2/ZE121) suffit à obtenir une distribution étroite pour le composé ZE121 ($\sigma^2=0,5$) et centrée sur le produit désiré ($I_{(d.s.=12)}=58$), ce qui prouve une bonne sélectivité de la réaction ($S=116$).

II.3.2.1. Conclusion

Le tableau II-3 récapitule les caractéristiques de la distribution des produits issus des réactions avant et après optimisation des conditions opératoires.

	Exp ^{ee}	Caractéristiques de la distribution des produits dans les mélanges		S
β	ZE5	Large : 10 produits	Non centré	5,5
	ZE52 (optimisé)	Etroite : 4 produits	Centré	32
γ	ZE104	Large : 13 produits	Non centré	0,7
	ZE174 (optimisé)	Etroite : 5 produits	Centré	21
α	ZE2	Etroite : 3 produits	Non centré	29
	ZE121 (optimisé)	Etroite : 3 produits	Centré	116

Tableau II-3 : Récapitulatif des caractéristiques des distributions obtenues avant et après optimisation des conditions expérimentales, pour chaque famille de cyclodextrine

D'après le tableau précédent, l'optimisation des conditions expérimentales pour chaque famille de cyclodextrine conduit à une distribution :

- étroite (pour les dérivés β et γ -CDs) incluant une diminution du nombre de produits majoritaires dans le mélange et une baisse de l'écart-type calculé.
- centrée, impliquant une augmentation de l'intensité $I_{(d.s.=12,14,16)}$, liée à la proportion du produit désiré dans le mélange. Ainsi, nous pouvons constater une augmentation significative de la sélectivité dans les trois cas, ce qui va permettre de faciliter l'extraction des composés d'intérêt à travers les mélanges, avec de bons rendements.

II.3.3. Isolation des per(2,6-di-O-allyl)- α,β,γ -cyclodextrines

Le tableau II-5 reporte les caractéristiques des distributions avant et après chaque purification des produits issus des conditions opératoires optimisées (ZE52, ZE174 et ZE121).

	Exp ^{ce}	Nature du produit	d. s.	I _(ds = n)	σ^2	S	Rdts
β	ZE 52	Produit brut	14,9	42	1,3	32	25 %
		Produit purifié 1	14,5	56	0,4	-	
		Produit purifié 2	14	100	0	-	
γ	ZE 174	Produit brut	16,8	33	1,6	21	22 %
		Produit purifié 1	16,6	42	0,7	-	
		Produit purifié 2	16	100	0	-	
α	ZE 121	Produit brut	12,4	58	0,5	116	40 %
		Produit purifié 1	12	100	0	-	

Tableau II-4 : Récapitulatif des caractéristiques des distributions obtenues avant et après chaque purification, pour chaque famille de cyclodextrines

Le tableau précédent montre que, pour les dérivés β -CDs, une purification unique sur colonne chromatographique n'est pas suffisante ($\sigma^2 = 0,4$), confirmant ainsi les observations de Bansal¹⁵. Une seconde purification alors mise en place a permis l'obtention d'un produit final parfaitement pur, avec un rendement de 25%. L'obtention des dérivés α et γ -CDs, obtenus avec des rendements de 40% et 22%, ont nécessité respectivement une et deux colonnes chromatographiques. Ainsi, les composés per(2,6-di-O-allyl)- α , β , γ -CDs ont été obtenus avec de bons rendements et un degré de pureté très élevé. Leur structure est confirmée par des analyses spectroscopiques et spectrométriques. Les spectres RMN ^1H , ^{13}C , 2D (COSY) de la per(2,6-di-O-allyl)- β -CD purifiée (ZE52 pur) sont donnés figures II-4, II-5 et II-6. Notons que nous avons fait le choix du DMSO- d_6 dans les analyses spectroscopiques, contrairement au chloroforme deutéré suggéré par la littérature, car les fonctions hydroxyle sont mieux définies dans ce type de solvant, ce qui est important pour l'analyse des intégrations et des attributions.

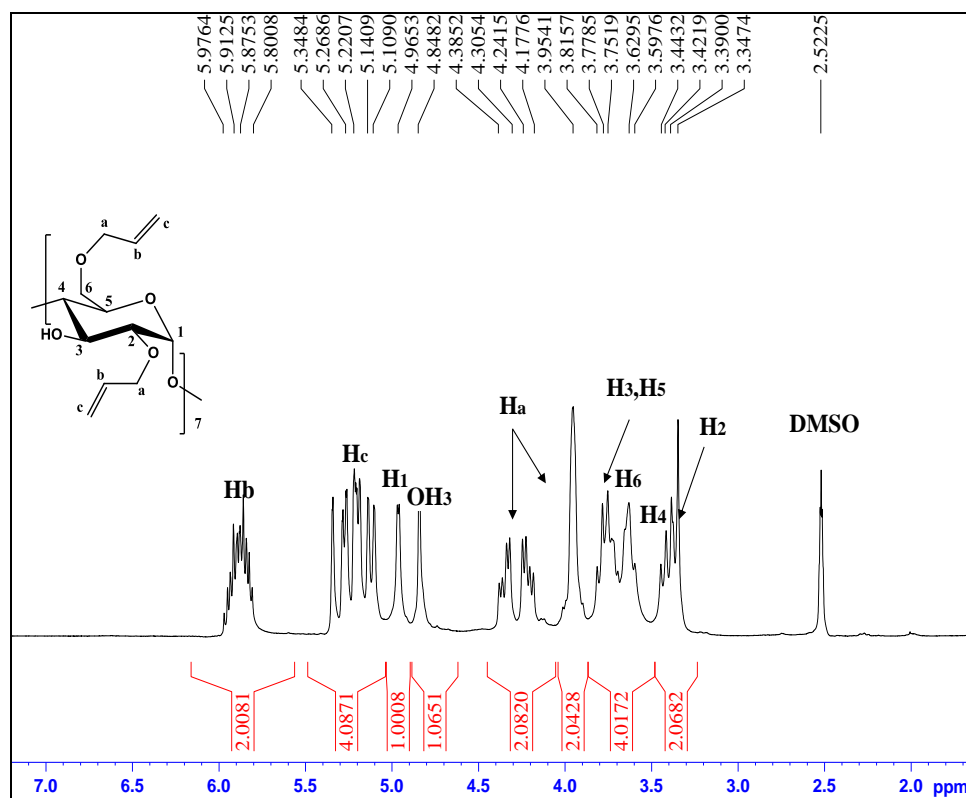
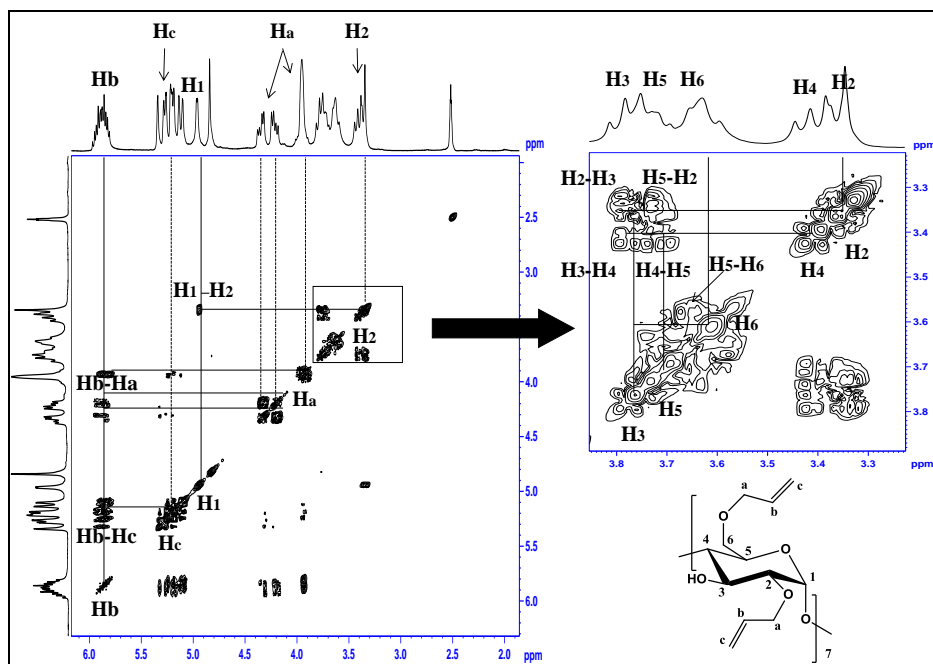
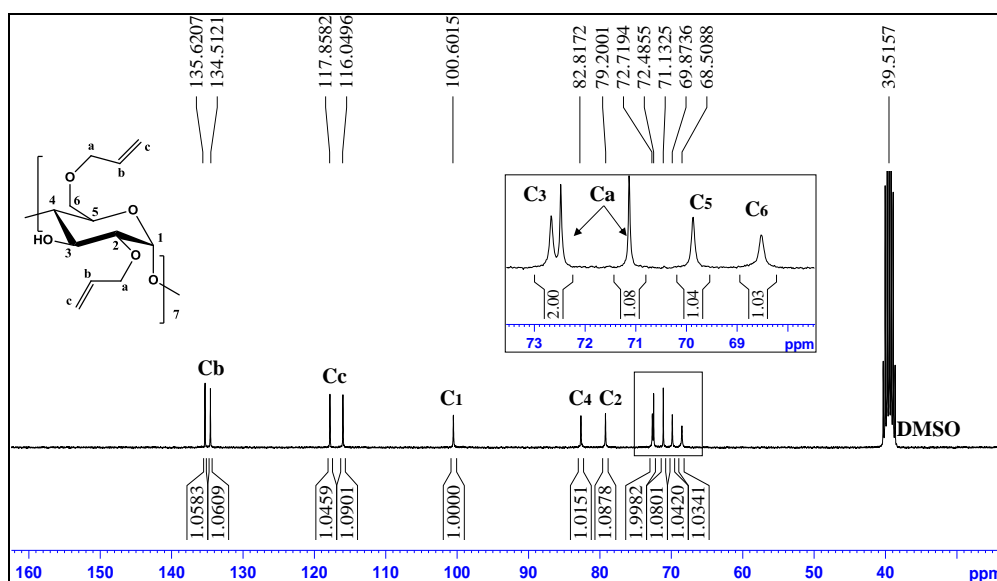


FIG. II.4 - Spectre RMN ^1H dans le DMSO- d_6 de la per(2,6-di-O-allyl)- β -CD (ZE52 pur)

Sur le spectre RMN ^1H de la figure II-4, correspondant au composé ZE52 purifié, nous pouvons observer l'apparition de trois massifs correspondant aux groupements allyle ainsi que la disparition des pics correspondant aux fonctions hydroxyle OH-2 et OH-6. Par ailleurs, le pic attribué au proton anomérique est fin. Ces résultats tendent à prouver une absence de modification des fonctions hydroxyle OH-3 et vont dans le sens de l'obtention d'une molécule dont toutes les unités glucopyranose sont substituées par les mêmes groupements. En outre, les intégrations sont parfaitement en accord avec ceux attendus dans le cas d'une permodification des fonctions hydroxyle OH-2 et OH-6 par des groupements allyle. Au vu de ce spectre, l'obtention du produit attendu semble être confirmée, impliquant une purification parfaite des mélanges que nous avons vue précédemment. L'attribution des signaux du spectre précédent (figure II-4) a été effectuée grâce à une analyse RMN 2D (COSY) reportée sur la figure II-6.


 FIG. II.5 - Spectre RMN 2D (COSY) du composé ZE52 pur dans le DMSO- d_6

Le spectre précédent nous permet de constater la corrélation entre le proton anomérique et le proton situé en position 2 des unités glucopyranoses (H_1 - H_2). Cette corrélation permet ensuite de déterminer ceux des différents protons qui composent la cyclodextrine (zoom de 3,2 à 3,9 ppm) et d'attribuer ainsi les différents pics dans cette zone. De même, une analyse par RMN 2D (HMQC) a été effectuée et a permis d'attribuer les différents signaux du spectre RMN ^{13}C reporté sur la figure II-6.


 FIG. II.6 - Spectre RMN ^{13}C de la per(2,6-di-O-allyl)- β -CD (ZE52 pur) dans le DMSO- d_6

Sur le spectre RMN ^{13}C de la figure II-6, l'apparition de pics correspondant aux groupements allyle, ainsi que la forme fine du pic du carbone anomérique et enfin les intégrations des différents pics sont autant d'éléments qui tendent à prouver la formation de la per(2,6-di-O-allyl)- β -CD.

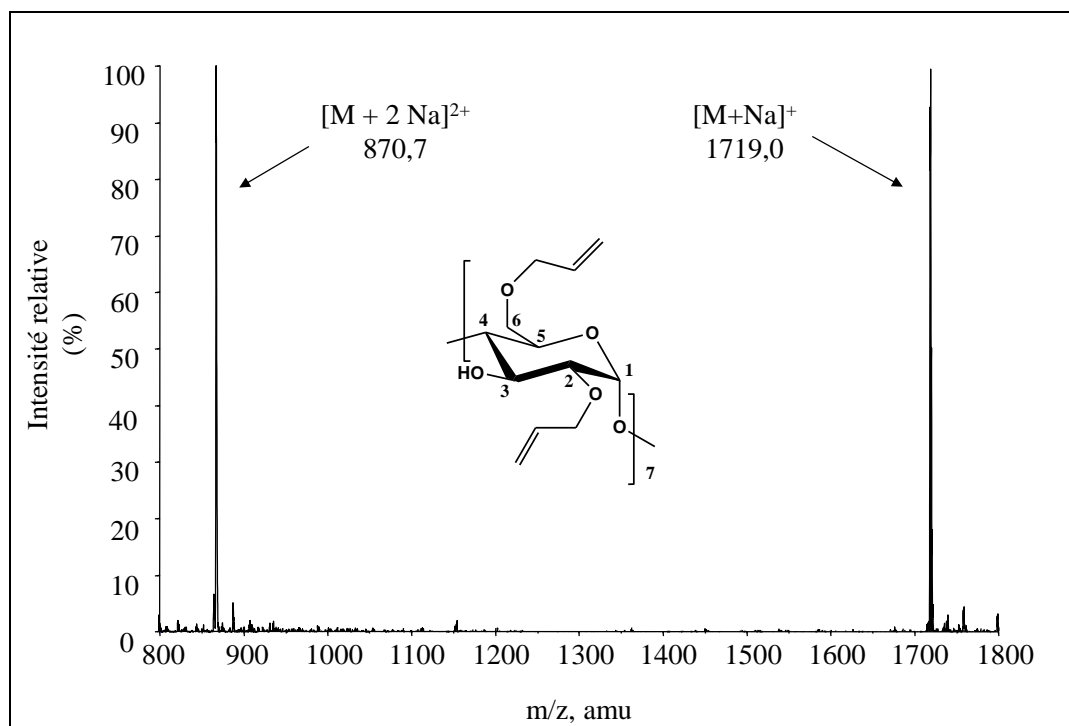


FIG. II.7 - Spectre ESI-MS du composé per(2,6-di-O-allyl)- β -CD (composé ZE52 pur) dans un mélange méthanol/chloroforme (9:1)

Sur le spectre de masse du composé ZE52 (figure II-7), les pics observés à 870,7 amu et 1719,0 amu correspondent au composé per(2,6-di-O-allyl)- β -CD) qui est respectivement sous la forme dichargée et monochargée par du sodium. Ces résultats confirment l'obtention de la per(2,6-di-O-allyl)- β -CD.

Les per(2,6-di-O-allyl)-(α,γ)-CDs (ZE121 et ZE174) ont également été obtenues avec succès et leurs structures ont été déterminées par RMN et par spectrométrie de masse. Les spectres RMN de ces composés étant similaires à celui de per(2,6-di-O-allyl)- β -CD, nous ne présenterons que les résultats par spectrométrie de masse (figure II-8 et II-9).

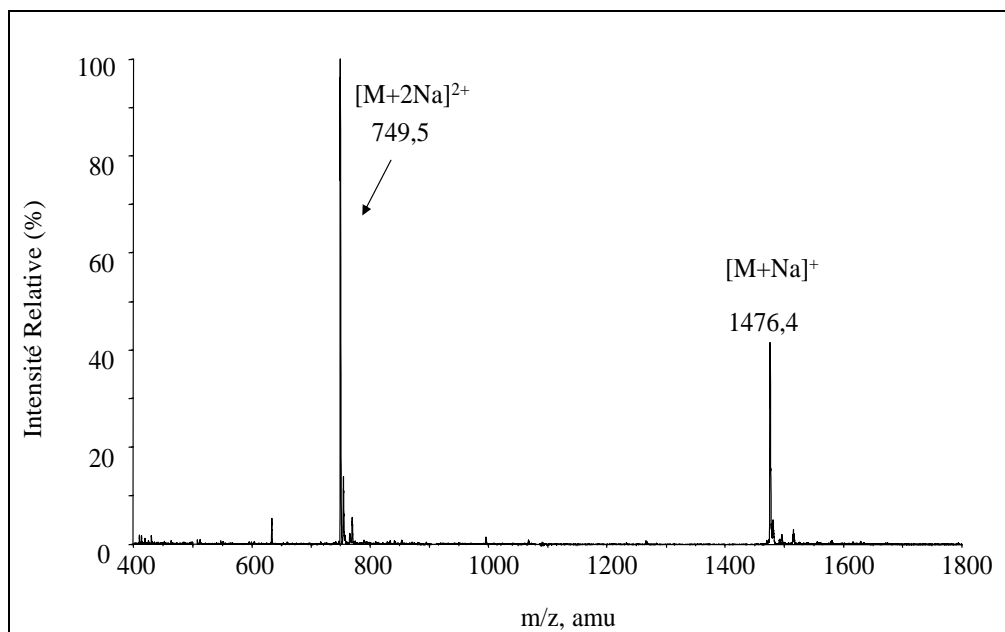


FIG. II.8 - Spectre ESI-MS du composé per(2,6-di-O-allyl)- α -CD (ZE121 pur)
dans un mélange méthanol/chloroforme (9:1)

Sur la figure II-8, apparaissent deux pics à 1163,4 amu et 1179,4 amu correspondant à la per(2,6-di-O-allyl)- α -CD qui est respectivement sous la forme dichargée et monochargée par du sodium.

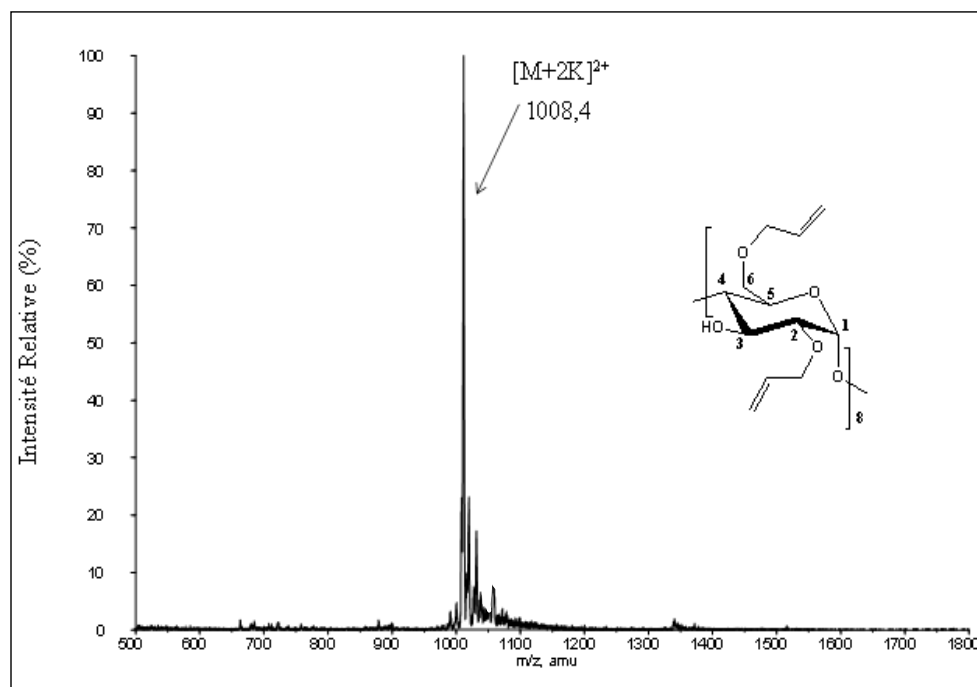


FIG. II.9 - Spectre ESI-MS du composé per(2,6-di-O-allyl)- γ -CD (ZE174 pur)
dans un mélange méthanol/chloroforme (9:1)

Sur la figure II-9, le pic à 1008,4 amu est attribué au composé attendu cationisé par du potassium.

II.3.4. Conclusion

Nous avons synthétisé la per(2,6-di-O-allyl)- β -CD selon les conditions standard de la littérature puis nous avons revisité les conditions de synthèse et de purification. Bien que la synthèse de cette molécule ait déjà été reportée, nous avons amélioré son rendement et sa pureté, indispensables pour les applications envisagées. Nous avons élargi cette synthèse aux composés α et γ -CDs, de réactivité très différente, impliquant des conditions opératoires spécifiques. Les molécules ainsi obtenues vont subir une méthylation des fonctions hydroxyle en position 3, ce qui constitue la seconde étape.

II.4. Perméthylation des fonctions hydroxyle en position 3

II.4.1. Introduction

La seconde étape de la modification des cyclodextrines est schématisée par la figure II-10, et va consister à dérivatiser les fonctions hydroxyle en position 3 par des groupements méthyle, selon la méthode proposée par Bergeron⁹.

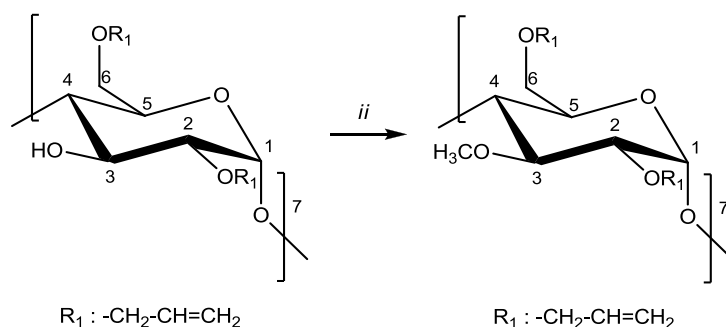


FIG. II.10 - Méthylation des fonctions hydroxyle en position 3 en présence de NaH, MeI, DMF à température ambiante

La synthèse décrite sur la figure II-10 est menée de manière à transformer efficacement toutes les fonctions hydroxyle en position 3 en alcoolate par ajout d'hydruure de sodium

(NaH), ce qui permet de fixer par la suite des groupements méthyle par addition d'iodométhane. La réaction est menée à température ambiante dans la DMF.

II.4.2. Expériences de perméthylation

Le tableau II-5 récapitule les expériences menées dans le but de modifier les fonctions hydroxyle en position 3 de la β -CD. La première expérience nommée ZE18 est réalisée dans les conditions exactes décrites par Bergeron¹⁷ et va servir de référence.

Tableau II-5 : Expériences de méthylation des fonctions hydroxyle en position 3 réalisées dans la DMF à température ambiante

Exp ^{ce}	$\frac{\text{NaH}}{[\text{OH}_3]}$ (Eq.)	$\frac{\text{MeI}}{[\text{OH}_3]}$ (Eq.)	Réaction avec NaH	Réaction avec MeI	Rdt (%)**	Taux de modification (%)***
ZE18	<u>1,25</u>	2,5	30min	24h	92	72
ZE31	<u>2,5</u>	2,5	<u>30min</u>	24h	95	90
ZE33	<u>5</u>	2,5	<u>30min</u>	24h	85	100
ZE60	<u>5</u>	<u>2,5</u>	2h30	24h	94	100
ZE35*	<u>5</u>	<u>2,5</u>	2h30*2	24h*2	99	100
ZE67	5	<u>3</u>	2h30	24h	99	100

* DMF remplacée par un mélange THF/HMPT

**dans le cas d'une modification totale

***déterminé par RMN ¹H et ¹³C

Dans le tableau précédent, nous pouvons constater que l'augmentation de la quantité d'hydruure de sodium introduite, permet d'améliorer nettement le taux de modification. En effet un rapport [NaH]/[OH₃] de l'ordre de 5 est nécessaire pour permodifier les fonctions hydroxyle en position 3 (ZE31/ZE33). Par ailleurs, une augmentation du temps de réaction avec la base (ZE33/ZE60), ainsi qu'une légère augmentation de la quantité d'iodométhane (ZE60/ZE67) permettent d'améliorer la synthèse et d'obtenir le produit attendu avec un rendement de 99%.

De plus, cette manipulation peut être réalisée en deux temps, comme le suggère Jullien et al.⁵, qui ont méthylé des dérivés per(2,6-di-O-benzyl)- β -CD, avec un rendement de 75%. Dans notre cas, l'expérience ZE35 a consisté à faire réagir la cyclodextrine avec le NaH

durant 2h30, puis l'iodométhane est ajouté et la réaction est menée pendant 24h. Après ce laps de temps, nous ajoutons à nouveau du NaH puis de l'iodométhane dans les mêmes proportions et avec les mêmes temps de réaction que précédemment. Nous avons ainsi obtenu un rendement de 99%. La réaction est donc presque totale et s'explique par le fait que nous avons eu recours à une simple purification par recristallisation⁹ et non à une purification par colonne chromatographique, comme le propose Jullien et al.⁵. Cela a suffi à obtenir un produit avec un haut degré de pureté. En effet, d'une part, le produit de départ, le per(2,6-di-O-allyl)- β -CD, est parfaitement pur, comme nous l'avons vu précédemment, et d'autre part, la réaction de méthylation est totale, donc le produit final obtenu est un composé unique et non un mélange. Nous avons donc pu nous affranchir d'une colonne chromatographique. Cependant, malgré ce rendement très élevé, les conditions opératoires de la synthèse ZE67 sont préférées : il est aisé de constater que celui-ci requiert des quantités de réactif et des temps de réaction plus faibles, pour un rendement identique.

Des analyses spectroscopiques RMN ^1H , ^{13}C et 2D (COSY et HMQC) ont été effectuées afin de confirmer la structure du composé. Les figures II-11, II-12 présentent respectivement les spectres RMN ^1H et ^{13}C de la per(2,6-di-O-allyl-3-O-méthyl)- β -CD (ZE67).

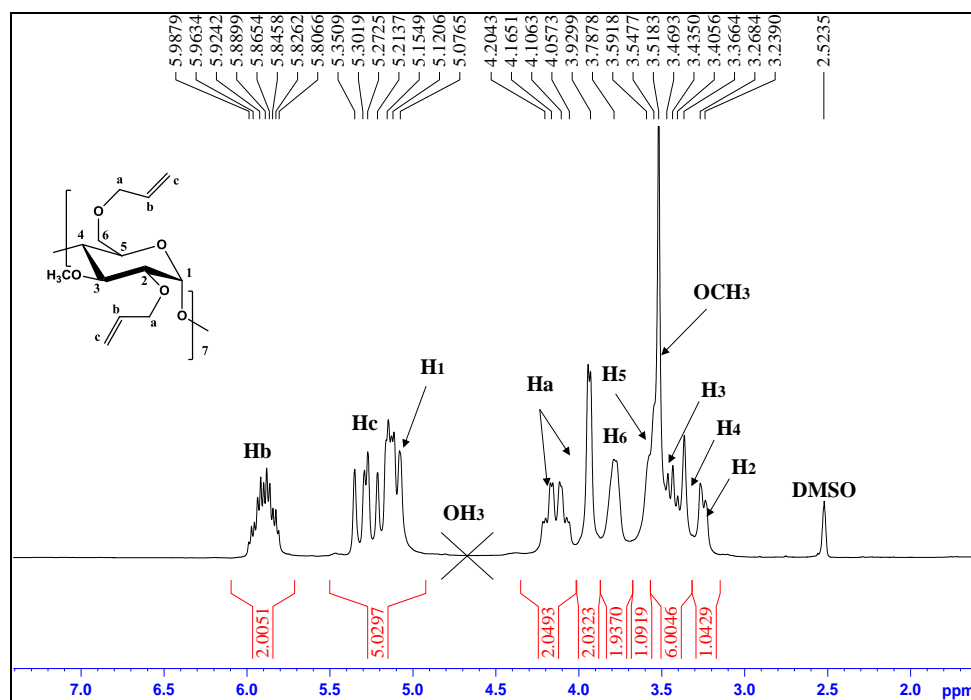


FIG. II.11 - Spectre RMN ^1H de la per(2,6-di-O-allyl-3-O-méthyl)- β -CD (ZE67) dans le DMSO- d_6

En comparant le spectre RMN de la figure de II-11 à celui de la figure II-4, nous pouvons observer l'apparition d'un pic correspondant aux groupements méthyle. Par ailleurs, sur le spectre entre 4 et 7 ppm, l'absence des pics correspondant aux fonctions hydroxyle en position 3 tend à prouver leur modification. Au vue de ce spectre RMN, l'expérience semble ne pas avoir conduit à un mélange de produits. Pour confirmer complètement ces résultats, une analyse RMN du carbone a été effectuée et le résultat est donné figure II-12.

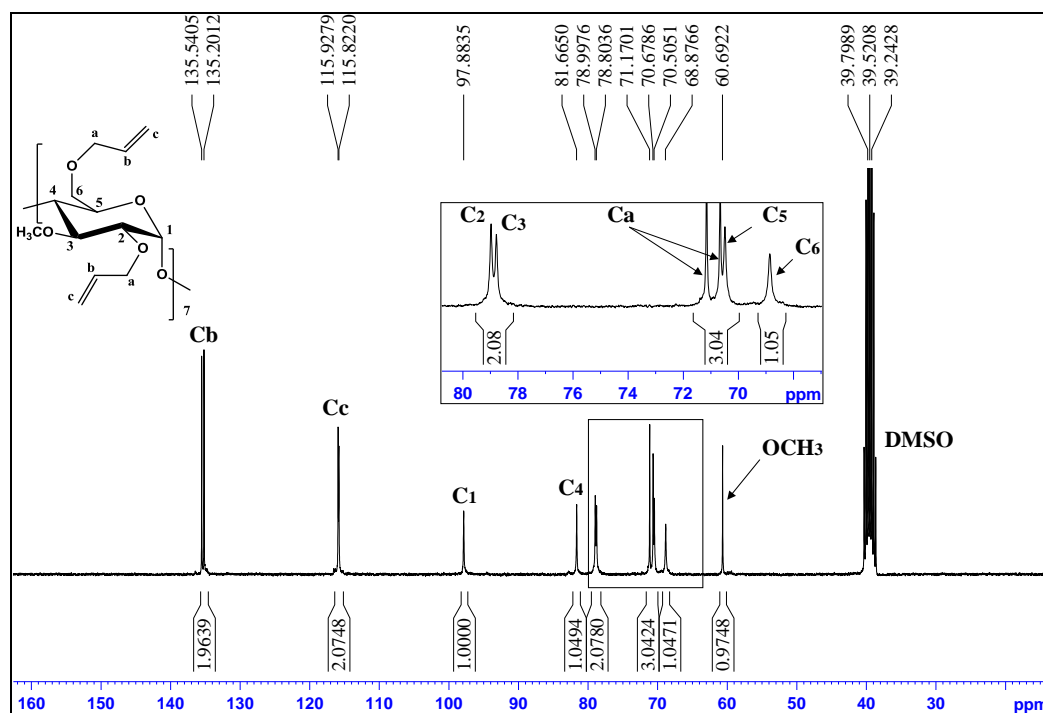


FIG. II.12 - Spectre RMN ^{13}C de la per(2,6-di-O-allyl-3-O-méthyl)- β -CD (ZE67) dans le DMSO-d_6

Le spectre précédant confirme les résultats observés précédemment, à savoir la présence de groupements O-méthyle à 60,6 ppm. Finalement, nous présentons les résultats obtenus par spectrométrie de masse par ionisation électrospray sur la figure II-13.

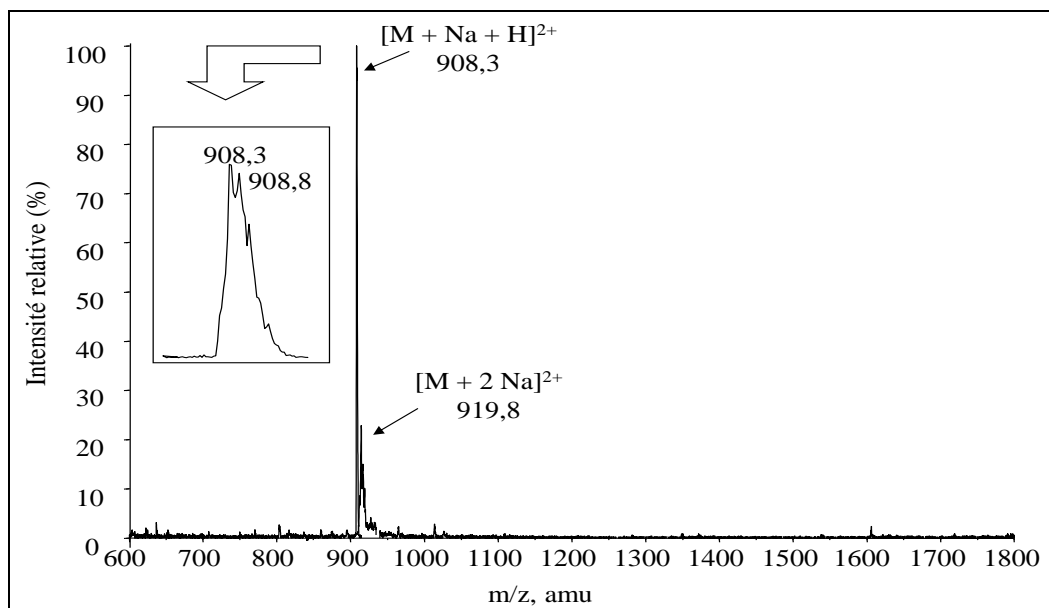


FIG. II.13 - Spectre ESI-MS du composé per(2,6-di-O-allyl-3-O-méthyl)- β -CD dans un mélange méthanol/chloroforme (9:1)

Sur la figure précédente, les signaux à 908,3 ppm et 919,8 ppm correspondent à la per(2,6-di-O-allyl-3-O-méthyl)- β -CD cationisée respectivement par des ions sodium et hydrure puis par deux ions sodium, ce qui confirme l'obtention de la per(2,6-di-O-allyl-3-O-méthyl)- β -CD.

II.4.3. Conclusion

La modification des per(2,6-di-O-allyl)- β -CDs par des groupements méthyle a été réalisée avec un rendement presque total (99%). Par ailleurs, la purification ne nécessite pas de colonne chromatographique mais une simple recristallisation, et permet d'aboutir au composé per(2,6-di-O-allyl-3-O-méthyl)- β -CD, très pur. Les analyses par RMN ^1H , ^{13}C et 2D (COSY) combinées à une analyse spectrométrique (ESI-MS) permettent d'établir le degré de pureté de la molécule finale. Les composés ainsi obtenus vont être engagés dans la dernière étape de synthèse qui consiste à oxyder toutes les fonctions allyle.

II.5. Hydroboration oxydative des fonctions allyle

II.5.1. Introduction

La dernière étape de la synthèse de la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD va s'achever par la transformation de toutes les fonctions allyle du composé per(2,6-di-O-allyl-3-O-méthyl)- β -CD en chaînes hydroxypropyle. Cette synthèse a été décrite par Dandoni¹⁷ et adaptée aux cyclodextrines par Badi³.

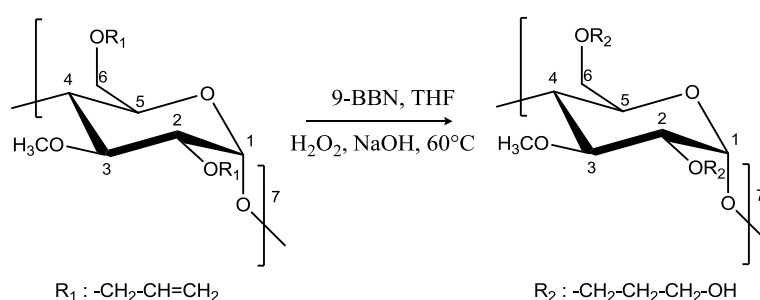


FIG. II.14 - Troisième étape : hydroboration oxydative des fonctions allyle

La synthèse menée sur la figure II-14, est réalisée en deux temps. Tout d'abord, la cyclodextrine est mise en présence de 9-borabicyclo[3.3.1]nonane (9-BBN) dans du THF, suivi de l'ajout d'hydroxyde de sodium et d'eau oxygénée.

II.5.2. Synthèse des per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD

Le tableau II-6 récapitule les expériences réalisées afin d'obtenir le dérivé per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD dans le THF. L'expérience ZE12 est réalisée dans les conditions expérimentales de Badi³ pour oxyder les fonctions allyle des per(2,3,6-hydroxypropyl)- β -CD.

Tableau II-6 : Conditions opératoires employées lors de la synthèse des dérivés per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD dans le THF

Exp ^{ce}	[9-BBN] [allyl]	[NaOH] [allyl]	[H ₂ O ₂] [allyl]	Réaction 9-BBN	Réaction NaOH et H ₂ O ₂	Rdts * (%)	Degré de modifi- cation **
ZE12	1,3	2,7	27	4h à Tamb	24h à 60°C	40	Partielle
ZE66	1,3	2,7	27	48h à Tamb	64h à 60°C	55	Totale
ZE159	2	2,7	27	48h à Tamb	64h à 60°C	65	Totale

* rendements massiques dans l'hypothèse d'une modification totale

**déterminé par RMN ¹H et ¹³C

Dans le tableau précédent, il est aisé de constater que l'augmentation du temps de réaction, ainsi que la quantité de 9-BBN, permettent d'améliorer la synthèse.

La difficulté de cette réaction réside dans la purification des composés, qui consistent à éliminer le cyclooctanediol produit durant la synthèse, comme le montre le spectre RMN ¹H du composé non traité sur la figure II-15

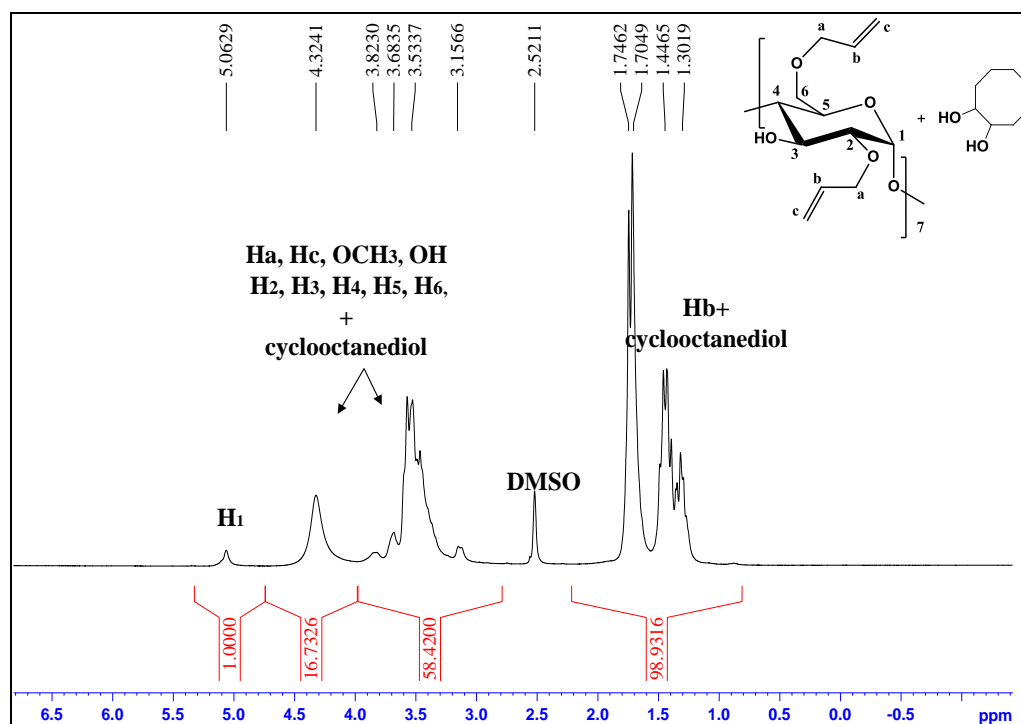


FIG. II.15 - Spectre RMN ¹H de la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD (ZE159) avant traitement dans le DMSO-d₆

Sur le spectre précédent, nous pouvons observer l'importance de la proportion de cyclooctanediol dans le composé brut. Or, il est primordial d'obtenir, pour les applications de polymérisation anionique d'oxyde d'éthylène, une molécule exempte d'eau ou de cyclooctanediol, capable d'amorcer la polymérisation. Un traitement par extraction à l'éther à 60°C, répété à de nombreuses reprises, permet de s'affranchir totalement du cyclooctanediol, comme le suggère la figure II-16.

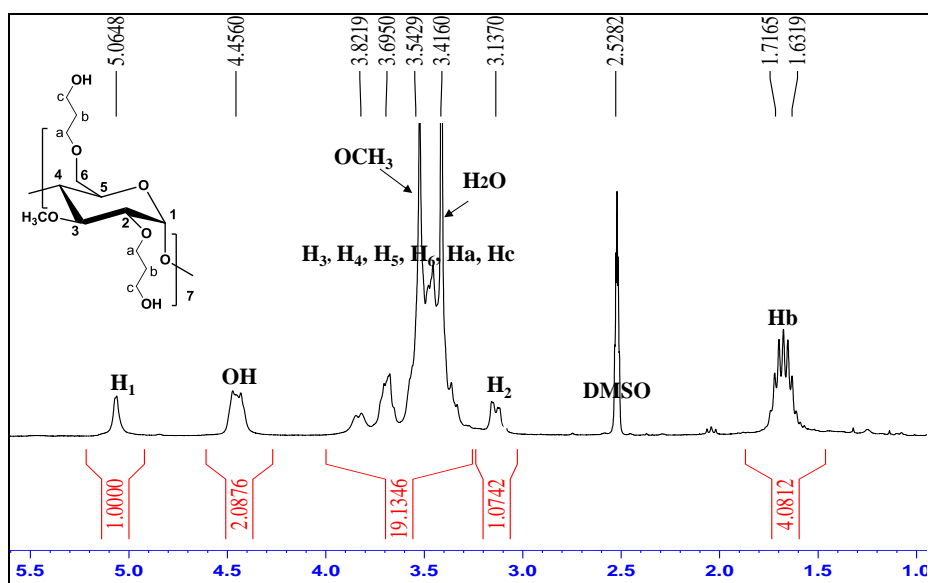


FIG. II.16 - Spectre RMN ^1H de la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD (ZE159) après traitement dans le DMSO- d_6

Sur ce spectre nous pouvons observer la disparition des pics du cyclooctanediol. Par ailleurs, en comparant le spectre RMN de la figure II-16, à celui d'une cyclodextrine native, nous pouvons constater l'apparition de deux pics à 1,67 ppm et 4,43 ppm correspondant aux protons Hb et -OH des fonctions hydroxypropyle qui se sont substituées aux fonctions allyle en positions 2 et 6. En outre, le pic à 5,06 ppm attribué au proton anomérique (H_1) est unique et fin. Au vue de ce spectre RMN, l'expérience semble avoir conduit au produit désiré. Notons que les spectres RMN 2D COSY et HMQC n'ont pas permis d'attribuer précisément les pics dans le massif entre 3,2 et 3,8 ppm. Afin de confirmer complètement ce résultat, le produit final est analysé par RMN ^{13}C (figure II-17) et par spectrométrie de masse par ionisation électrospray (figure II-18).

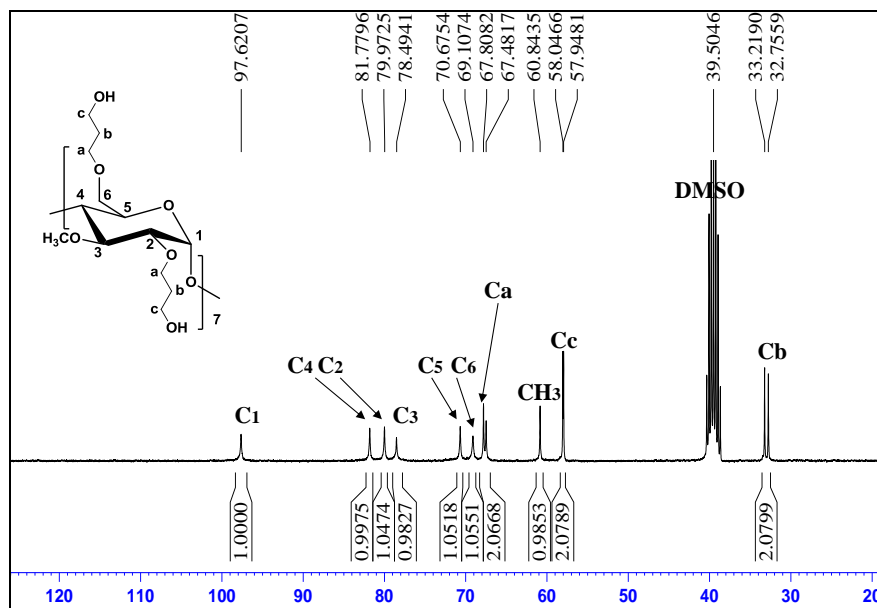


FIG. II.17 - Spectre RMN ^{13}C de la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD (ZE159) dans le DMSO-d_6

En comparant le spectre précédant avec celui de la figure II-12, nous pouvons constater la disparition des pics correspondant aux groupements allyle et l'apparition des pics correspondant aux carbones des groupements hydroxyle. Aussi, les intégrations des différents pics et la forme fine du pic attribué au carbone anomérique, sont autant d'éléments qui prouvent la formation de la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD.

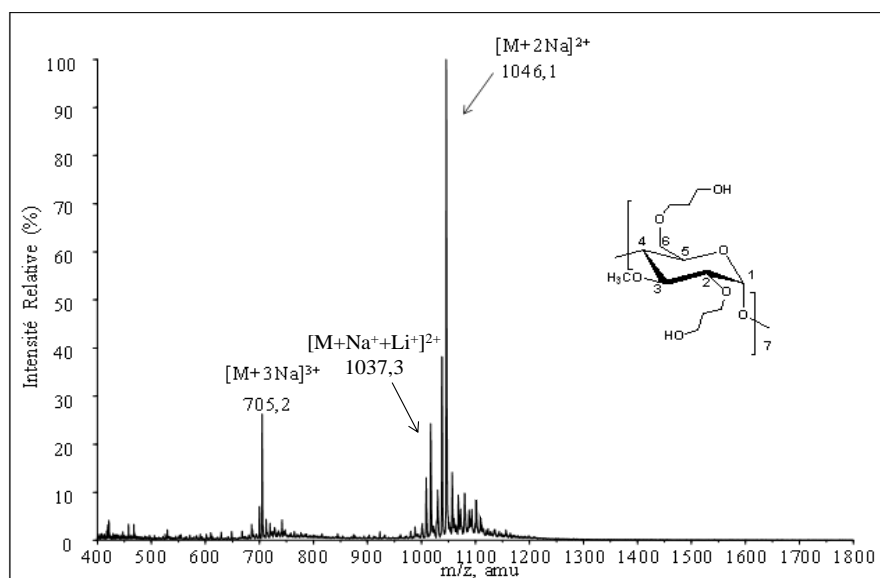


FIG. II.18 - Spectre ESI-MS du composé (per-2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD dans un mélange méthanol/eau (5:5)

Les pics observés à 705,2 amu et 1046,1 amu sur la figure II-22 correspondent au composé per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD respectivement trichargée et dichargée par du sodium. Les analyses par RMN et par spectrométrie de masse sont en accord et apportent la preuve de l'obtention du composé souhaité. Par manque de temps, cette réaction n'a pas été réalisée sur les composés α - et γ -CDs.

II.6. Conclusion générale sur les modifications chimiques sélectives

Les modifications chimiques sélectives des cyclodextrines restent un défi pour les chimistes. En effet, la difficulté provient des facteurs stériques et statistiques engendrés par la différence de réactivité des fonctions hydroxyle. De manière générale, ces modifications chimiques conduisent à des mélanges de produits de degrés de substitution variables, conduisant à des rendements faibles. Néanmoins, les composés désirés sont parfaitement isolés, ce qui est essentiel pour obtenir une architecture précise, et, de manière plus large, pour les applications envisagées. La structure du produit et son degré de pureté sont déterminés par des analyses spectroscopiques combinées à des analyses spectrométriques.

Nous avons décrit dans ce chapitre, la synthèse du macro-amorceur (per-2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD, de structure parfaitement définie et de forme cylindrique, impliquant la présence, sur chaque face, d'un nombre équivalent de groupements propyle, avec des fonctions hydroxyle terminales de même réactivité, indispensable à la polymérisation anionique contrôlée des oxiranes, pour la réalisation de polymères en étoile.

Références bibliographiques du chapitre II

1. Topchieva, I. N. ; Mischnick, P. ; Kühn, G. ; Polyakov, V. A. ; Elezkaya, S. V. ; Bystryzky, G. I. ; Karezin, K. I. ; Novel derivatives of cyclodextrins, modified with poly(ethylene oxide) and their complexation properties, *Bionconjugate Chem.* **1998**, 9, 676-682.
2. Badi, N.; Auvray, L.; Guégan, P.; Synthesis of Half-Channels by the Anionic Polymerization of Ethylene Oxide Initiated by Modified Cyclodextrin, *Advanced Materials* **2009**, 21, 40, 4054-4057.
3. Badi, N. ; Guégan, P.; Per-O-(3-hydroxy)propyl - β -cyclodextrin : a cyclodextrin derivative bearing only primary hydroxyl groups, *Carbohydr. Res.*, **2007**, 14, 1989-1991.
4. Badi, N. ; Polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène amorcée par des cyclodextrines modifiées : application à l'étude des canaux artificiels, *Thèse de doctorat d l'université d'Evry-Val-d'Essonne* **2006**.
5. Canceill, J.; Jullien, L.; Lacombe, L.; Lehn, J-M; Synthesis of Bouquet-Shaped Molecules Based on a β -Cyclodextrin Core, *Helvet. Chim. Acta*, **1992**, 75, 791-812.
6. Pregel, M. J.; Jullien, L.; Canceill, J.; Lacombe, L.; Lehn, J.-M.; Channel-type molecular structures, Part 4. Transmembrane transport of alkali-metal ions by 'bouquet' molecules, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1995**, 2, 417-426.
7. Takeo, K.; A convenient preparation of per-2,6-di-O-methylcyclomalto oligosaccharides, *Carbohydr. Res.*, **1989**, 200, 481-485.
8. Takeo, K.; Mitoh, H.; Uemura, K.; Selective chemical modification of cyclomalto-oligosaccharides via *tert*-butyldimethylsilylation, *Carbohydr. Res.* **1989**, 187, 203-221.
9. Bergeron, R.; Melley, M. P.; Machida, Y.; Selective alkylation of cycloheptaamylose, *Bioorg. Chem.* **1976**, 5, 121.
10. Irie, T. ; Fukunaga, K. ; Pitha, J. ; Uekama, K. ; Fales, H. M. ; Sokolowski, E. A. ; Alkylation of cyclomalto-oligosaccharides (cyclodextrins) with dialkyl sulfate-barium hydroxide: Heterogeneity of products and the marked effect of the size of the macrocycle, *Carbohydr. Res.* **1989**, 192, 167.
11. Armstrong, D. W.; Chang, C.; Relevance of enantiomeric separations in food and beverage analyses, *J. Agric. Food Chem* **1990**, 38, 1674.

12. Armstrong, D. W.; Li, W.; Capillary gas chromatographic separation of enantiomers with stable dipentyl- α -, β - and γ -cyclodextrin-derivatized stationary phases, *Anal. Chim. Acta* **1990**, 234, 365.
13. Hirayama, F.; Kurihara, M.; Horiuchi, Y.; Utuski, T.; Uekama, K.; Yamasaki, M.; Preparation of heptakis(2,6-di-O-ethyl)- β -cyclodextrin and its nuclear magnetic resonance spectroscopic characterization, *Pharm. Res.* **1993**, 10, 208.
14. Bates, P. S., Parker, D., Patti, A. F. Synthesis and spectroscopic characterisation of lipophilic octylated α -, β - and γ -cyclodextrin derivatives; *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, **1994**, 657.
15. Bansal, P. S.; Francis, C. L.; Hart, N. K.; Henderson, S. A.; Oakenfull, D.; Robertson, A. D.; Simpson, G. W., Regioselective alkylation of β -cyclodextrin, *Aust. J. Chem.* **1998**, 51, 915-923.
16. Fulton, D.A.; Stoddart, J.F.; Synthesis of cyclodextrin-based carbohydrate clusters by photoaddition reactions, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8309-8319.
17. Dondoni, A.; Kleban, M.; Hu, X.; Marra, A.; Banks H. D., Glycoside-Clustering Round Calixarenes toward the development of Multivalent Carbohydrate Ligands. Synthesis and Conformational Analysis of Calix[4]arene O- and C-Glycoconjugates, *J. Org. Chem.*, **2002**67, 4722-4733.

Chapitre III : Polymérisation anionique des oxiranes

III.1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit la synthèse des per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CDs, possédant 14 bras espaceurs et autant de fonctions hydroxyle de même classe, réparties équitablement de part et d'autre du cône tronqué de la cyclodextrine. Ces composés vont servir de macro-amorceurs à la polymérisation anionique d'oxiranes, aboutissant notamment à l'obtention de chaînes de poly(oxyde d'éthylène) amphiphiles qui améliorent le caractère hydrosoluble de la macromolécule. Cette méthode, comparée à celle envisagée par Lehn et al.^{1,2} qui consiste à greffer des chaînes de POE sur des dérivés de CDs, présente l'avantage d'être une méthode très versatile.

L'objectif de ce chapitre est d'étudier la polymérisation anionique des oxiranes amorcée par des cyclodextrines. Cette technique de synthèse demande des conditions opératoires anhydres drastiques, et une réelle dextérité. C'est pourquoi nous avons effectué préalablement des réactions de polymérisation anionique de l'OE amorcée par l'alcool allylique. Une fois les conditions opératoires validées et le savoir-faire acquis sur un système simplifié, nous avons alors entrepris la polymérisation anionique d'oxyde d'éthylène amorcée par la cyclodextrine native. Les rares exemples rapportés par la littérature nous ont conduit à étudier notamment la réactivité des différentes fonctions hydroxyle qui composent la cyclodextrine. Fort de ces connaissances, nous utiliserons les dérivés per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CDs en tant qu'amorceur de la polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène et de l'oxyde de propylène afin de former des polymères en étoile à cœur cyclodextrine et à branches de polyoxiranes.

III.2. Polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène amorcée par l'alcool allylique

Pour mener à bien la polymérisation anionique par ouverture de cycle, des conditions opératoires anhydres sont indispensables. Afin de valider la méthode de polymérisation, à savoir les conditions de séchage des réactifs, l'utilisation de la DMF en tant que solvant et du diphenyl méthyl potassium (DPMK) comme agent déprotonant, nous avons réalisé la polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène sur un système simplifié : l'alcool allylique. Les polymères linéaires α -allyl- ω -hydroxy-POE ont été décrits initialement par Cammas et al.³ en 1999. Contrairement à ces auteurs qui travaillent dans le THF, nous avons fait le choix de la diméthylformamide (DMF), car celle-ci présente l'avantage de solubiliser parfaitement de très nombreux dérivés de cyclodextrines, ce qui n'est pas le cas du THF. La DMF présente également un bon pouvoir dissociant, ce qui permet de minimiser la formation d'agrégats susceptibles d'empêcher la polymérisation. Enfin, dans les conditions standards de polymérisation anionique, la DMF est considérée comme un solvant inerte vis-à-vis des réactions de transfert au solvant. Ainsi, les polymérisations anioniques en solution décrites dans la partie qui suit, sont menées à 40°C en présence d'alcool allylique dissous dans de la DMF, de l'agent déprotonant (le DPMK), et de l'oxyde d'éthylène condensé. Les polymères α -allyl- ω -hydroxy-POE ainsi obtenus peuvent être greffés à des cyclodextrines par « click-chemistry », pour former des polymères en étoile selon une stratégie convergente⁴.

III.2.1. Présentation des polymérisations sur l'alcool allylique

Le tableau III-1 récapitule les réactions de polymérisations anioniques de l'oxyde d'éthylène amorcées par l'alcool allylique. Elles sont menées sous vide, pendant 5 jours à 40°C dans la DMF, après séchage de l'alcool allylique sur tamis moléculaire.

Tableau III-1 : Polymérisation amorcée par l'alcool allylique pendant 5 jours à 40°C en présence de DPMK (10% / [OH])

Exp ^{ce}	[OE] mol.L ⁻¹	[OH] mol.L ⁻¹	Rdt ^{*i)} (%)	\overline{Mn} théorique ^{*ii)} g.mol ⁻¹	\overline{Mn} RMN g.mol ⁻¹	\overline{Mn} SEC g.mol ⁻¹	IP
ZE133	2	9,9.10 ⁻²	94	700	650	620	1,1
ZE 130	4	9,9.10 ⁻²	95	1400	1320	1100	1,1

*i) $Rdt = (m_{\text{polymère}} - m_{\text{CD introduite}}) / m_{\text{OE}}$

*ii) corrigée par le rendement de polymérisation

Le tableau III-1 montre l'influence de la concentration en monomère sur la masse molaire obtenue, qui est très proche de celle visée. Les polymères ZE133 et ZE130 sont ainsi obtenus avec des rendements presque totaux et des indices de polymolécularité proche de 1, indiquant le contrôle de la polymérisation.

Afin de vérifier l'efficacité des protocoles de séchage des réactifs, une analyse spectroscopique est effectuée sur les polymères. Par exemple, le spectre RMN ¹H de la macromolécule ZE130 est reporté sur la figure III-1.

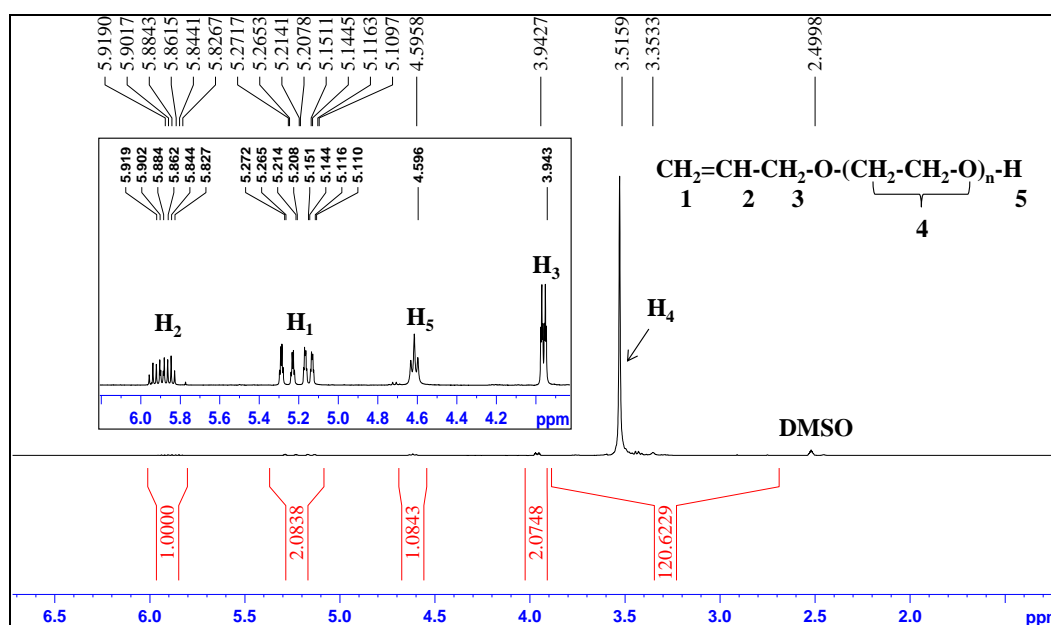


FIG. III.1 - Spectre RMN ¹H de l'α-allyl-ω-hydroxy-POE (ZE130) dans le DMSO à 25°C

Sur le spectre RMN ^1H du polymère ZE130, nous pouvons observer entre 3,0 et 3,8 ppm, la présence d'un massif relatif aux chaînes de POE (H_4). La masse molaire moyenne en nombre de ce polymère est estimée en comparant les intégrations des protons allyle (H_1) résonnant sous la forme de massif entre 5,8 à 5,9 ppm aux intégrations de la chaîne POE (H_4). En outre, le rapport d'intégration des protons allyle (H_1) et des protons des fonctions hydroxyle (H_5) est égal à 2, ce qui met en évidence l'absence de α - ω -dihydroxy-POE (POE-diOH). Celui-ci est issu de l'amorçage de l'oxyde d'éthylène par de l'hydroxyde de potassium, formé à partir de l'eau résiduelle dans le milieu et du contre-ion potassium de l'agent déprotonant, le diphenyl méthyl potassium (DPMK). De manière générale, l'eau peut provenir de la verrerie, des différents réactifs ou bien du solvant. Ce résultat prouve l'efficacité de la purification effectuée pour cette synthèse.

Afin de confirmer ces résultats, la fonctionnalité de ce polymère (ZE130) est déterminée par RMN ^{13}C (figure III-2).

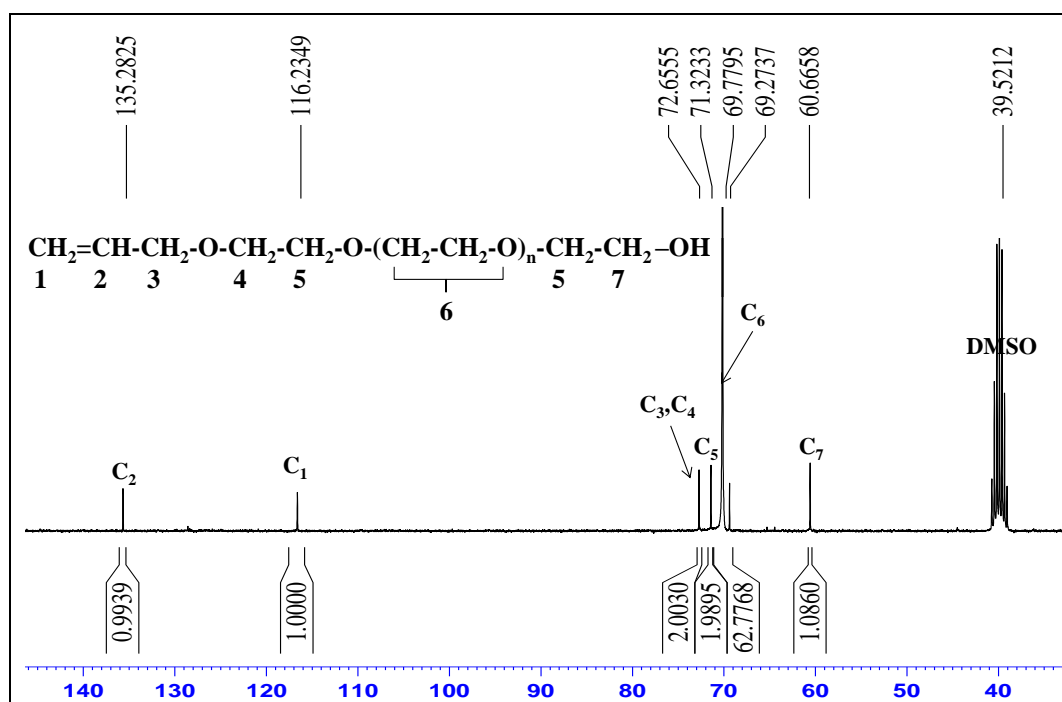


FIG. III.2 - Spectre RMN ^{13}C inverse gate de l' α -allyl- ω -hydroxy-POE (ZE130) dans le DMSO à 25°C

Sur le spectre de la figure III-2, nous pouvons constater que le rapport des intégrations des signaux des carbones secondaires des fonctions allyle (C_1) et des carbones méthyléniques (C_7) vaut 1, ce qui montre que les polymères obtenus possèdent autant de

fonctions hydroxyle que de fonctions allyle en bout de chaînes, ce qui tend à prouver l'obtention d'une seule population correspondant à l' α -allyl- ω -hydroxy-POE. Ce résultat confirme les observations faites lors de l'analyse du spectre RMN ^1H , à savoir l'efficacité du séchage des réactifs impliquant l'absence de formation de POE-diOH.

Enfin, afin de confirmer la masse molaire moyenne en nombre pour ce polymère (ZE130), une analyse par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est effectuée. Le chromatogramme SEC du polymère ZE130 est donné figure III-3.

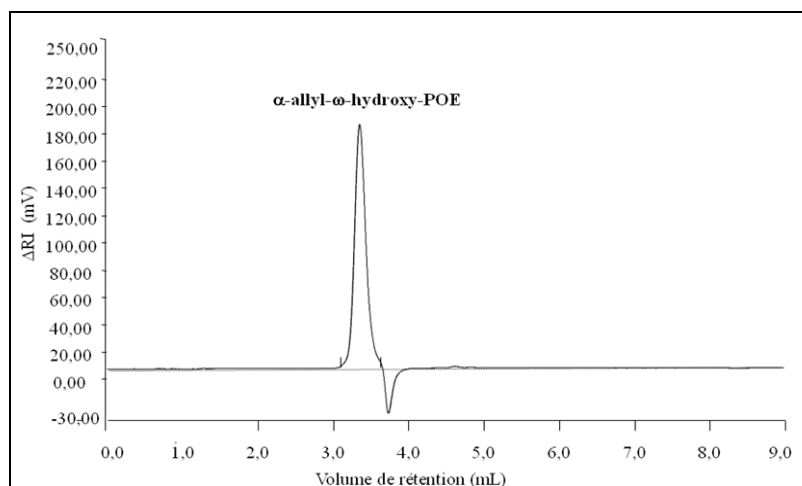


FIG. III.3 - Chromatogramme SEC de l' α -allyl- ω -dihydroxy-POE (ZE130)

Sur la figure III-3, nous pouvons constater la présence d'une population unique attribuée au polymère linéaire attendu, ainsi qu'une distribution étroite et une masse molaire moyenne en nombre de 1100 g.mol^{-1} proche de celle obtenue par spectroscopie RMN ^1H .

III.2.2. Conclusion

Les réactions de polymérisations de l'oxyde d'éthylène amorcées par l'alcool allylique ont permis de mettre en place un nouveau protocole de synthèse dans la DMF, de polymères linéaires comportant une extrémité allyle. Ces derniers sont obtenus avec des rendements très élevés et sans formation de POE-diOH, ce qui prouve l'efficacité des protocoles de séchage des réactifs et du solvant. Fort de ces expériences, nous allons étudier la polymérisation anionique amorcée par la cyclodextrine native, composés de 21 fonctions hydroxyle, connue pour sa propension à complexer des molécules d'eau malgré les différents protocoles de purification répertoriés⁵.

III.3. Polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène amorcée la cyclodextrine native

La polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène amorcée par la cyclodextrine (CD) native a été décrite pour la première fois par Topchieva et al.^{6,7} Les réactions ont consisté à déprotoner les fonctions hydroxyle de la CD en présence d'une solution de NaCl à 0,9% (pH=11,2) avant l'insertion d'oxyde d'éthylène gazeux à 80°C sous pression réduite. Le faible rendement obtenu à l'issue des travaux a souligné la difficulté d'activation de la totalité des fonctions hydroxyle qui composent la β -CD native. Nous supposons que ce résultat peut également s'expliquer par l'utilisation du contre ion sodium. En effet, dans les milieux polaires solvatants, la taille du cation joue un rôle important quant à sa capacité à être solvaté⁸. Les résultats de ces auteurs ne sont pas concluants : les auteurs ne tirent aucune conclusion concernant les positions modifiées de la cyclodextrine. Ils décrivent l'obtention un polymère en étoile à 21 branches, composée chacune d'une moyenne de 8 à 11 de motifs d'OE. Or les différentes fonctions hydroxyle n'étant pas équiréactives, il paraît peu probable que les vitesses d'amorçage soient semblables sur les trois positions et, par conséquent, que la taille des chaînes de POE soient identiques.

Au laboratoire, la polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène amorcée par la cyclodextrine a été introduite en utilisant un agent de déprotonation tel que le diphenyl méthyl potassium (DPMK) afin de contrôler la molarité⁹⁻¹¹. Une déprotonation partielle des fonctions hydroxyle de la cyclodextrine ($n_{OH} \leq 0,2 n_{DPMK}$), ainsi que l'utilisation du contre ion potassium, et de la DMF, sont autant de paramètres qui ont permis d'améliorer les rendements de polymérisation⁹⁻¹¹. Néanmoins, les masses molaires moyennes en nombre obtenues restent inférieures à celles attendues théoriquement et ce malgré des temps de réaction très longs.

Le but de cette étude est de valider les protocoles décrits par ces différents auteurs⁸⁻¹¹ et de donner des informations supplémentaires, quant à l'architecture des polymères en étoile à branches cyclodextrines, en revisitant l'ordre de réactivité des fonctions hydroxyle proposé par Khan et al¹².

Ce chapitre va débuter par l'étude de l'ordre de réactivité des différentes fonctions hydroxyle impliquées dans la réaction de polymérisation anionique par ouverture de

cycle. Par la suite, nous verrons que la lenteur des réactions de polymérisation n'est pas une limite à l'obtention de macromolécules de tailles très variables. A partir des exemples cités, nous rappellerons les calculs des masses molaires des polymères en étoile à cœur cyclodextrine, par chromatographie d'exclusion stérique et par spectroscopie RMN.

III.3.1. Expériences de polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène amorcée par les CDs natives

Les polymérisations ont été menées dans les conditions expérimentales décrites par Badi et al.^{10,11}. Les cyclodextrines (1 μM , $[\text{OH}] = 9,4 \text{ mol.l}^{-1}$) sont déprotonées en présence de DPMK ($\leq 20\%$ par rapport à la quantité de fonctions hydroxyle) durant 48h. Après ce laps de temps, l'oxyde d'éthylène est introduit et la réaction est menée dans la DMF à 40°C.

Le solvant choisi est la DMF car celui-ci possède un bon pouvoir dissociant et permet de solubiliser parfaitement les dérivés de cyclodextrine, afin de limiter les phénomènes d'agrégation. En effet, une analyse par diffusion dynamique de lumière (DLS) montre que la cyclodextrine unimoléculaire est majoritaire, comme l'indique le diagramme de distribution en nombre de cette solution pour des concentrations en cyclodextrine de 1 μM , représentée sur la figure III-4.

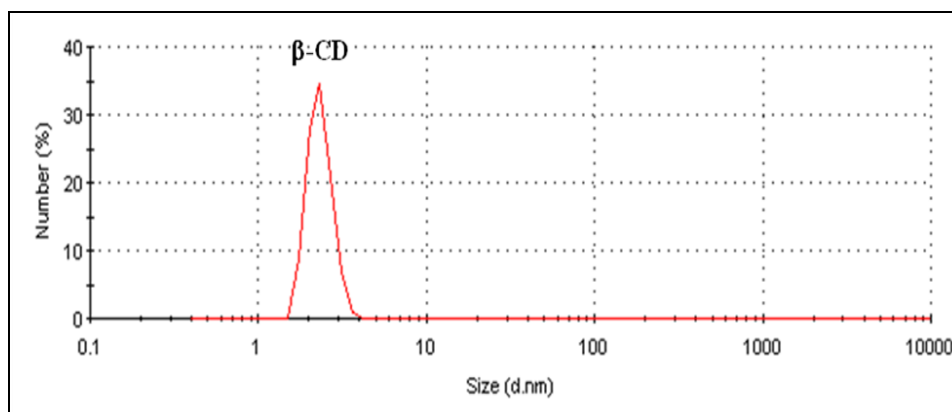


FIG. III.4 - Diagramme représentant la distribution granulométrique en nombre de la β-CD dans la DMF (1 μM)

Il paraît donc judicieux de travailler dans cette gamme de concentration afin de limiter les phénomènes d'agrégation.

Par ailleurs, les chercheurs du laboratoire ont mis en évidence l'importance du séchage des cyclodextrines natives suite à la formation de poly(oxyde d'éthylène) linéaire (POE-diOH)⁹⁻¹¹. Il convient d'améliorer le protocole de séchage des cyclodextrines natives afin d'éviter la formation de ces polymères linéaires. Pour cela, les cyclodextrines sont séchées dans les conditions opératoires à 80°C sous pression réduite puis par distillation azéotropique en présence d'heptane. Ce solvant et l'eau forme un point azéotropique à 79°C. Suite à cette étape, nous avons ajouté une étape de séchage sur du benzène fraîchement distillé sur un mélange sodium/benzophénone suivi à nouveau d'un séchage sous pression réduite à 80°C. Nous avons mis à profit la faculté des CDs à former des complexes d'inclusion avec le benzène pour purifier les cyclodextrines^{10,13}.

Une série de polymérisations amorcées par la β -CD native a été effectuée afin de vérifier les conclusions des différents auteurs⁹⁻¹¹. Cette étude va nous permettre par la même occasion, d'étudier l'ordre de réactivité des fonctions hydroxyle grâce à des temps de réactions courts.

Le tableau III-2 regroupe les caractéristiques des expériences effectuées à partir de la β -CD native. L'expérience ZE108 est menée dans les conditions opératoires adaptées de Badi¹⁰, à l'exception de la quantité de DPMK, afin de vérifier son influence.

Tableau III-2 : Polymérisations amorcées par la β -cyclodextrine native à 40°C en présence de DPMK (10% / [OH]).

Exp ^{ee}	[OE] mol.L ⁻¹	[OH] mol.L ⁻¹	Temps de réaction ^{*i)}	Rdt ^{*ii)} (%)	\overline{Mn} théorique ^{*iii)} g.mol ⁻¹	\overline{Mn} RMN g.mol ⁻¹	\overline{Mn} SEC ^{*v)} g.mol ⁻¹	IP
ZE108	4	9,4.10 ⁻²	48h+11j	59	27000	nd ^{*iv)}	23500	1,14
ZE136	2	9,4.10 ⁻²	48h+11j	53	12200	9000	11700	1,16
ZE15	4	9,4.10 ⁻²	48h+7h	4	1900	-	-	-
ZE128	4	9,4.10 ⁻²	48h+7h	5	2300	-	-	-

*ⁱ⁾ Temps de réaction = temps de déprotonation (48h) + temps de polymérisation

*ⁱⁱ⁾ $Rdt = (m_{\text{polymère}} - m_{\text{CD introduite}}) / m_{\text{OE}}$

*ⁱⁱⁱ⁾ corrigée par le rendement de polymérisation

*^{iv)} calculée à partir d'un chromatogramme SEC dans la DMF pour un polymère en étoile

*^{v)} sur le spectre RMN ¹H, seules les chaînes POE sont visibles à cause de leur masse molaire élevée, d'où une impossibilité de déterminer la masse molaire par cette méthode

Dans le tableau III-2, la masse molaire obtenue pour le polymère ZE108 est supérieure à celle donnée par Badi¹⁰ (15400 g/mol). Notons qu'ici elle est proche de la masse molaire visée. Ceci peut s'expliquer notamment par un meilleur séchage des cyclodextrines.

Les expériences menées avec des temps de réaction de 13 jours (ZE108/ZE136), permettent de constater l'influence de la concentration en monomère sur les masses molaires obtenues (ZE108/ZE136), avec des rendements qui restent constants, ce qui est un argument du contrôle de la polymérisation.

Dans la série d'expériences menées avec des temps courts (ZE15 et ZE128), nous pouvons constater que les molécules sont obtenues avec des rendements faibles, ce qui permet d'envisager une légère polymérisation. Ces polymères sont caractérisés par des méthodes appropriées afin de déterminer la réactivité des différentes fonctions hydroxyle qui composent la cyclodextrine.

III.3.2. Comparaison de la réactivité des différentes fonctions hydroxyle de la cyclodextrine vis-à-vis de la réaction de polymérisation anionique d'oxyde d'éthylène

Nous avons vu dans la partie bibliographique concernant les modifications sélectives des cyclodextrines qu'en présence d'une base forte, les fonctions hydroxyle en position 2 d'une cyclodextrine étant les plus acides, elles sont les premières à être déprotonées¹². Les alcoolates ainsi formés sont les plus nucléophiles. L'attaque d'une base forte privilégie donc la position 2. Cependant, la possibilité d'une attaque en position 6 n'est pas à exclure, ce qui conduit généralement à un mélange de cyclodextrines modifiées en positions 2 et 6. Par ailleurs, la capacité des cyclodextrines à former des complexes avec les réactifs peut jouer un rôle important dans la sélectivité et affecter la chimie classique des fonctions hydroxyle. Si un réactif électrophile forme avec la CD un complexe fort, alors le produit d'addition prédominant formé sera dicté par l'orientation de ce réactif dans le complexe. La nature du solvant et la taille de la cavité de la CD ont une influence importante sur la force et l'orientation du complexe entre le réactif et la cyclodextrine, et affectent le produit de réaction.

Le but de ce paragraphe est de vérifier que l'amorçage des monomères d'oxyde d'éthylène a lieu prioritairement en position 2, en présence du diphenyl méthyl

potassium, qui est une base forte et qui peut être encapsulé partiellement dans la cavité de la cyclodextrine.

III.3.2.1. Résultats et discussions

Afin de déterminer le nombre de motifs d'OE polymérisés, ainsi que leur position sur la cyclodextrine, des analyses spectrométriques et spectroscopiques sont effectuées sur les molécules issues des expériences avec des temps de réaction courts (ZE15 et ZE128). Le spectre ESI-MS du produit brut ZE15 par exemple est reporté figure III-5 et montre un mélange de composés faiblement polymérisés de degré de substitution variable.

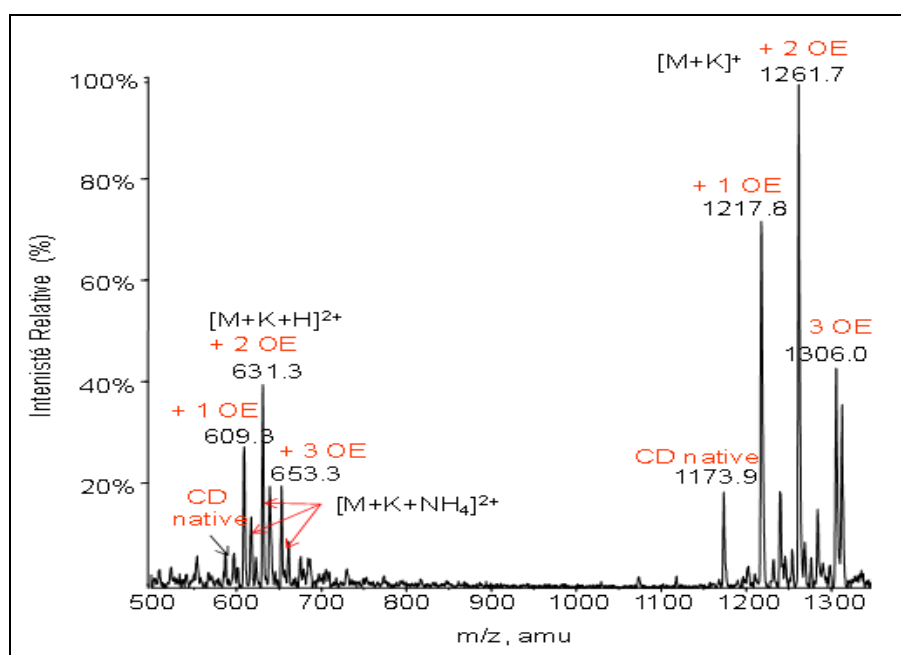


FIG. III.5 - Spectre ESI-MS du produit ZE15 dans l'eau

Sur la figure III-5, les pics majoritaires entre 1150 et 1350 amu représentent les molécules monochargées par du potassium et les pics à gauche entre 500 et 700 amu, sont dus à ces mêmes espèces dicationisées par du potassium et des ions hydrogène ou bien du potassium et des ions ammonium. Le traitement de ce spectre ESI/MS, à l'image de ceux analysés dans le chapitre précédent, permet de déterminer un degré de polymérisation moyen égal à 1,9. Par ailleurs, la distribution est étroite ($\sigma^2 = 0,5$) et centrée sur la molécule composée de deux monomères d'OE, ($I = 48\%$), à l'image d'une réaction sélective.

Afin de confirmer les résultats obtenus par ESI-MS, une analyse spectroscopique est effectuée. Le spectre RMN ^1H du produit ZE15 dans le D_2O est reporté figure III-6.

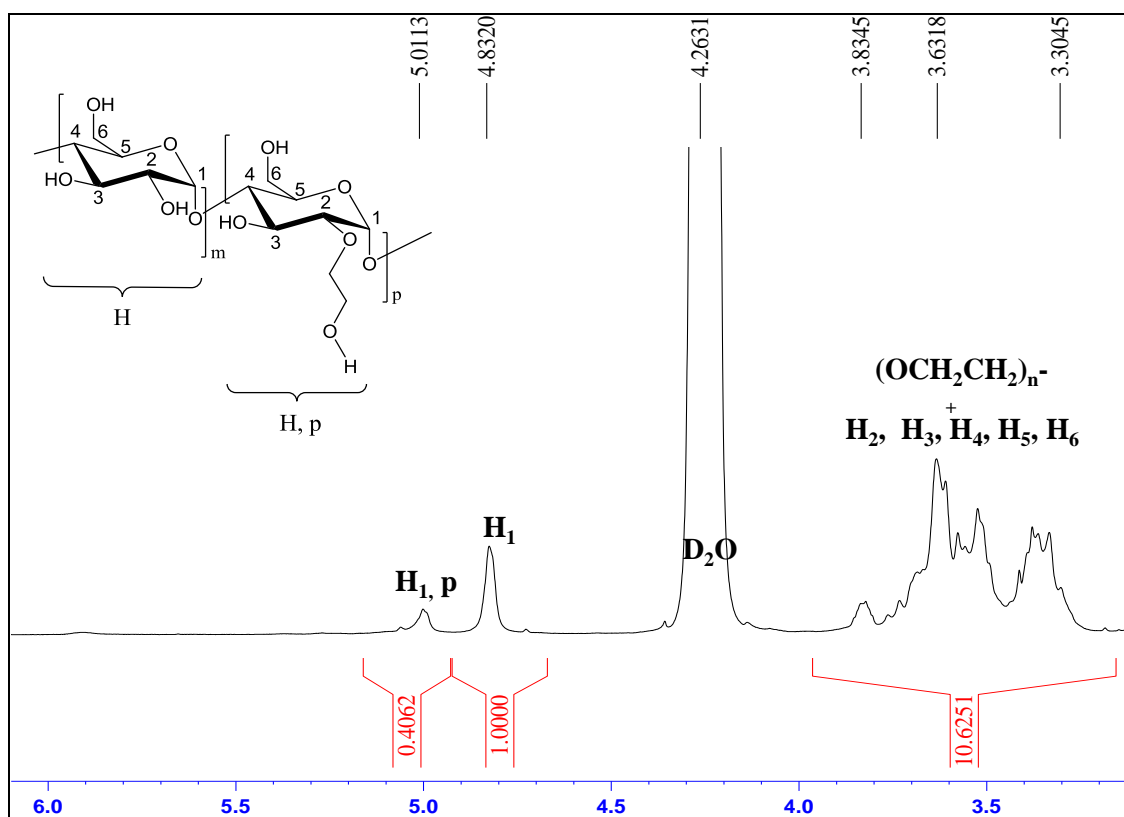


FIG. III.6 - Spectre RMN ^1H du produit ZE15 dans le D_2O

En comparant le spectre RMN ^1H du composé ZE15 (figure III-6), avec celui d'une cyclodextrine native, nous pouvons constater l'apparition d'un pic à 5,0 ppm correspondant au proton anomérique des unités glucopyranose de la cyclodextrine, modifiées par de l'oxyde d'éthylène. Cette attribution a été déterminée par RMN 2D COSY et HSQC. Le rapport des intégrations des protons du massif entre 3,1 et 3,9 ppm et des protons anomériques permet de conclure que 2,8 motifs d'OE en moyenne ont polymérisés, ce qui est en accord avec le résultat obtenu par ESI-MS.

Afin de déterminer les fonctions hydroxyle mises en jeu, une analyse spectroscopique par RMN du proton est, cette fois, effectuée dans le DMSO-d_6 . Ce solvant deutéré est connu pour mettre en évidence les fonctions hydroxyle. Le spectre RMN ^1H du produit ZE15 dans le DMSO-d_6 est reporté figure III-7.

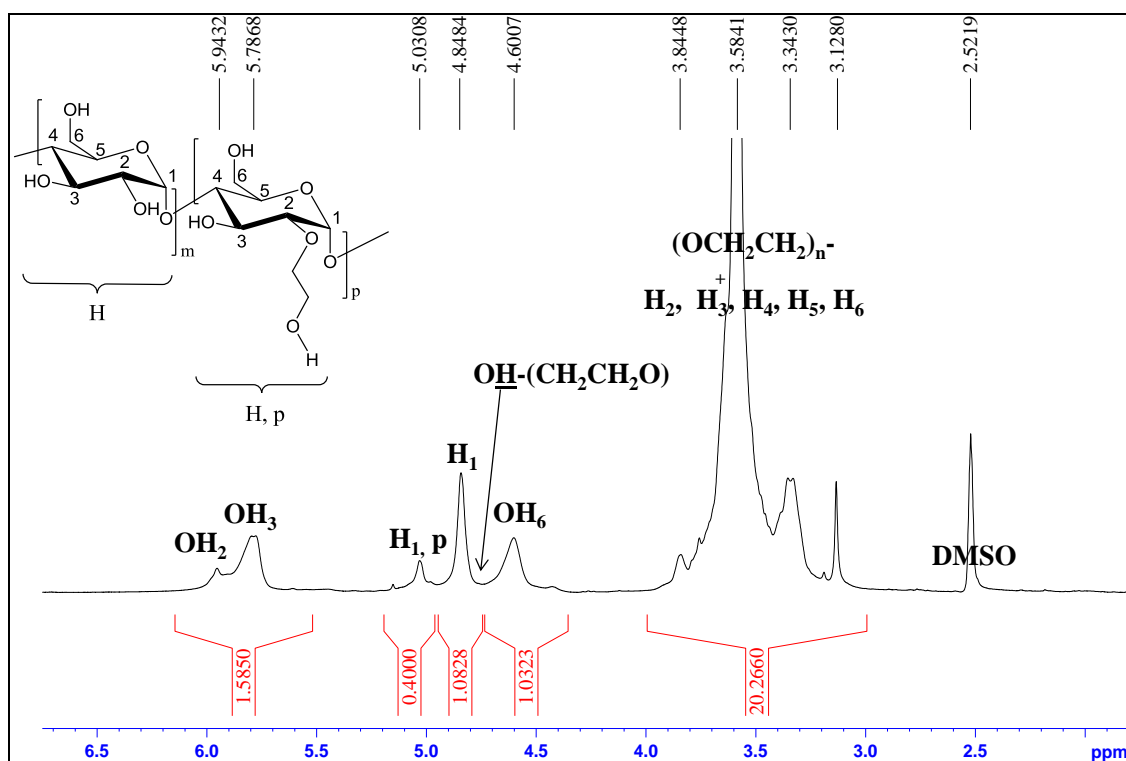


FIG. III.7 - Spectre RMN ^1H du composé ZE15 dans le DMSO

En comparant le spectre de la figure III-7 avec celui d'une cyclodextrine native, nous pouvons constater la disparition d'une partie des fonctions hydroxyle en position 2, ce qui montre que l'amorçage a lieu prioritairement en position 2.

Par ailleurs, afin de déterminer le nombre d'unités glucopyranoses affectées par l'amorçage, nous devons déterminer la quantité de fonctions hydroxyle en position 2 ayant disparu. Nous pouvons observer sur le spectre précédent que l'intégration des fonctions hydroxyle en position 2 et 3 est égale à 1,58 contre 2 dans le cas d'une CD native, ce qui permet d'en déduire le nombre de fonctions hydroxyle en position 2 ayant disparu par CD équivaut à 2,8. En outre, en considérant la somme des intégrations des protons entre 4,4 et 5,2 ppm qui égale à 2,4, nous pouvons en déduire que le nombre de fonctions hydroxyle terminales des chaînes POE apparus est égale à 3,6 ce qui confirme qu'en moyenne 2-3 unités glucopyranoses sont effectivement concernée par la réaction d'amorçage.

Ainsi, d'après les analyses spectrométrique et spectroscopiques effectuées sur le produit ZE15, nous pouvons en déduire que, pour cet échantillon, une moyenne de deux unités glucopyranoses par CD sont amorcées chacune en position 2 par une unité monomère d'oxyde d'éthylène. L'amorçage préférentiel en position 2 laisse supposer que les

cyclodextrines natives polymérisées ont des chaînes de POE de masse molaire moyenne différente en fonction de la position sur les unités glucopyranoses. Néanmoins, il n'est pas possible de faire une dégradation des sucres sans dégrader le POE.

En outre, ces résultats montrent également la lenteur de la réaction d'amorçage puisque sur des temps courts (ZE15 et ZE128, 7h, tableau III-2*ⁱ), très peu de fonctions hydroxyle sont amorcées alors qu'au bout de 11 jours de polymérisation (ZE108 et ZE136, tableau III-2*ⁱ), la totalité des fonctions hydroxyle le sont, comme le prouve les analyses de ces polymères dans le paragraphe qui suit.

III.3.3. Détermination des masses molaires moyennes des polymères en étoile

Les masses molaires des macromolécules ZE108 et ZE136 de masses molaires très différentes sont déterminées par chromatographie d'exclusion stérique et par spectroscopie RMN ¹H. Cependant, s'agissant de polymères en étoile, il est important de rappeler leur détermination.

III.3.3.1. Analyse par chromatographie d'exclusion stérique des polymères en étoile

L'analyse des produits obtenus est réalisée dans la DMF, et l'étalonnage est établi grâce à des échantillons standard de POE linéaires. Or, dans le cas d'un polymère en étoile étudié, la masse molaire moyenne fournie par la SEC est erronée. En effet, celle-ci est sous-estimée car les macromolécules en étoile présentent en réalité un volume hydrodynamique plus faible par rapport à leurs homologues linéaires, et donc un volume d'élution plus grand¹⁴. Il est indispensable de réajuster la masse molaire attribuée par SEC ($\bar{M}_{\text{étoile apparente}}$) selon la démarche qui suit, afin d'accéder à la masse molaire réelle du polymère en étoile notée $\bar{M}_{\text{étoile réelle}}$.

Un paramètre pertinent qui permet de différencier les macromolécules en étoile de leurs équivalents linéaires est le rapport h de leur rayon hydrodynamique R_H :

$$h = \frac{\langle R_H \rangle_{\text{étoile}}}{\langle R_H \rangle_{\text{linéaire}}} \quad (1)$$

En partant du principe qu'un polymère en étoile et un polymère linéaire de masses molaires différentes mais de volume hydrodynamique V_H identique, auront le même volume d'élution, nous pouvons écrire la relation reliant le volume hydrodynamique du polymère en étoile à celui de son homologue linéaire¹⁴ :

$$h^3 = \frac{K.V_H \text{ étoile}}{K.V_H \text{ linéaire}} = \left[\frac{3\bar{f}-2}{\bar{f}^2} \right]^{3/2} \quad (2)$$

h : rapport des rayons hydrodynamiques, K : constante, V_H : volume hydrodynamique,

\bar{f} : fonctionnalité du polymère

En outre, l'étalonnage de la SEC par une série de POE linéaires permet de tracer une courbe modélisée par une loi logarithmique reliant la masse molaire et le volume hydrodynamique, représenté sur la figure III-8. Pour cela, il faut relier la masse molaire M d'un polymère linéaire à son volume hydrodynamique V_H , selon les principes suivants :

- D'après les résultats reportés dans la littérature, dans le cas du poly(oxyde d'éthylène) linéaire dans la DMF à 25°C, la viscosité intrinsèque peut être liée à la masse molaire moyenne selon la formule suivante¹⁵ :

$$[\eta] = 0,02 + 24.10^{-5}.M^{0,73} \text{ en dl/g} \quad (3)$$

$[\eta]$: viscosité, M : masse molaire du poly(oxyde d'éthylène) linéaire

- Le concept d'étalonnage universel de Benoît, qui est indépendant de la structure moléculaire et de la nature chimique du polymère, montre que le volume hydrodynamique V_H d'un polymère de masse molaire moyenne (M) est proportionnel à sa viscosité $[\eta]$ selon l'équation :

$$[\eta] = \frac{5}{2} N_A \frac{V_H}{M} = K. \frac{V_H}{M} \quad (4)$$

$[\eta]$: viscosité, N_A : nombre d'Avogadro, V_H : volume hydrodynamique,

M : masse molaire d'un polymère, K : constante

Ainsi pour un polymère linéaire de masse molaire moyenne $\bar{M}_{\text{linéaire}}$ connue, nous pouvons calculer grâce à l'équation (3) sa viscosité intrinsèque $[\eta]$, et accéder à son volume hydrodynamique V_H grâce à l'équation (4). Une série de mesure a été réalisée pour des POE linéaires de masse molaire $\bar{M}_{\text{linéaire}}$ variées et ont permis de tracer la courbe modélisée par la loi logarithmique représentée figure III-8.

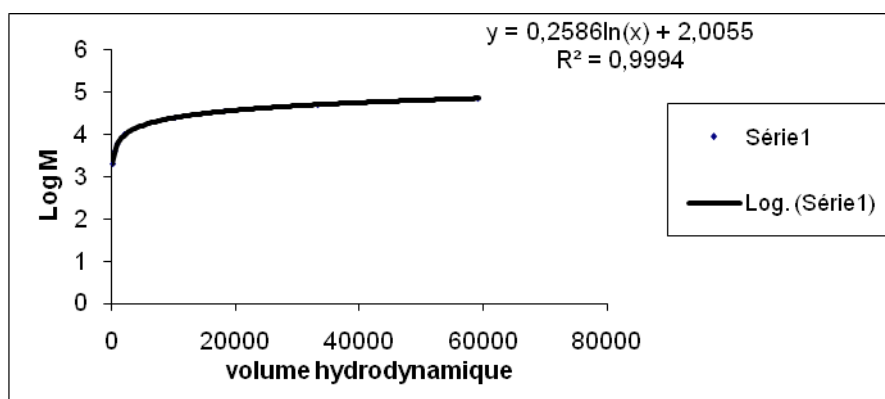


FIG. III.8 - Masse molaire en fonction du volume hydrodynamique d'une série de POE linéaire

Ainsi pour un polymère en étoile étudié, la SEC attribue à celui-ci une masse molaire apparente $\bar{M}_{\text{étoile apparente}}$, reliée à une valeur $K.V_H(\text{étoile})$ d'après la loi logarithmique.

Connaissant les valeurs du paramètre h pour un polymère en étoile de fonctionnalité \bar{f} , nous pouvons accéder grâce à l'équation (2) à la valeur de $K.V_H(\text{linéaire})$. Cette valeur reportée sur la courbe de la figure III-8 permet d'accéder à la masse molaire réelle du polymère en étoile ($\bar{M}_{\text{linéaire}} = \bar{M}_{\text{étoile réelle}}$).

La caractérisation SEC du composé ZE136 permet d'illustrer le calcul permettant d'estimer la masse molaire moyenne d'un polymère en étoile. La figure III-9 représente le chromatogramme SEC obtenu pour ce composé.

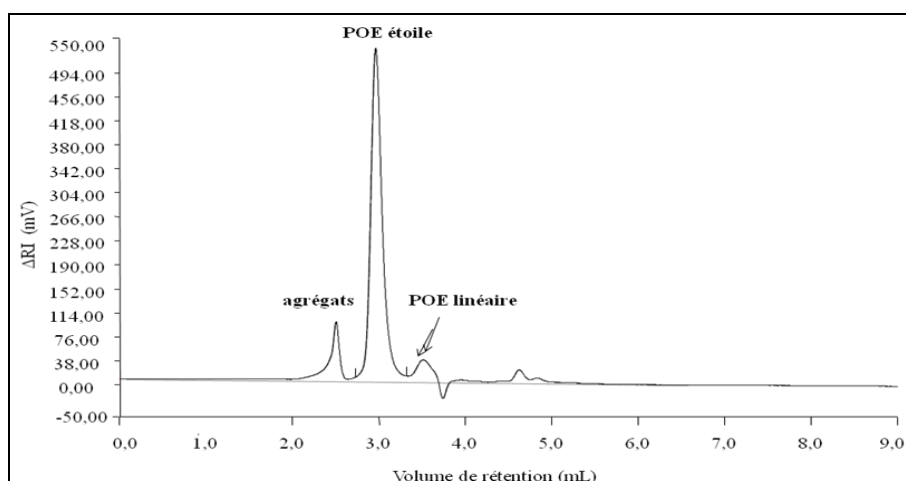


FIG. III.9 - Chromatogramme SEC du composé ZE136 dans la DMF

Sur le chromatogramme précédent, nous pouvons observer trois populations, dont celle aux volumes d'élution intermédiaires est attribué au polymère en étoile. Pour celui-ci, la masse molaire moyenne attribuée par la SEC est égale 5055 g.mol^{-1} . Le tableau III-3

récapitule les résultats obtenus selon la démarche de calcul précédente et aboutit à une estimation de la masse molaire réelle du polymère $\bar{M}_{\text{étoile réelle}}$ égale à 11 700 g.mol⁻¹.

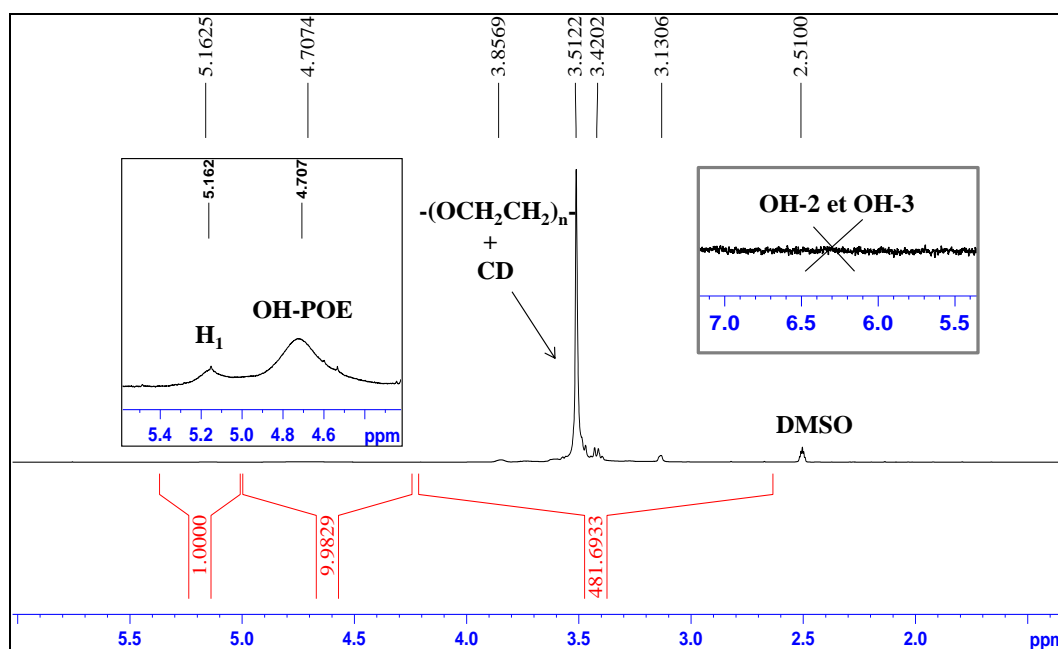
\bar{f}	h	$\bar{M}_{\text{étoile apparente}}$	$K.V_H (\text{étoile})$	$K.V_H (\text{linéaire})$	$\bar{M}_{\text{linéaire}} = \bar{M}_{\text{étoile réelle}}$
21	0.62	5055 g.mol ⁻¹	711	2921	11700 g.mol ⁻¹

Tableau III-3 : Détermination de la masse molaire réelle d'un polymère en étoile en utilisant un étalonnage de POE linéaire

Notons que sur la figure III-9, la population aux volumes d'élution élevés est attribuée aux POE-diOH (POE linéaire), ce qui tend à montrer que le séchage des cyclodextrines n'a pas été suffisant. Par ailleurs la population au volume d'élution faible est, quant à elle, attribuée aux agrégats. En effet des études par diffusion dynamique de lumière (DLS) dans la DMF ont montré que la concentration de cette population augmente avec la concentration en polymères. Les mêmes observations ont été faites avec le composé ZE108. Afin de confirmer ces résultats, les composés ZE108 et ZE136 ont été analysés par spectroscopie RMN ¹H.

III.3.3.2. Détermination de la masse molaire moyenne des polymères en étoile par spectroscopie RMN ¹H

La spectroscopie RMN ¹H permet d'une part de confirmer la structure des polymères en étoile mais également d'estimer leur masse molaire moyenne. Sur la figure III-10, est rapporté par exemple le spectre RMN ¹H du composé ZE136.


 FIG. III.10 - Spectre RMN ^1H dans le DMSO du composé ZE136

Sur le spectre précédent, la présence de la β -CD est mise en évidence par la détection du signal du proton anomérique à 5,1 ppm. Nous pouvons également observer les signaux des protons méthyléniques entre 3,1 à 3,8 ppm, caractéristiques des chaînes de poly(oxyde d'éthylène), superposés aux protons constituant la CD. Enfin, le pic à 4,7 ppm est attribué aux fonctions hydroxyle des extrémités de chaînes (OH-POE). Néanmoins, nous pouvons noter que le rapport d'intégration des fonctions hydroxyle terminales (OH-POE) et celle du proton anomérique (H_1) équivaut à 9,9, ce qui est largement supérieur à la valeur attendue égale à 3 dans le cas où toutes les fonctions hydroxyle ont réagi. Nous pouvons donc en déduire que cet excès mesuré sur l'intégration des fonctions hydroxyle terminales est dû à la formation de POE linéaire, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment par SEC. Notons que les précipitations successives dans l'éther et le pentane froid n'ont pas permis de nous affranchir de ces derniers, et ce malgré leur faible masse molaire moyenne (500 g.mol^{-1}).

En admettant que l'intégration $I_{\text{OH-POE}}$ à 4,7 ppm, représente la somme des intégrations des fins de chaînes du POE en étoile et les deux extrémités du POE linéaire (POE-diOH) : $I_{\text{OH-POE}} = I_{\text{OH-POE étoile}} + I_{\text{OH-POE linéaire}}$, alors $I_{\text{OH-POE linéaire}} = 6,3$

Nous faisons l'hypothèse que la taille de la chaîne du greffon lié à la CD est identique à celle de la chaîne du POE linéaire. Nous pouvons donc considérer que l'intégration des protons méthyléniques du POE est égale à : $I_{\text{OCH}_2\text{CH}_2} = 475$.

Par ailleurs, l'intégration totale des protons des extrémités de fin de chaînes I_{OH} , est égale à : $I_{OH} = I_{OH-POE \text{ étoile}} + (I_{OH-POE \text{ linéaire}} / 2) = 6,1$. Ainsi, le nombre moyen d'unité monomère n équivaut à 20, ce qui permet d'estimer la masse molaire moyenne du polymère en étoile égale à 20 000 g.mol^{-1} . Ce résultat surestimé n'est pas en accord avec la masse molaire du polymère obtenue par SEC (11 700 g.mol^{-1}), et peut s'expliquer par le pic de l'eau dans le milieu, situé sur les spectres RMN ^1H à 3,4 ppm, c'est-à-dire dans le massif des protons méthyléniques des chaînes POE. Afin de s'affranchir de l'eau présente dans le milieu, quelques gouttes de TFA sont ajoutées, afin de déplacer le pic de celui à des champs forts, comme indiqué sur le spectre du composé ZE136 (figure III-11).

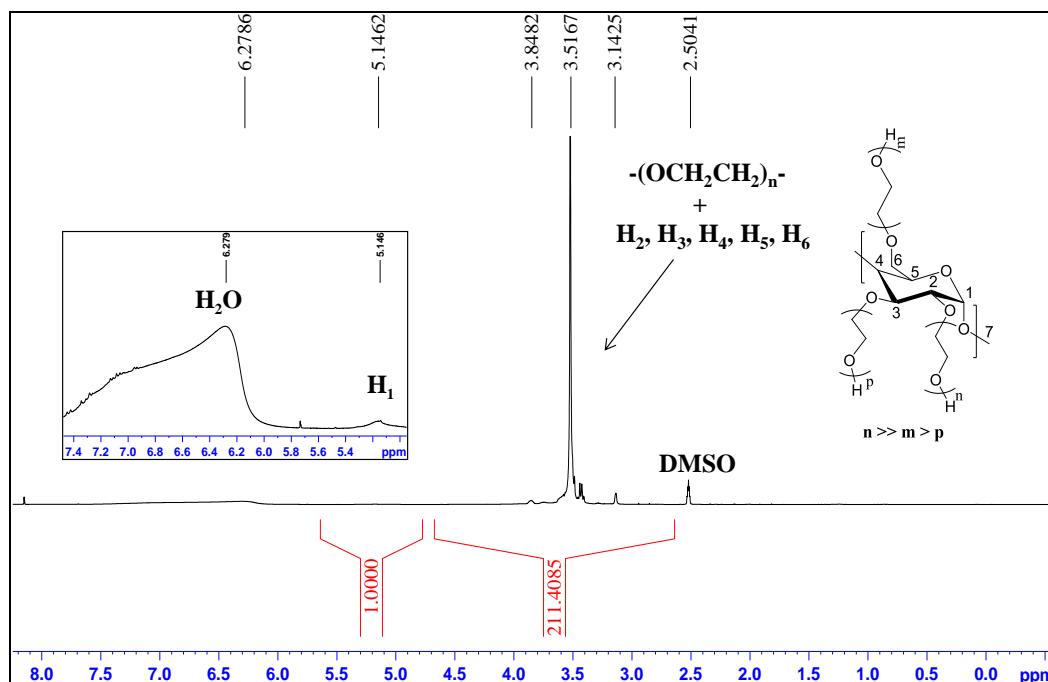


FIG. III.11 - Spectre RMN ^1H dans le DMSO du composé ZE136, en présence de TFA

Sur la figure précédente, nous pouvons observer que le pic de l'eau est déplacé à 6,2 ppm. Par ailleurs, l'intégration du pic attribué aux protons méthyléniques du POE, à 3,5 ppm, est désormais égale à 205, ce qui permet d'attribuer à la macromolécule en étoile une masse molaire moyenne égale à 9000 g.mol^{-1} . Ce résultat est maintenant en adéquation avec la masse molaire obtenue par SEC. Nous pouvons noter que la présence de POE linéaire provient de l'eau contenue dans la cyclodextrine au vu des résultats obtenus dans le cas de l'alcool allylique, à savoir l'absence de ce type de polymère.

En outre sur la figure III-12 sont représentées les différentes longueurs de chaînes de POE de la cyclodextrine native polymérisée, en fonction de leur position.

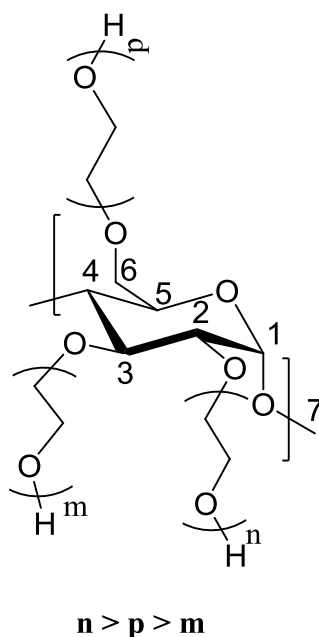


FIG. III.12 - Cyclodextrine native polymérisée avec des longueurs de chaînes variables selon la position

Nous avons vu au cours de cette partie tout d'abord l'amorçage préférentiel en position 2 au bout de 7h puis l'amorçage de toutes les fonctions hydroxyle au bout de 11 jours. Nous faisons ainsi l'hypothèse que l'ordre de grandeur des constantes d'amorçage est la suivante selon la position : $k_a 2 > k_a 6 > k_a 3$.

Enfin, le même travail a été effectué avec le polymère issu de l'expérience ZE108. Nous sommes cependant dans l'impossibilité d'en déduire la masse molaire moyenne car le pic du proton anomérique n'est pas visible à cause de la taille importante des greffons. La spectroscopie RMN ^1H présente donc des limites pour la détermination des masses molaires des polymères en étoile de taille élevée.

III.3.4. Conclusions sur les essais de polymérisations amorcées par les cyclodextrines natives

Les réactions menées sur des temps courts nous ont permis de déterminer l'ordre de réactivité des différentes fonctions hydroxyle dans les réactions de polymérisation anionique par ouverture de l'oxyde d'éthylène. En effet, nous avons vérifié que les fonctions hydroxyle en position 2 sont plus réactives que celles présentes en positions 6 et 3. Ce résultat montre que les vitesses d'amorçage ne sont donc pas identiques pour les différents hydroxyles qui composent la cyclodextrine native, ce qui a pour conséquence la formation de chaînes poly(oxyde d'éthylène) de taille différente selon la position sur les unités glucopyranoses.

Afin d'obtenir un contrôle du nombre de branches par macromolécule, il est important de synthétiser des amorceurs possédant des fonctions hydroxyle de même réactivité, ce qui n'est pas le cas des fonctions hydroxyle des unités glucopyranose de la CD. Nous avons déjà reporté la synthèse de la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD, composée de fonctions hydroxyle de même classe, et qui va servir d'amorceur à la polymérisation anionique d'oxiranes.

III.4. Polymérisations anioniques d'oxiranes amorcée par les dérivés de cyclodextrines

III.4.1. Introduction

Afin d'obtenir un contrôle du nombre de branches par macromolécule, la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD possède 14 fonctions hydroxyle, de même réactivité, ce qui va permettre d'obtenir autant de chaînes POE de taille identique sur chaque face de la cyclodextrine. Ces polymères vont permettre d'augmenter le caractère amphiphile du composé ainsi que sa solubilité dans l'eau, indispensable pour les applications envisagées. La macromolécule en étoile attendue est représentée de façon schématique sur la figure III-13.

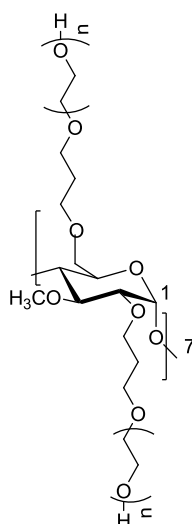


FIG. III.13 - Représentation schématique du polymères en étoile à 14 branches attendu après polymérisation de l'oxyde d'éthylène amorcée par la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD

Nous avons vu précédemment dans le cas des CDs natives, que l'insuffisance du séchage de ce type d'amorceur se traduit par la formation de polymère linéaire (α , ω -dihydroxy-POE). Celui-ci est difficilement éliminable par les traitements envisagés. Il sera donc indispensable d'améliorer le protocole de séchage de l'amorceur et/ou de mettre en place un protocole de séparation des polymères en étoile et linéaire.

III.4.2. Expériences de polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène amorcées par la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD

Le tableau III-4 regroupe les caractéristiques des expériences effectuées à partir de la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD. Celles-ci sont menées dans la DMF, à 40°C, en présence de DPMK (10% par rapport à la quantité de fonctions hydroxyle).

Tableau III-4 : Caractéristiques des réactions de polymérisation de l'oxyde d'éthylène amorcées par la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -cyclodextrine

Exp ^{ce}	[OE] mol.L ⁻¹	[OH] mol.L ⁻¹	Temps de réaction (jours)	Rdt * ⁱ) (%)	\overline{Mn} théorique g/mol * ⁱⁱ)	\overline{Mn} RMN (étoile) g/mol	\overline{Mn} SEC (étoile) g/mol * ⁱⁱⁱ)	\overline{Mn} SEC (linéaire) g/mol	IP
ZE164	2,4	$1,6 \cdot 10^{-2}$	7	11	6600	6600	5600	0	1,14
ZE154	2,4	$1,6 \cdot 10^{-2}$	13	23	13200	nd * ^{iv})	nd * ^{iv})	1000	1,14
ZE167	2,4	$1,6 \cdot 10^{-2}$	22	36	21600	20700	18600	1400	1,16
ZE170	2,4	$1,6 \cdot 10^{-2}$	32	44	26400	nd * ^v)	22500	1700	1,01

*ⁱ) $Rdt = (m_{\text{polymère}} - m_{\text{CD introduite}}) / m_{\text{OE}}$

*ⁱⁱ) corrigée par le rendement de polymérisation

*ⁱⁱⁱ) calculée à partir d'un chromatogramme SEC dans la DMF pour un polymère en étoile

*^{iv}) présence uniquement de l'amorceur de départ, pas de motifs OE

*^v) sur le spectre RMN ^1H , seules les chaînes POE sont visibles à cause de leur masse molaire élevée, d'où une impossibilité de déterminer la masse molaire par cette méthode

Les expériences dans cette étude ont été menées à des concentrations plus faibles en amorceur que précédemment ($1,6 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹ contre $9,6 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹ pour la cyclodextrine native). En effet, d'après des tests de solubilité, la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD est moins soluble que la β -CD native dans la DMF.

Nous pouvons observer dans le tableau III-4, en comparant toutes les expériences, l'influence du temps de réaction sur les rendements de polymérisation ainsi que les masses molaires obtenues, ce qui tend à prouver que la cinétique de la réaction de polymérisation est lente.

En outre, dans le tableau précédent, nous pouvons également constater que l'expérience ZE164 a abouti uniquement à la formation de polymère en étoile. Le protocole de séchage semble avoir été efficace, mais ne semble pas reproductible puisque les analyses par SEC montrent pour les autres expériences, la présence d'un mélange de polymères (ZE167 et ZE170) ou bien la présence de polymères linéaires uniquement (ZE154).

Le chromatogramme SEC du polymère en étoile ZE164 est reporté sur la figure III-14 et prouve la présence de polymère en étoile de masse molaire en nombre de 5600 g.mol^{-1} . La présence d'une population au volume d'élution faible, attribuée aux agrégats, est caractéristique de la présence d'un composé à base de cyclodextrine, ce qui permet de confirmer que nous sommes bien en présence de POE en étoile et non linéaire.

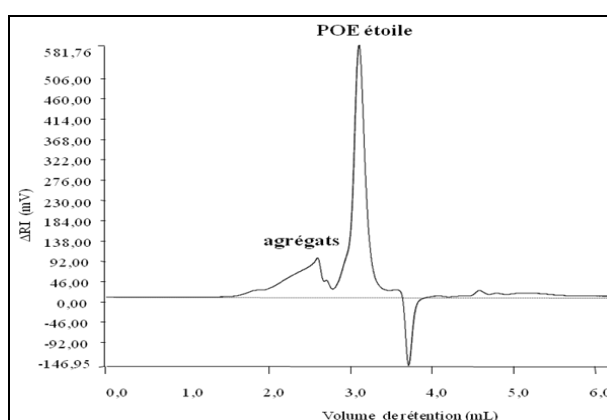


FIG. III.14 - Chromatogramme SEC dans la DMF du composé ZE164 brut

L'absence de polymères linéaires, issus de l'amorçage de l'hydruure de potassium formé par l'eau résiduelle contenue dans la cavité de la cyclodextrine, est confirmée par une analyse spectroscopique. Le spectre RMN ^1H de ce composé est représenté figure III-15.

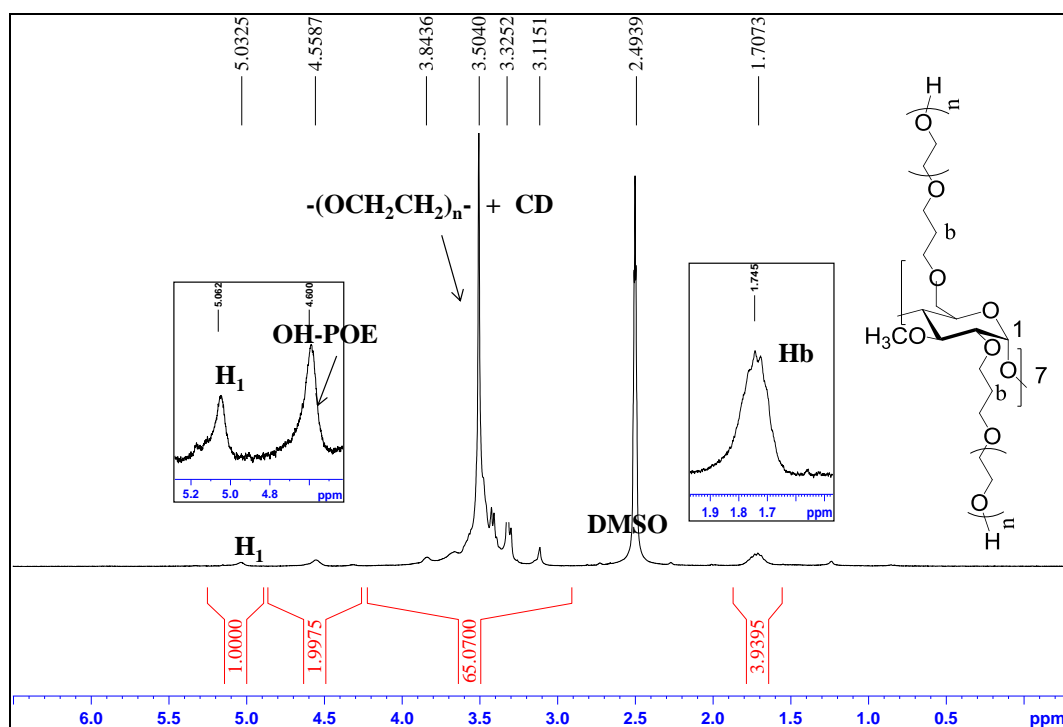


FIG. III.15 - Spectre RMN ^1H dans le DMSO du composé ZE164 brut

Sur le spectre précédent, le rapport d'intégration entre les fonctions hydroxyle ($I_{(\text{OH-POE})}$) et le proton anomérique (I_1) équivaut à 1,99, ce qui confirme l'absence de formation de poly(oxyde d'éthylène) linéaire. Une attention particulière a été apportée au séchage du matériel et des solvants. Par exemple, la burette de cyclodextrine a été préalablement flammée sous vide secondaire, l'heptane séché sur hydrure de calcium et tous les produits ont été manipulés en boîte à gant. Nous avons également ajouté une étape de séchage supplémentaire de 12h à 150°C sous vide secondaire. Cependant, ce protocole de séchage n'étant pas reproductible (ZE167 et ZE170), il est indispensable de mettre en place une méthode de séparation des polymères en étoile et linéaire.

III.4.3. Extraction des polymères en étoile

Dans le chapitre précédent, nous avons constaté que deux reprecipitations successives dans l'éther puis dans le pentane froid ne sont pas suffisantes pour séparer les polymères en étoile des polymères linéaires, et ce malgré des masses molaires en nombre faible (500 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour le polymère linéaire ZE136 par exemple). Pour les expériences ZE167 et ZE170, la présence de POE linéaire a été observée par SEC. Le chromatogramme du produit brut issu de l'expérience ZE164 est par exemple donné figure III-16.

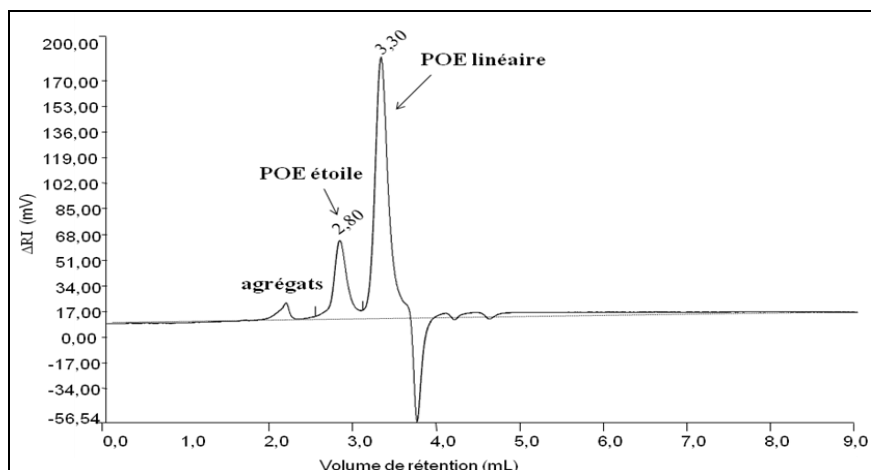


FIG. III.16 - Chromatogramme SEC dans la DMF du composé ZE167 avant traitement

Sur ce chromatogramme SEC, nous pouvons constater la présence de trois populations, dont celle aux volumes de rétention élevés correspondant aux POE linéaires. Le rapport des aires des pics, nous permet de conclure que ces derniers sont majoritaires dans le mélange. Les masses molaires moyennes en nombre pour les polymères en étoile et linéaires sont de 18 600 et 1 400 g.mol^{-1} respectivement, ce qui signifie que la masse molaire en nombre par branche (1320 g.mol^{-1}) est très proche de celle des POE linéaires. Ceci implique que les fonctions hydroxyle amorçant la polymérisation de l'OE sont initialement présentes dans le milieu réactionnel. Ce résultat montre une réactivité identique d'amorçage des différentes fonctions hydroxyle présentes dans le milieu (eau ou amorceur à base de CD).

Les premiers essais de séparation des différents types de polymères ont consisté à reprécipiter à nouveau un très grand nombre de fois les produit bruts dans l'éther et le pentane, mais les résultats n'ont pas été concluants. De même, pour une tentative de séparation par dialyse. Dans les deux cas, les chromatogrammes des produits ainsi obtenus sont semblables au chromatogramme du produit brut ZE167 avant traitement (figure III-16).

Un nouveau traitement mis en place a abouti à des résultats très encourageants. Celui-ci consiste à soniquer le produit brut dans l'éther à 60°C . Cette opération répétée plusieurs fois a permis de solubiliser la totalité du POE linéaire dans l'éther. Après filtration, les deux fractions obtenues ont été analysées par SEC. Les figures III-17 et III-18 représentent respectivement les chromatogrammes de la partie insoluble et de la partie soluble dans l'éther.

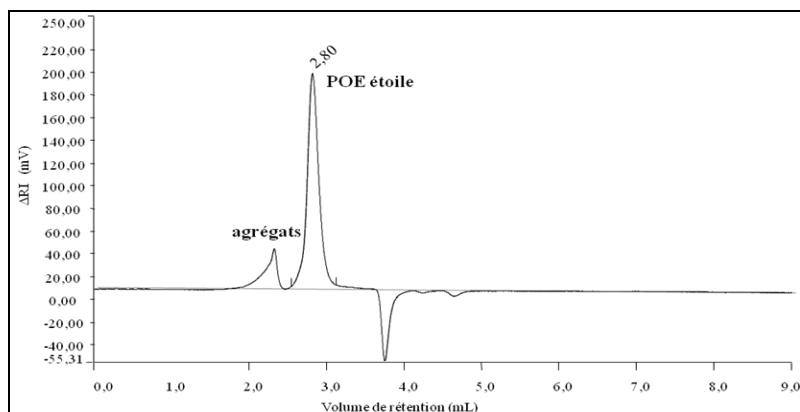


FIG. III.17 - Chromatogramme SEC dans la DMF de la fraction du composé ZE167 insoluble dans l'éther à 60°C

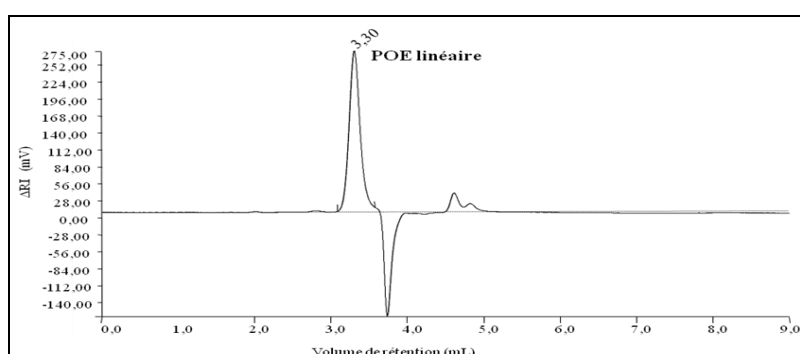


FIG. III.18 - Chromatogramme SEC dans la DMF de la fraction du composé ZE167 soluble dans l'éther à 60°C

Sur la figure III-17 nous pouvons constater la présence de deux populations, correspondant aux agrégats et au polymère en étoile à base de cyclodextrine. Tandis que sur la figure III-18, nous observons un pic unique attribué aux polymères en étoile linéaires. Ces résultats montrent la séparation totale des deux types de macromolécules qui composent le mélange. Notons que la formation des agrégats, observés uniquement sur la figure III-17, est bien spécifique des composés à base de cyclodextrines. Afin de confirmer l'efficacité de l'extraction des polymères en étoile, les deux fractions sont analysées par RMN ^1H . Le spectre proton de fraction insoluble dans l'éther par exemple est donnée figure III-19.

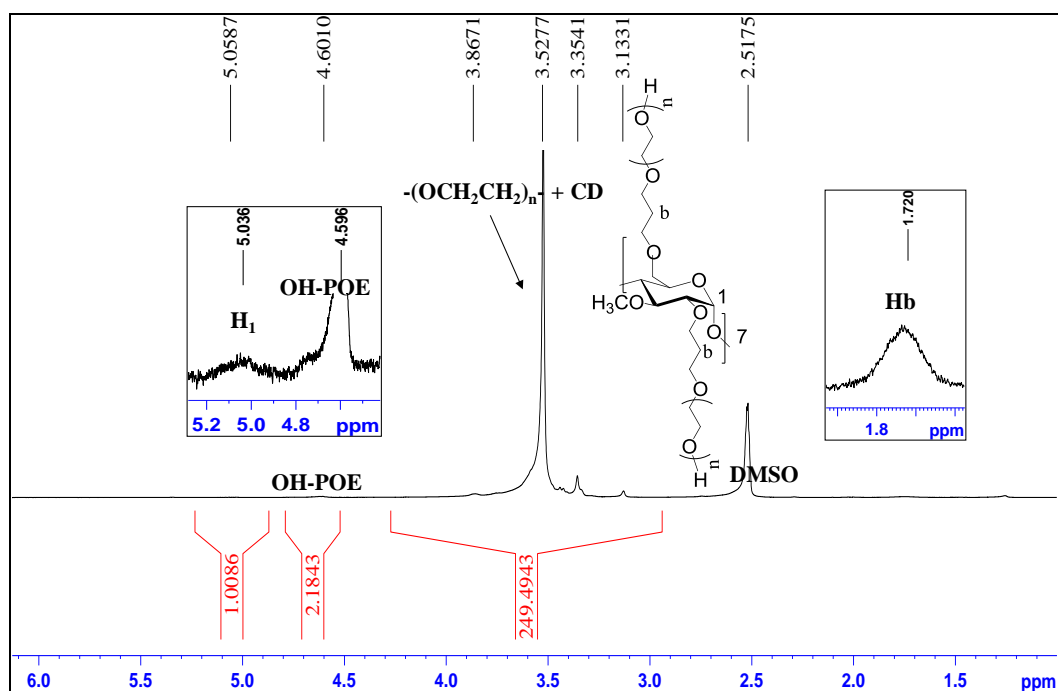


FIG. III.19 - Spectre RMN ^1H dans le DMSO de la fraction du composé ZE167 insoluble dans l'éther à 60°C

Sur le spectre RMN de la figure III-19, nous pouvons constater qu'en prenant pour référence l'intégration du proton anomérique égale à 1, celle des fonctions hydroxyle vaut 2,1. Ce résultat rend compte de l'absence de formation de POE linéaire et par conséquent d'une extraction des polymères en étoile réussie.

La figure III-20 représente la superposition des chromatogrammes SEC obtenus pour les polymères en étoile ZE164, ZE167 et ZE170, comparée à l'amorceur de polymérisation ZE159, dont la synthèse a été décrite dans le chapitre précédent.

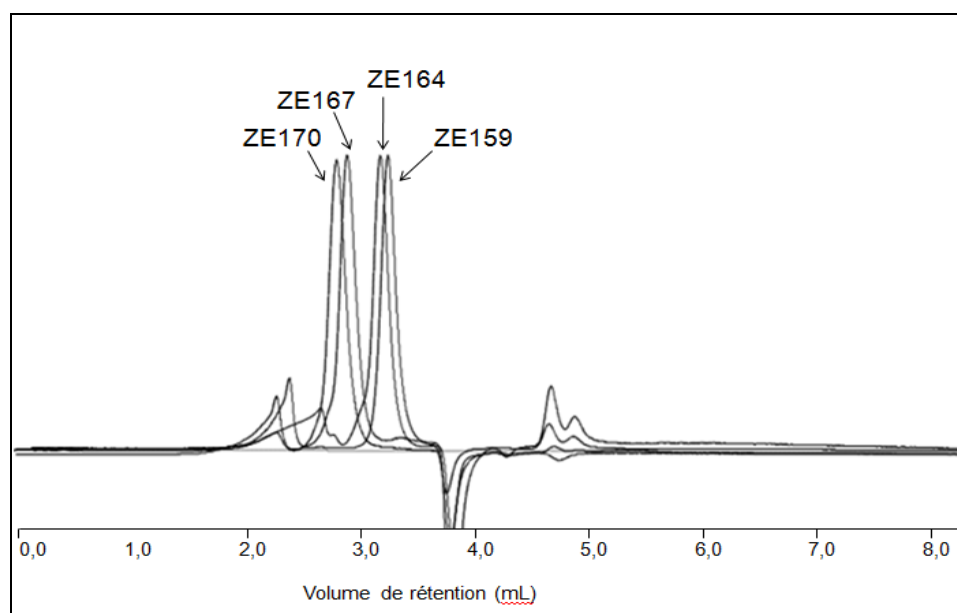


FIG. III.20 - Superposition des chromatogrammes SEC (RI) obtenus pour l'amorceur ZE159, ainsi que les polymères en étoile ZE164, ZE167, ZE170.

Sur la figure III-20, nous pouvons observer pour tous les exemples, la présence de deux pics dont celle aux volumes d'élution élevées correspondant aux polymères en étoile. Par ailleurs, nous constatons la pureté des échantillons exempts de polymères linéaires.

Afin de confirmer le greffage des chaînes poly(oxyde d'éthylène) sur les dérivés de cyclodextrine, une analyse spectroscopique par RMN DOSY est effectuée.

III.4.4. Analyse spectroscopique par RMN DOSY des macromolécules

Tout d'abord, les spectres protons des polymères analysés par RMN DOSY afin de montrer le greffage des chaînes de poly(oxyde d'éthylène) sur l'amorceur sont récapitulés sur la figure III-21.

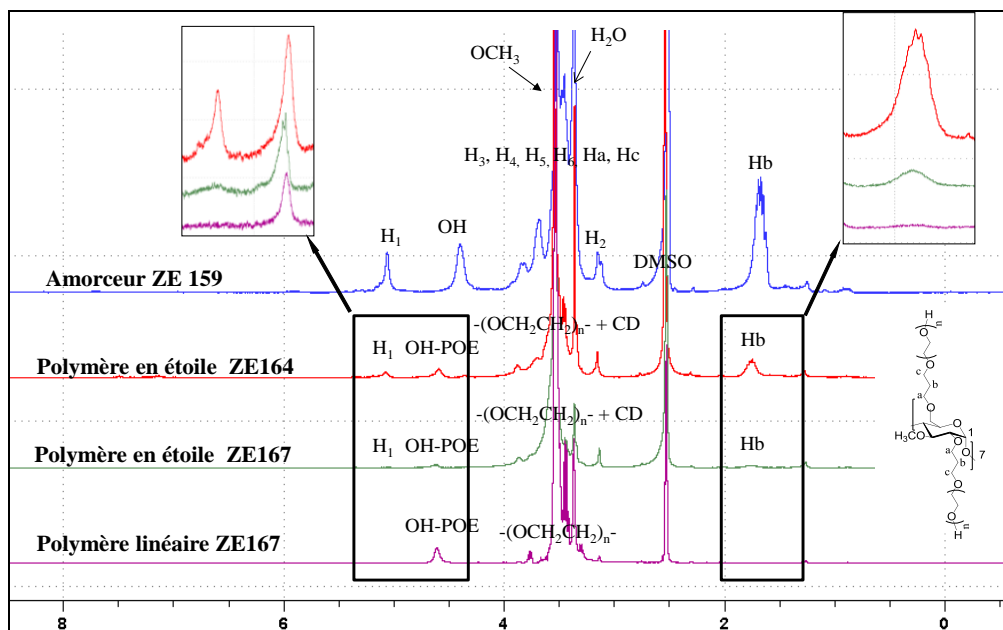


FIG. III.21 - Superposition des spectres RMN ^1H obtenus pour l'amorceur ZE159, ainsi que les polymères en étoile ZE164, ZE167 et le polymère linéaire ZE167

Sur la figure III-21, nous pouvons constater que le pic du proton anomérique et des protons propyle sont bien définis pour l'amorceur et le polymère ZE164. La résolution est moins bonne pour le polymère ZE167 de plus forte masse molaire, néanmoins les pics caractéristiques de la CD restent visibles et permettront une analyse par RMN DOSY.

L'expérience DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) a été développée afin de faciliter l'analyse d'un mélange de molécules en s'appuyant sur la mesure du coefficient de diffusion¹⁶⁻¹⁸. Elle permet également d'accéder à des informations pertinentes sur la structure de polymères¹⁹⁻²². Dans notre cas, cette technique a été utilisée afin de confirmer l'accrochage des chaînes POE sur la cyclodextrine.

Rappelons le principe de cette technique. Les molécules en solution sont en perpétuel mouvement. Ce mouvement de translation, contrairement au mouvement de rotation, est connu sous le nom de « mouvement Brownien » et s'appelle souvent diffusion ou auto-diffusion. Le coefficient de diffusion est lié aux propriétés hydrodynamiques des molécules diffusantes. Il dépend de la taille, de la forme, de la charge de la molécule, de la température, de la viscosité du milieu selon l'équation de Debye-Einstein²³. La mesure du coefficient de diffusion par l'expérience DOSY nécessite l'utilisation de gradients pulsés. Si deux molécules de taille différente situées au même endroit dans le tube RMN sont laissées diffusées pendant un temps Δ (temps de diffusion), alors passé ce délai, elles se trouveront à deux endroits différents. Lors de l'application d'un gradient de champ

magnétique, ces deux molécules ne vont pas ressentir le même champ, et par suite auront des intensités de signaux différentes. L'intensité du signal est donnée par l'équation de Stejskal-Tanner²⁴:

$$I = I_0 \exp[-D\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)] \quad (1)$$

Avec I = intensité observée, I_0 = intensité référence (signal non atténué, i.e. en l'absence de gradient), D = coefficient de diffusion en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, γ = rapport gyromagnétique $\text{rad.s}^{-1}.\text{G}^{-1}$, g = intensité du gradient en G.cm^{-1} , δ = temps de gradient en s, Δ = temps de diffusion en s

Le traitement des données conduit à un spectre RMN 2D, la dimension F2 représentant le spectre proton de l'échantillon et la dimension F1 le (ou les) coefficient(s) de diffusion. Un exemple est présenté figure III-22.

Les mesures de coefficient de diffusion étant très sensibles à la température¹⁸, toutes les expériences DOSY ont été réalisées à 25°C. Ces expériences ont été effectuées dans le DMSO sur un spectromètre 300MHz. Avant chaque expérience, les temps de relaxation ont été mesurés puis les temps de gradient et de diffusion ont été optimisés.

Le coefficient de diffusion de l'amorceur per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD (échantillon ZE159) a tout d'abord été déterminé en portant le logarithme de l'intensité d'un signal donné en fonction de $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$. Un exemple est donné figure III-23 ; il correspond au traitement mathématique du proton anomérique de la figure III-22.

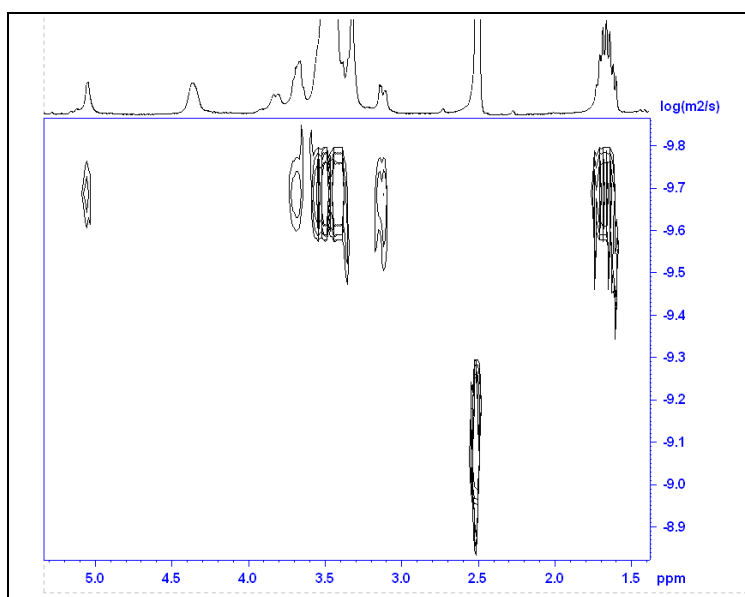


FIG. III.22 - Pseudo 2D de l'amorceur ZE159

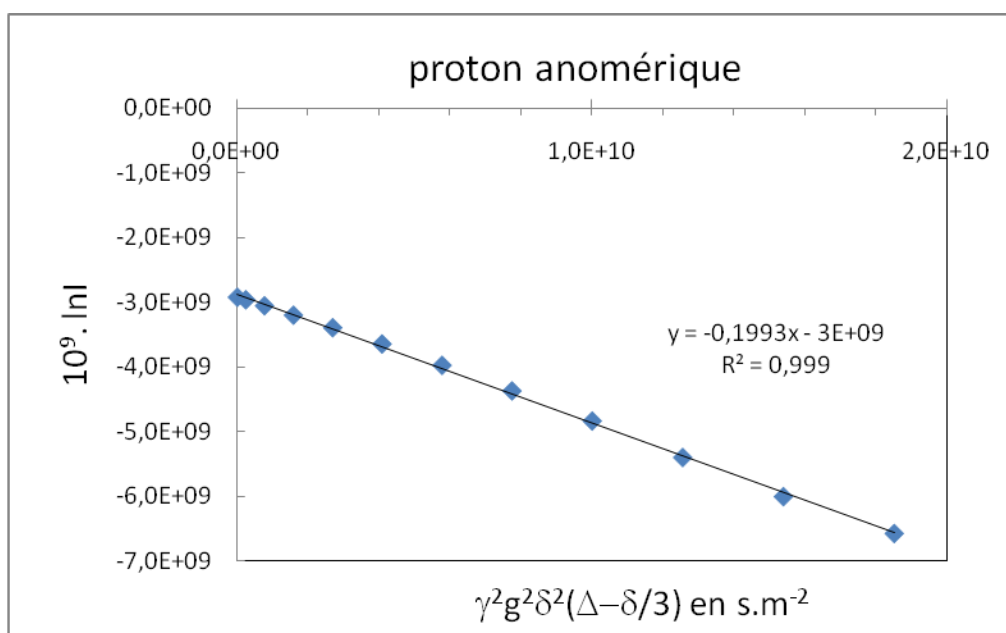


FIG. III.23 - Diagramme représentant le logarithme de l'intensité du signal du proton anomérique en fonction de $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ pour l'amorceur ZE159

On peut ainsi observer une parfaite linéarité en accord avec l'équation de Stejskal-Tanner, le coefficient de diffusion est alors déterminé en calculant la pente de la droite. Ce traitement mathématique a été réalisé en considérant tous les pics du spectre RMN ^1H à l'exception du signal des protons alcool. Le signal du solvant deutéré a été également pris en compte pour comparaison. Les différents résultats présentés dans le tableau III-5 montrent un très bon accord entre les différentes valeurs de D quelque soit le signal considéré de l'amorceur, ce qui confirme la structure de la molécule. La moyenne des valeurs citées donne $1.98 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. Nous pouvons remarquer que le coefficient de diffusion du solvant est très nettement supérieur ($7.67 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$), ce qui s'explique aisément par le fait que le DMSO a un volume hydrodynamique beaucoup plus petit que la molécule d'amorceur. On peut également visualiser ces résultats sur la figure III-22, puisque toutes les taches concernant la molécule d'amorceur sont alignées horizontalement, ce qui signifie que tous les protons de cette molécule ont le même coefficient de diffusion, alors que la tache correspondant au DMSO se situe plus bas verticalement puisque le solvant diffuse plus vite que l'amorceur.

	D en m²s⁻¹		
ZE159 amorceur	Pic entre 5.20 et 4.96 ppm (H anomérique)	Pic entre 3.78 et 3.62 ppm Pic 6	Pic entre 3.62 et 3.38 ppm
	1.99.10 ⁻¹⁰	1.99.10 ⁻¹⁰	1.96.10 ⁻¹⁰
	Pic entre 3.19 et 3.02 ppm Pic 2	Pic entre 1.84 et 1.51 ppm Pic b	Pic DMSO
	1.97.10 ⁻¹⁰	2.02.10 ⁻¹⁰	7.67.10 ⁻¹⁰
ZE164 CD-POE	Pic entre 5.18 et 4.98 ppm (H anomérique)	Pic entre 1.87 et 1.57 ppm Pic b	Pic DMSO
	1.20.10 ⁻¹⁰	1.16.10 ⁻¹⁰	7.27.10 ⁻¹⁰
ZE167 CD-POE	Pic entre 3.79 et 3.38 ppm		Pic DMSO
	1.10.10 ⁻¹⁰		nd*
ZE167 POE libre	Pic entre 4.59 et 4.51 ppm	Pic entre 3.70 et 3.44 ppm	Pic DMSO
	1.66.10 ⁻¹⁰	1.73.10 ⁻¹⁰	7.56.10 ⁻¹⁰

nd* : non déterminé (problème de phase)

Tableau III-5 : Coefficient de diffusion obtenus pour les différents pics caractéristiques de l'amorceur ZE159, des polymères en étoile ZE164, ZE167 et du polymère linéaire ZE167

Les coefficients des polymères en étoile ZE164 et ZE167 CD-POE (polymère ZE167 purifié) ont été déterminés de la même manière (Tableau III-5). Le coefficient de diffusion du polymère ZE164 a été calculé en considérant le signal du proton anomérique ainsi que le signal du proton b, facilement identifiables sur le spectre RMN ¹H. Le massif entre 4.0 et 3.2 ppm présentant des traces d'eau vers 3.3 ppm n'a pas été exploité. De même, aucun traitement mathématique n'a été fait sur le signal du proton 2 qui se superpose avec du méthanol résiduel. Ainsi nous trouvons un coefficient de diffusion pour le polymère ZE164 de l'ordre de 1.18.10⁻¹⁰ m²/s. Cette valeur est très inférieure à celle de l'amorceur (1.98.10⁻¹⁰ m²/s). Ce résultat montre très clairement que le polymère ZE164 est un objet beaucoup plus gros que la molécule d'amorceur et donc confirme que l'oxyde d'éthylène a polymérisé à partir des fonctions alcool de la cyclodextrine. Dans le cas d'un simple mélange « amorceur / chaînes α,ω-dihydroxy POE », les calculs de coefficients de diffusion faits sur les signaux des protons H1 et Hb auraient donné une valeur similaire à celle trouvée pour la molécule d'amorceur seule (cf ZE159). On peut

noter que la valeur de D du solvant est du même ordre de grandeur que celle trouvée dans l'échantillon ZE159. La structure en étoile a été également confirmée en analysant le polymère ZE167 purifié (ie exempt des chaînes α,ω -dihydroxy POE). Cette analyse a été réalisée après vérification de la pureté du polymère par SEC (cf §III.4.3). Contenu de la taille du polymère (M_n SEC = 17100 g/mol), les signaux des protons H1 et Hb n'apparaissent plus sur le spectre RMN ^1H et, donc, seul un traitement mathématique a pu être réalisé sur le massif principal. Ce dernier a été intégré seulement entre 3.79 et 3.38 ppm, de manière à exclure le pic de l'eau, ce qui a conduit à un coefficient de diffusion de $1.10.10^{-10}$ m²/s. De nouveau, cette valeur est très inférieure à celle trouvée pour l'amorceur. L'expérience DOSY permet donc de valider la structure en étoile des polymères. La comparaison des valeurs de coefficient de diffusion des deux polymères en étoile montre une valeur plus faible pour l'échantillon ZE167 CD-POE, ce qui est en accord avec sa masse molaire plus élevée.

Il nous a semblé intéressant d'analyser par cette technique les chaînes α,ω -dihydroxy POE extraites du polymère ZE167 lors de l'étape de purification. Cette fraction est notée ZE167 POE libre dans le tableau III-5. Deux calculs ont été réalisés, le premier en prenant le signal des fonctions OH et le second en prenant le signal du massif polymère situé entre 3.70 et 3.44 ppm. Bien que le calcul fait sur le massif soit très probablement plus précis, les deux valeurs trouvées restent du même ordre de grandeur. Nous remarquons que le coefficient de diffusion du polymère en étoile ZE167 CD-POE ($1.10.10^{-10}$ m²/s) est très différent de celui du polymère ZE167 POE libre ($1.73.10^{-10}$ m²/s), confirmant ainsi que ces deux polymères ont des volumes hydrodynamiques très différents. Le coefficient de diffusion décroît avec la masse molaire du polymère, cependant il ne faut pas oublier que le facteur forme joue aussi un rôle important.

III.4.5. Aspect cinétique

De manière générale, une étude cinétique consiste à faire des prélèvements à différents temps de réaction. Cependant, dans notre cas, pour des mesures de sécurité du fait de l'utilisation de l'oxyde d'éthylène, il est préférable de ne pas avoir recours à des prélèvements dans le réacteur. Néanmoins, nous avons réalisé les expériences de polymérisation (tableau III-4) en faisant varier uniquement le temps de polymérisation, ce qui permet d'établir tout de même une étude cinétique. Nous faisons l'hypothèse d'une cinétique d'ordre 1 et indépendante de l'eau résiduelle, qui peut être confirmée expérimentalement en traçant la variation de $\ln ([M]_o/[M]_t)$ en fonction du temps. Par ailleurs, cette variation est représentée figure III-24 et montre bien une évolution linéaire qui confirme l'hypothèse émise, impliquant une concentration en centres actifs constante au cours du temps. La constante de vitesse apparente (k_{app}), peut être déterminée par la pente de cette droite linéaire et est égale à $0,014 \text{ L.mol}^{-1}.\text{jour}^{-1}$, ce qui est très proche du résultat obtenu par Badi¹⁰, qui a déterminé un k_{app} égale à $0,011 \text{ L.mol}^{-1}.\text{jour}^{-1}$.

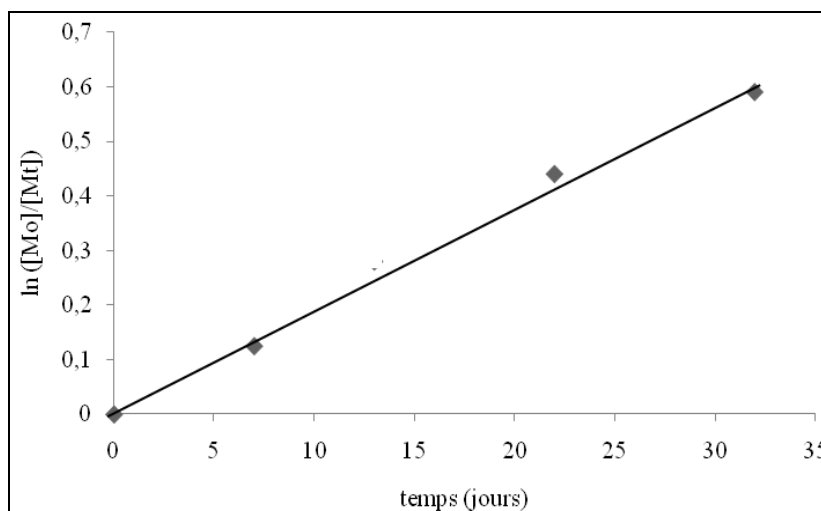


FIG. III.24 - Graphe représentant la variation $\ln ([M]_o/[M]_t)$ en fonction du temps pour les expériences ZE164, ZE167 et ZE170 réalisées dans les mêmes conditions en faisant varier le temps de polymérisation

Enfin notons que dans cette étude cinétique, il serait intéressant de tracer l'évolution de la masse molaire en fonction de la conversion afin de prouver que nous n'avons ni réaction de transfert ni de réaction de terminaison spontanée. Malheureusement, rappelons que, lors des réactions de polymérisations, nous avons obtenu de manière générale deux populations, à savoir les polymères en étoile et linéaire. Afin de tracer cette droite, nous

devons reporter la masse molaire du polymère en étoile, et la conversion qui correspond au rendement de polymérisation, impliquant aussi bien les polymères en étoile que linéaire. Il ne paraît donc pas judicieux de tracer cette courbe dans ces conditions. Ainsi, nous ne pouvons pas démontrer de manière certaine le caractère vivant de la polymérisation.

III.4.6. Polymérisation anionique d'oxyde de propylène amorcée par la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -cyclodextrine

L'OP permet d'améliorer le caractère hydrophobe du polymère en étoile envisagée. En première hypothèse, nous proposons que la réactivité de l'oxyde de propylène est équivalente à celle de l'oxyde d'éthylène et nous allons fixer les paramètres de la première expérience ZE117 (tableau III-6) dans les conditions exactes de la polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène pour le polymère étoile ZE164, obtenu sans formation de polymères linéaires (tableau III-4). Les expériences ont été menées dans la DMF, à 40°, en présence de DPMK (10% par rapport à la quantité de fonctions hydroxyles). Comme dans le cas de l'oxyde d'éthylène, l'oxyde de propylène nécessite un séchage parfait avant toute utilisation. Pour cela, le monomère est séché tout d'abord sur hydrure de calcium durant deux nuits, puis trois fois sur du dibutylmagnésium. Le tableau III-6 regroupe les caractéristiques des réactions de polymérisation anionique de l'oxyde de propylène amorcées par les per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CDs.

Tableau III-6 : Expériences de polymérisations anioniques de l'oxyde de propylène amorcées par la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD dans la DMF à 40°C et en présence de DPMK (10%/ [OH])

Exp ^{ee}	[OP] mol.L ⁻¹	[OH] mol.L ⁻¹	Temps de réaction	\overline{Mn} théorique g/mol *	n (motif OP) par branche
ZE117	2,4	<u>1,6.10⁻²</u>	7 jours	660000	0
ZE118	<u>2,4</u>	<u>2,0.10⁻²</u>	7 jours	100000	0
ZE124	<u>6,0</u>	2,0.10 ⁻²	7 jours	250000	0
ZE125	3,0	2,0.10 ⁻²	<u>13 jours</u>	160000	0
ZE126	3,0	2,0.10 ⁻²	<u>35 jours</u>	160000	0

* non corrigée par le rendement de polymérisation

L'analyse du tableau, montre l'absence de polymérisation pour toutes les conditions de polymérisation testées. En effet, la caractérisation par RMN ¹H des cinq produits ne présente pas de pics relatifs aux chaînes de poly(oxyde de propylène). Cela indique que l'augmentation de la concentration en amorceur ou en monomère, ainsi que l'augmentation du temps de réaction n'améliorent pas la réaction de polymérisation de l'OP. Au départ, nous avons attribué ces échecs aux séchages des réactifs et notamment de l'oxyde de propylène. Il est connu que des réactions de transfert ont lieu dans le cas de l'oxyde de propylène. Cependant cela n'explique pas la non polymérisation puisque l'oxyde de propylène peut réagir sur des groupements hydroxyles pour aboutir à un polymère linéaire. Une expérience en présence d'éther couronne a été effectuée, cependant une burette a rapidement explosé sous l'effet de la surpression dans le réacteur. Néanmoins, l'utilisation d'agent complexant pourrait aider à amorcer la polymérisation d'oxyde de propylène et de plus amples expériences doivent être menées. Nous pouvons également envisager l'utilisation de triisobutyl aluminium (i-Bu³Al), qui améliore fortement la vitesse de polymérisation des oxiranes²⁵.

III.4.7. Conclusion sur les polymérisations anioniques d'oxiranes amorcées par les dérivés de cyclodextrines

Les réactions de polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène amorcées par les dérivés de cyclodextrines ont été réalisées avec succès. L'étude cinétique ne permet pas de montrer démontrer une polymérisation contrôlée, avec des concentrations en centre actifs constantes au cours du temps, de par la prise en compte de POE linéaires dans le calcul de la conversion. Néanmoins, les rendements obtenus ne sont pas totaux ce qui s'explique par la cinétique lente de la réaction. La mise en évidence de l'inefficacité du séchage de la cyclodextrine, a conduit à mettre en place un protocole de séparation des polymères en étoile et des polymères linéaires. L'extraction par sonication à chaud dans de l'éther a permis d'obtenir des polymères en étoile parfaitement purs. Enfin la spectroscopie par RMN DOSY a permis de compléter la caractérisation chromatographique et spectroscopique habituelle dans le but de confirmer le greffage des chaînes de POE sur les cyclodextrines. Enfin, les réactions de polymérisations anioniques de l'oxyde de propylène, quant à eux, ont échoué, du fait de la difficulté d'amorçage de l'OP, de l'existence de réaction de transfert ou bien de l'affinité de la cavité de la cyclodextrine pour ce type de monomère.

III.5. Conclusion

Dans ce chapitre, tout d'abord, nous avons mis en place un protocole de synthèse dans la DMF des polymères linéaires possédant une extrémité allyle, les α -allyl- ω -hydroxy-POE. Ceux-ci sont obtenus avec des rendements très élevés et des distributions en poids moléculaire très étroites, ce qui prouve le contrôle de la polymérisation anionique et valide la méthode de synthèse. Les conditions opératoires ainsi mises en place, ont été utilisés dans le cas des cyclodextrines natives. De faible taux de polymérisation d'oxyde d'éthylène sur ces amorceurs multifonctionnels ont permis de montrer l'amorçage prioritaire des alcoolates en position 2. Afin de comparer la vitesse d'amorçage à celle de la propagation, il serait intéressant de synthétiser une large gamme de polymères de différents degrés de polymérisation.

Enfin, nous avons synthétisé des polymères en étoile possédant des chaînes de poly(oxyde d'éthylène) de différentes masses molaires, à partir de dérivés de cyclodextrines possédant 14 fonctions hydroxyle de même réactivité, ce qui n'est pas le cas de la cyclodextrine native. A travers ces exemples, nous avons mis en place une méthode d'extraction des polymères en étoile, qui a permis d'obtenir des macromolécules parfaitement pures. Par ailleurs, la caractérisation par RMN DOSY a confirmé le greffage des chaînes de POE sur les dérivés de cyclodextrines. Enfin, une étude cinétique a permis de montrer une cinétique d'ordre 1. Néanmoins les réactions de polymérisation avec l'oxyde de propylène ont échoué et demandent de plus amples investigations, notamment au niveau des conditions de synthèse, avec l'utilisation d'agents complexants par exemple.

Ainsi, nous avons ainsi montré que la polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène à partir de différents types d'amorceur est parfaitement contrôlée permettant d'obtenir notamment des macromolécules amphiphiles et hydrosolubles. La capacité de ces nouveaux dérivés de CDs amphiphiles à former des canaux artificiels dans les bicouches lipidiques fait l'objet du prochain chapitre.

Références bibliographiques du chapitre III

1. Canceill, J.; Jullien, L.; Lacombe, L.; Lehn, J-M; Synthesis of Bouquet-Shaped Molecules Based on a β -Cyclodextrin Core, *Helvet. Chim. Acta*, **1992**, 75, 791-812.
2. Pregel, M. J.; Jullien, L.; Canceill, J.; Lacombe, L.; Lehn, J.-M.; Channel-type molecular structures, Part 4. Transmembrane transport of alkali-metal ions by 'bouquet' molecules, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1995**, 2, 417-426.
3. Cammas-Marion, S.; Okano, T.; Kataoka, K.; Functional and site-specific macromolecular micelles as high potential drug carriers, *Colloids and Surfaces B: biointerfaces* **1999**, 16, 207-215.
4. El Ghouli, Y.; Huin, C.; Guégan, P.; New Cyclodextrin-Based Ion Channels by Click-Chemistry, 15th International Cyclodextrin Symposium May 9th - 12th, Vienna, **2010**
5. www.cyclodex.com/about.asp?page_id=2&n=2
6. Topchieva, I. N.; Polakov, V. A.; Elezkaya, V.; Bystryzky, G. I.; Karezin, K.I.; One-pot synthesis of cyclodextrins, modified with poly(ethylene oxide), *Polymer Bulletin* **1997**, 38, 359-364.
7. Topchieva, I. N. ; Mischnick, P. ; Kühn, G. ; Polyakov, V. A. ; Elezkaya, S. V. ; Bystryzky, G. I. ; Karezin, K. I. ; Novel derivatives of cyclodextrins, modified with poly(ethylene oxide) and their complexation properties, *Bionconjugate Chem.* **1998**, 9, 676-682.
8. Fontanille, M.; Gnanou, Y.; Chimie et physico-chimie des polymères, Ed. Dunod, 293-300, **2002**.
9. Benkhaled, A. ; Synthèse de cyclodextrines amphiphiles appliquées à la modification de surfaces métalliques ou des membranes biologiques modèles, *Thèse de doctorat de l'université d'Evry-Val-d'Essonne* **2004**.
10. Badi, N. ; Polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène amorcée par des cyclodextrines modifiées : application à l'étude des canaux artificiels, *Thèse de doctorat de l'université d'Evry-Val-d'Essonne* **2006**.
11. Badi, N.; Auvray, L.; Guégan, P.; Synthesis of Half-Channels by the Anionic Polymerization of Ethylene Oxide Initiated by Modified Cyclodextrin, *Advanced Materials* **2009**, 21, 40, 4054-4057.
12. Khan, A. R.; Forgo, P.; Stine, K. J.; D'Souza, V. T.; Methods for selective modification of Cyclodextrins, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1977-1996.

13. Rekharsky, M. V.; Inoue, Y.; Complexation thermodynamics of cyclodextrins, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1875-1917.
14. Initiation à la chimie et la physico-chimie macromoléculaire, GFP, 11.
15. Ritscher, T.A., Elias, H. G.; *Macromol.* **1959**, 30, 48.
16. D. W. T. Claridge, High- Resolution Techniques in Organic Chemistry, *Tetrahedron Organic Chemistry Series* **1999**, Volume 19.
17. R.T.Williamson, E.L. Chapin, A.W. Carr, J.R. Gilbert, P.R. Graupner, P. Lewer, P. McKamey, J.R. Carney, W.H. Gerwick, *Org. Lett.* **2000**, 2:289-292.
18. C.C. Stessman, R. Ebel, A.J. Corvino, P. Crews, *J. Nat. Prod.* **2002**, 65: 1183-1186.
19. L. Masaro, X.X. Zhu, P.M. Macdonald, *Macromolecules* **1998**, 31: 3880-3885.
20. W.E. Baille, C. Malveau, X.X. Zhu, Y.H. Kim, W.T. Ford, *Macromolecules* **2003**, 36: 839-847.
21. S.B. Kharchenko, R.M. Kannan, J.J. Cernohous, S. Venkataramani, *Macromolecules* **2003**, 36: 399-406.
22. T. Furukawa, K. Ishizu, Y. Yamane, I. Ando, *Polymer* **2005**, 46: 1893-1898.
23. C.S. Johnson Jr, *Prog NMR spectrosc.* **1999**, 12, 203-256.
24. K.F. Morris, C.S. Johnson Jr., *J. Am Chem. Soc.* **1993**, 115: 4291-4299.
25. Rejsek, V.; Sauvanier, D.; Billouard, C.; Desbois, P.; Deffieux, A.; Carlotti, A. ; Contrôle anionique homo-and copolymérisation of ethylene oxide and propylene oxide by monomer activation, *Macromolecules* **2007**, 40, 6510-6514.

Chapitre IV :

Application à l'étude des canaux ioniques

IV.1. Introduction

Nous avons vu dans le chapitre précédent la synthèse de polymères en étoile à cœur cyclodextrine conçus dans l'objectif de les insérer dans les bicouches lipidiques, à la manière des canaux permanents, c'est-à-dire avec des temps de vie élevés. Une telle stratégie a déjà été envisagée par des chercheurs au sein du laboratoire, qui ont synthétisé des polymères en étoile à 21 branches de poly(oxyde d'éthylène)¹. Ces macromolécules n'ont montré aucune propension à former des canaux permanents.

Nous proposons dans ce chapitre d'étudier le comportement de nouveaux dérivés de cyclodextrines à 14 branches de POE. Nous avons fait le choix d'étudier leur capacité à former des canaux ioniques par la méthode d'électrophysiologie² (§ I.1.5). Cette méthode présente plusieurs avantages (i) elle montre la présence d'un pore à l'échelle unique de manière instantanée (ii) l'exploitation des résultats permet d'évaluer la taille du pore formé et enfin (iii) elle détecte le passage de différents ions, mais également de molécules ou des macromolécules. Ce chapitre va débiter par la description des caractéristiques des lipides membranaires modèles et des dérivés de cyclodextrines testées. Puis nous étudierons la formation de canaux permanents.

IV.2. Caractéristiques de la membrane lipidique modèle et des cyclodextrines testées

Afin de former la bicouche lipidique, le lipide utilisé est le 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-phosphocholine (diphytanoyle) (tableau IV-1, B). Celui-ci permet l'obtention de membranes lipidiques suffisamment épaisses (6nm) et résistantes, pour l'insertion de nos molécules de taille supérieure ou égale à 2nm (tableau IV-1, C et IV-1, D).

Afin d'estimer la taille des lipides membranaires et des molécules testées, nous utilisons les longueurs de liaisons et les angles de valence pour une chaîne en zig-zag, d'après la théorie VSEPR (tableau IV-1, A). En considérant que les liaisons C-C, C-O sont respectivement de 1,54 Å et 1,42 Å, avec des angles de valence 109°28 et 104°50, nous pouvons déterminer la longueur des chaînes alkyle des lipides membranaires

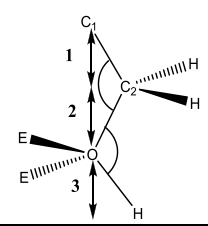
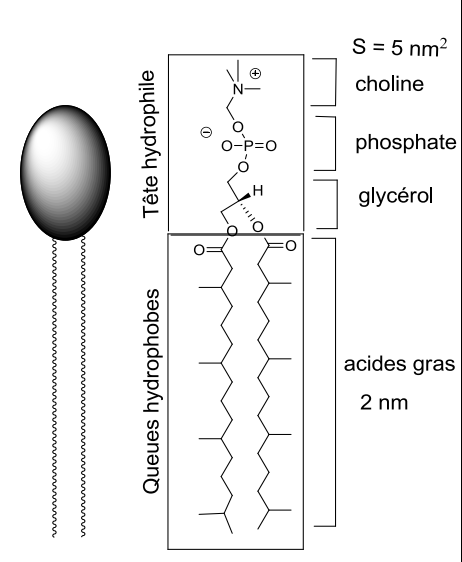
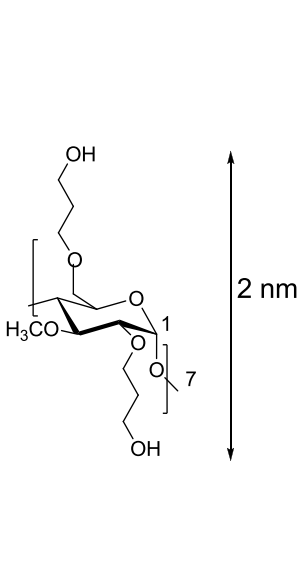
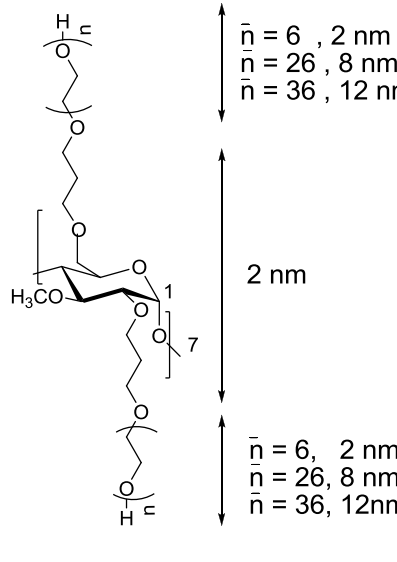
<p>A) Longueurs des liaisons : $C_1-C_2 = 1,54 \text{ \AA}$ $C_2-O = 1,42 \text{ \AA}$ $O-H = 0,98 \text{ \AA}$</p> <p>Angle de valence : $C_2 : AX_2E_2, sp^3, \text{tétraèdre}, 109^\circ 28'$ $O : AX_4, sp^3, \text{coudée}, 104^\circ 50'$ E : doublets non liants</p> <div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;">  <div style="margin-left: 20px;"> <p>Longueurs des liaisons</p> <p>1 : 1,26 Å 2 : 1,15 Å 3 : 0,77 Å</p> </div> </div>		
Lipides	Amorceur	Polymères en étoile
<p>1,2-diphtynaoyl-sn-glycéro-3-phosphocoline (diphytanoyle)</p>	<p>per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)-β-CD</p>	<p>per(2,6-di-O-hydroxypropyl-POE--3-O-méthyl)-β-CD</p>
 <p>Epaisseur théorique de la membrane = 4-6 nm Épaisseur expérimentale = 3,2-6,2 nm Soluble dans le décane</p>	 <p>ZE159 Taille de la molécule = 2 nm Soluble dans l'eau</p>	 <p>$\bar{n} = 6, 2 \text{ nm}$ $\bar{n} = 26, 8 \text{ nm}$ $\bar{n} = 36, 12 \text{ nm}$</p> <p>2 nm</p> <p>$\bar{n} = 6, 2 \text{ nm}$ $\bar{n} = 26, 8 \text{ nm}$ $\bar{n} = 36, 12 \text{ nm}$</p> <p>ZE164, ZE167, ZE170 Solubles dans l'eau</p>

Tableau IV-1 : Caractéristiques des lipides membranaires et des molécules testées

Le diphytanoyle (tableau IV-1, B) possède une tête polaire d'environ 5 nm^2 et plusieurs chaînes hydrocarbonées hydrophobes d'environ 2-3 nm de longueur, ce qui lui confère un caractère amphiphile. Expérimentalement, l'épaisseur de la membrane peut être déterminée en mesurant la capacité C lors des expériences d'électrophysiologie. Cette capacité est directement liée à l'épaisseur de la membrane selon l'équation :

$$C = \varepsilon_0 \varepsilon \frac{S}{e} \quad \text{Equation IV-1}$$

S : l'aire de la bicouche qui est délimitée par l'ouverture de 150µm de diamètre.

Ainsi $S = \pi \cdot R^2$ avec R le rayon de l'ouverture. S vaut alors $1,77 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2$;

ε_0 : permittivité électrique du vide ($8,8542 \cdot 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$) ;

ε : constante diélectrique de la bicouche (environ 2)

Les capacités membranaires mesurées expérimentalement sont comprises entre 50 et 70 pF, ce qui implique que l'épaisseur moyenne de la bicouche lipidique est comprise entre 4,2 et 6,2 nm. Néanmoins nous considérons que l'épaisseur est sous estimée par ce calcul, car il ne prend pas en compte le fait qu'il y ait du solvant. L'épaisseur de la membrane est un facteur important pour l'insertion des molécules testées.

Dans ce qui suit, nous présentons les essais pour deux types de molécules, dont les caractéristiques sont reportées dans le tableau IV-1, C et D. Tout d'abord, le per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD (tableau IV-1, C), amorceur de la polymérisation anionique, qui présente : (i) 7 groupements propyle sur chaque face, de longueur égale à 0,6 nm chacun, ce qui permet d'obtenir une longueur totale, selon l'axe moléculaire, égale à 2 nm; (ii) 14 fonctions hydroxyle de classe primaire ; (iii) 7 groupements méthyle, en position 3. Les polymères en étoile obtenus à partir de cet amorceur et représentés dans le tableau IV-1(D) vont également être testés. Ces macromolécules hydrosolubles présentent des chaînes de poly(oxyde d'éthylène) de longueur de contour totale variant de 6 à 26nm.

IV.3. Exploitation des résultats

Par ces mesures électriques, rappelons que nous suivons l'intensité du courant en fonction du temps, une différence de potentiel étant appliquée entre les deux compartiments du dispositif. Lors de la formation du canal, un saut de courant est observé correspondant au passage d'ions, dans notre cas K^+ et Cl^- (figure IV-1, A).

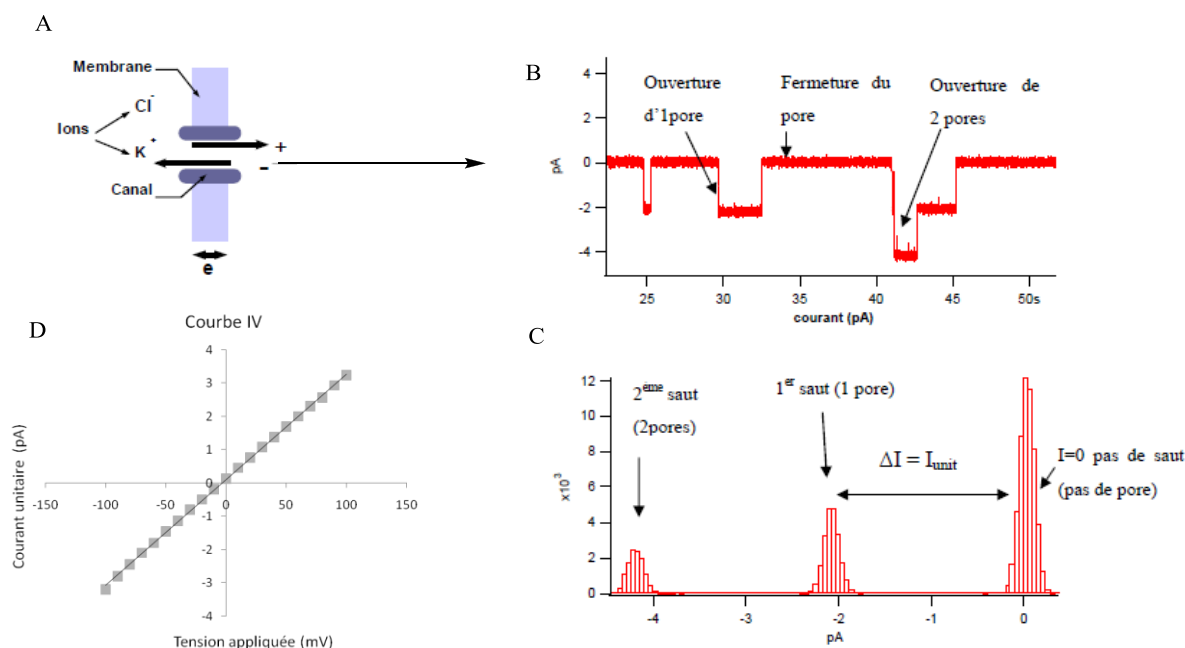


FIG. IV.1- A) Passage d'ions à travers un canal, B) Illustration des sauts de courant observés (négatif) suite à l'ouverture d'un ou deux canaux lors de l'application d'une tension de -100mV, C) Histogrammes représentant l'occurrence en fonction du courant, D) Courant unitaire I en fonction de la tension appliquée V .

Avant formation du canal, lorsqu'une différence de potentiel électrique est appliquée de chaque côté de la membrane, l'intensité mesurée est nulle, la membrane se comportant comme un isolant (figure IV-1, B). En revanche, une fois le canal formé, un saut de courant est observé. La valeur de l'intensité mesurée dépend de la différence de potentiel imposée et est proportionnelle à la section du canal. La largeur du saut de courant correspond à la durée d'insertion du canal. L'ouverture d'un canal dans la membrane de lipide est caractérisée par un saut de courant dont la hauteur correspond à l'intensité du courant unitaire (I_{unit}). Ce saut est négatif lors de l'application d'une tension négative. Lors de l'ouverture simultanée de deux pores, la hauteur est multipliée par deux (figure IV-1, B). Afin de déterminer de manière sûre la valeur du courant unitaire, pour une

différence de potentiel fixée, un histogramme est réalisé (figure IV-1, C). Celui-ci représente le nombre d'événements, l'occurrence (nombre de point dont le courant vaut I) en fonction de leur intensité. A chaque palier de courant correspond un pic de forme gaussienne. On en déduit précisément l'intensité de chaque pic. Les histogrammes obtenus vont nous permettre de représenter une courbe I-V, représentant l'intensité du courant unitaire en fonction de la tension appliquée (figure IV-1, D). La forme de cette courbe (linéaire ou non par exemple) nous donne des informations sur les caractéristiques du canal. Une relation linéaire entre I et V permet de calculer la résistance du pore (R_p) qui correspond à la pente de la droite $V=f(I)$ selon la loi d'Ohm. Dans le cas le plus simple, la résistance du pore ainsi déterminée peut être reliée aux paramètres géométriques de celui-ci (pour un pore cylindrique) par la relation IV-2 :

$$R_p = 4 \frac{\rho e}{\pi D^2} \quad \text{Equation IV-2}$$

Avec $\rho=0,0894 \Omega.m$: la résistivité de KCl (1M) ; e : l'épaisseur de la membrane (déterminée à partir de la capacité, équation IV-1) ; D : diamètre du canal .

La relation IV-2 permet alors de remonter à un diamètre apparent de pore. La longueur du pore est assimilée à l'épaisseur de la membrane, ce qui n'est pas tout à fait juste puisque la bicouche de lipides n'est pas homogène et possède une capacité à légèrement se déformer pour s'adapter au pore.

IV.4. Essais préliminaires avec la per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CD

IV.4.1. Introduction

Nous faisons l'hypothèse ici que l'auto-association de deux ou trois amorceurs amphiphiles (tableau IV-1,C) de 2 nm permettraient la formation de canaux ioniques dans des membranes lipidiques d'épaisseur moyenne comprise entre 4,2 à 6,2 nm (figure IV-2), à la manière des canaux peptidiques décrits par Ghadiri³ (§ I.1.2). Ces derniers sont obtenus par auto-association de cyclopeptides, impliquant des liaisons hydrogène intermoléculaires qui créent un effet coopératif.

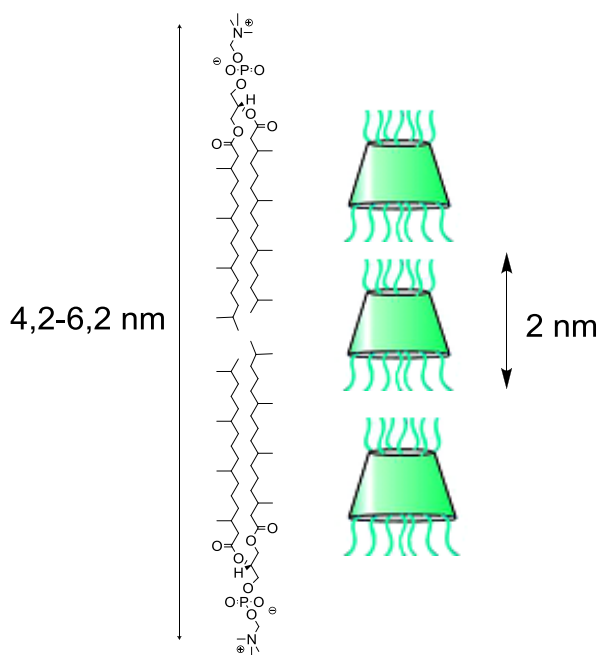


FIG. IV.2- Représentation schématique de l'auto-association supposée des per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CDs dans la formation d'éventuels canaux ioniques

Au vu de cette hypothèse, des essais électrophysiologiques ont été effectués et l'exploitation des résultats est décrite dans la partie qui suit.

IV.4.2. Exploitation des résultats et discussions

L'étude du comportement de l'amorceur a été réalisée. Ces molécules ont été déposées dans les deux compartiments de mesure, et une série de mesure a été effectuée sur une gamme de concentration variant de 5 à 100 μM dans chaque compartiment. La variation du courant électrique en fonction du temps, que nous appellerons indifféremment chronoampérogramme ou trace, obtenue pour une tension appliquée de -100 mV et une concentration en cyclodextrine de 100 μM par compartiment est reportée figure IV-3.

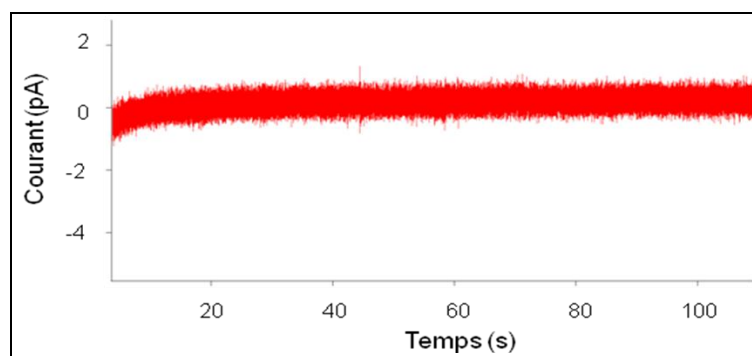


FIG.IV.3- Enregistrement de la variation du courant en fonction du temps pour une tension appliquée de -100 mV et pour des concentrations en CD (ZE159) de 100 μM

Le chronoampérogramme de l'amorceur ZE159 (figure IV-3) ne montre aucun saut de courant, ce qui montre l'absence de formation de canaux ioniques. Cette observation a été faite sur toute la gamme de concentration testée. Les résultats obtenus avec les amorceurs ne sont pas concluants.

Ces expériences montrent l'importance de la nécessité d'augmenter le caractère amphiphile de la CD modifiée et donc d'avoir effectué la polymérisation de chaînes de poly(oxyde d'éthylène) sur ces amorceurs. En outre, l'intérêt de la solubilité des molécules dans l'eau est également important. La faculté d'insertion de ces polymères en étoile hydrosolubles fait l'objet de la partie qui suit.

IV.5. Etude comparative du comportement des polymères en étoile de taille variable

IV.5.1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons observé par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) la formation d'agrégats par les polymères à base de cyclodextrines dans la DMF. Nous avons vu dans le tableau IV-1 (D) que les polymères en étoile sont parfaitement solubles dans l'eau. Afin de vérifier la forme prédominante de ces macromolécules dans l'eau, des analyses par diffusion dynamique de lumière (DLS) des polymères ZE164, ZE167 et ZE170, à différentes concentrations variant de $0,01\mu\text{M}$ à $10\mu\text{M}$ dans l'eau, sont effectuées. Dans tous les cas, les résultats obtenus ont montré que ces polymères en étoile sont sous forme unimoléculaire dans la solution de KCl 1M, comme le montre par exemple le diagramme du composé ZE164 à $0,2\mu\text{M}$ (figure IV-4).

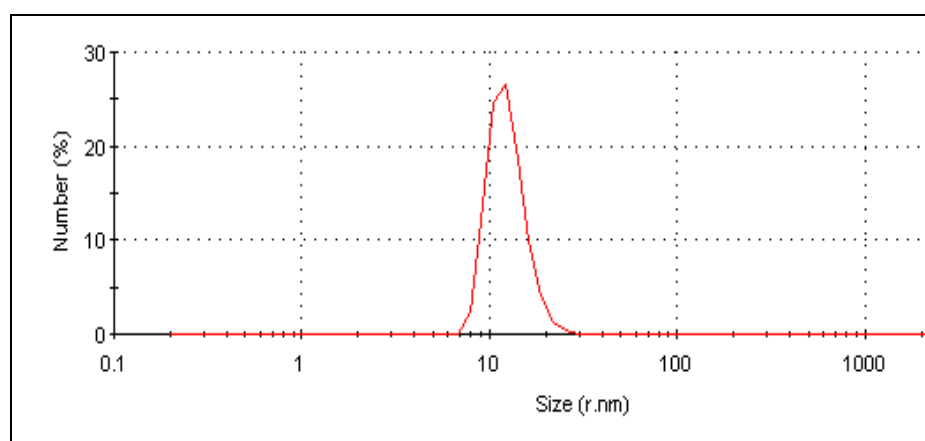


FIG.IV.4- Diagramme représentant la distribution granulométrique en nombre du polymère ZE164 ($0,2\mu\text{M}$) dans une solution de KCl 1M

Au vu de ce résultat, nous allons discuter de l'aptitude de chacun des polymères en étoile à s'insérer dans les bicouches lipidiques, à l'image d'un canal transmembranaire.

IV.5.2. Exploitation des résultats et discussion

Les macromolécules ZE170, ZE167 et ZE164 composés de chaînes de POE de taille décroissante (Tableau IV-1, D), sont ajoutées dans un seul compartiment de mesure et testées à des concentrations variant de $0,01\mu\text{M}$ à $10\mu\text{M}$ dans l'eau. Les mesures électriques des différents composés à $0,2\mu\text{M}$ par exemple et pour une différence de

potentiel appliquée de -100mV, sont reportées dans la figure IV-5. Notons que nous avons également réalisé des expériences en mélangeant les polymères en étoile aux solutions de lipides, cependant ces derniers n'ont pas été concluants.

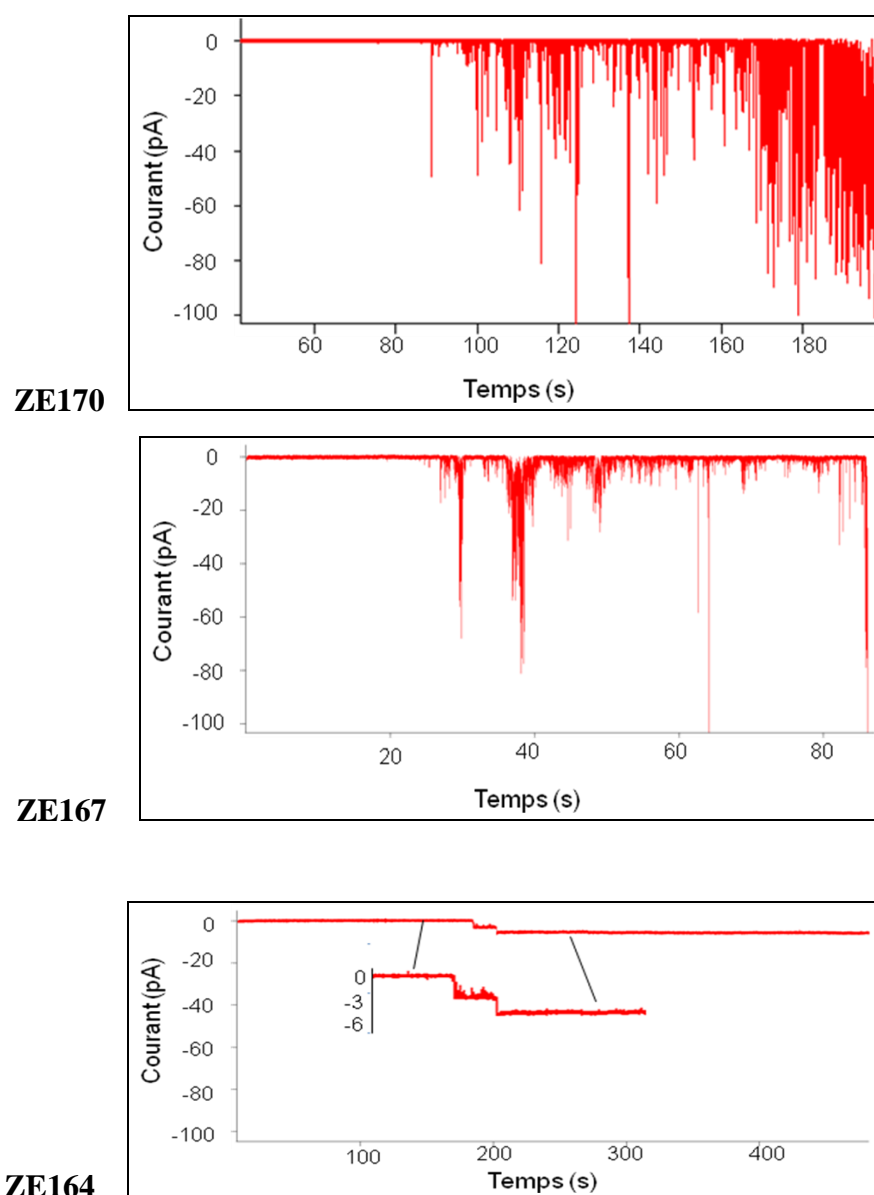


FIG. IV.5- Mesure du courant en fonction du temps pour les macromolécules ZE164, ZE167 et ZE170 pour une tension appliquée de -100 mV et des concentrations en cyclodextrine de 0,2 μ M

Les traces électriques obtenues avec les macromolécules de hautes masses molaires ZE167 et ZE170 montrent de nombreuses interactions suivies d'une rupture de la membrane. Seule la trace du composé ZE164 montre un saut de courant parfaitement stable de plusieurs minutes. Le courant unitaire pour ce canal transmembranaire est estimé à 3 pA. Pour ce polymère, des canaux permanents ont été observés dans une

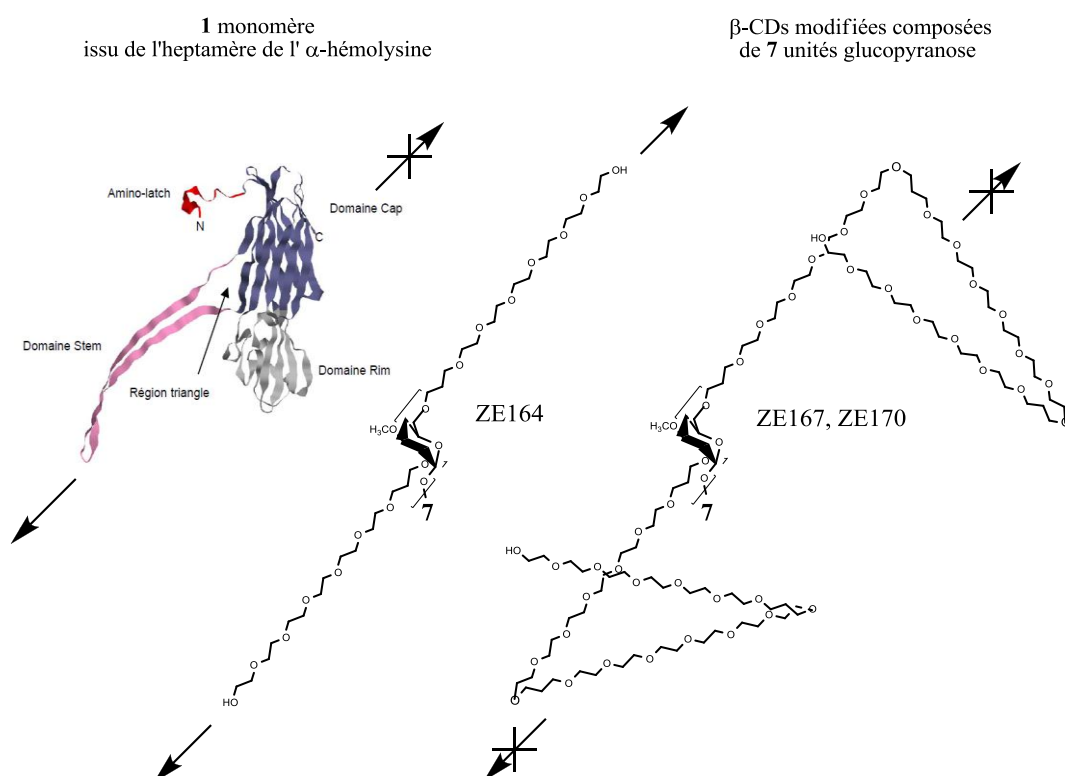
gamme de concentration de 0,2 μM à 1 μM , que nous allons décrire précisément dans le paragraphe qui suit. En dessous de 0,2 μM , nous n'avons observé que très peu d'événements tandis qu'au-delà de 1 μM , nous avons constaté de nombreux événements qui finissent par déstabiliser la membrane assez rapidement jusqu'à sa rupture.

Concernant les macromolécules ZE167 et ZE170, nous avons observé uniquement des interactions avec la membrane lipidique et ce même à des concentrations très faibles en cyclodextrine de l'ordre de 0,01 μM .

Dans notre cas, la taille des chaînes de POE semblent donc influencer l'insertion des macromolécules. Vial et al.⁴ et Huin et al.⁵ ont montré qu'il est possible de former des canaux avec des amphipols de taille variable. Ils ont également proposé différents mécanismes d'insertion de ces copolymères. Contrairement à ces chercheurs, les polymères que nous avons synthétisés possèdent une structure plutôt rigide due à la présence de la cyclodextrine, il est donc difficile d'envisager les mécanismes proposés par ces auteurs.

Afin de proposer un mécanisme d'insertion pour les polymères synthétisés, il serait intéressant de comparer nos macromolécules à l' α -hémolysine. Sur la figure IV.6 (A), nous avons reporté le sens d'insertion des macromolécules en comparaison à celui de l' α -hémolysine.

A) Sens d'insertion



B) Caractéristiques des pores formés

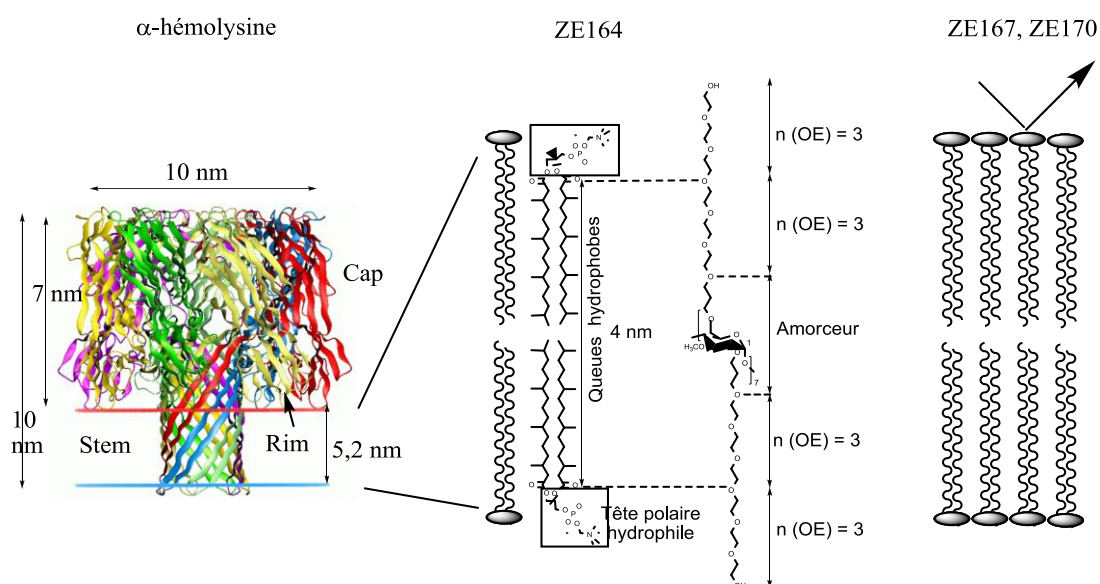


FIG. IV.6- A) Sens d'insertion B) caractéristiques des pores formés

Nous pouvons observer sur la figure IV-6 (A) que les monomères issus de l' α -hémolysine possèdent plusieurs domaines, dont le moins volumineux (domaine stem),

oriente l'insertion de la molécule. L'oligomérisation de ces monomères forme un heptamère à l'origine du pore dont les caractéristiques sont reportées figure IV-6 (B).

Dans le cas des polymères en étoile, la conformation des chaînes POE diffère en fonction de leur taille. Dans le cas de la macromolécule composée de POE de faible taille ($n(\text{OE}) = 6$), nous faisons l'hypothèse d'une conformation proche du domaine stem de l' α -hémolysine, qui permet une insertion du polymère ZE164 des deux côtés de la cyclodextrine. Dans le cas des polymères ZE 167 et ZE170 ($n(\text{OE})=26$ et 32), nous envisageons des repliements de chaînes de POE, à l'image du domaine Cap de l' α -hémolysine. Dans ce cas, les polymères en étoile sont incapables de s'insérer. Ces résultats expliqueraient l'insertion du composé ZE164, contrairement aux composés ZE167 et ZE170, dont nous avons décrits les traces figure IV-5.

La taille des chaînes POE des polymères en étoile est donc un paramètre important dans leur capacité à s'insérer dans les membranes lipidiques. La taille totale de la macromolécule doit être en adéquation avec celle de la bicouche lipidique, comme nous l'avons reporté sur la figure IV-6 (B) pour le polymère ZE164. Nous pouvons observer que dans ce cas, de part et d'autre de l'amorceur, trois unités d'oxyde d'éthylène seulement entrent en contact avec la partie hydrophobe de la bicouche lipidique.

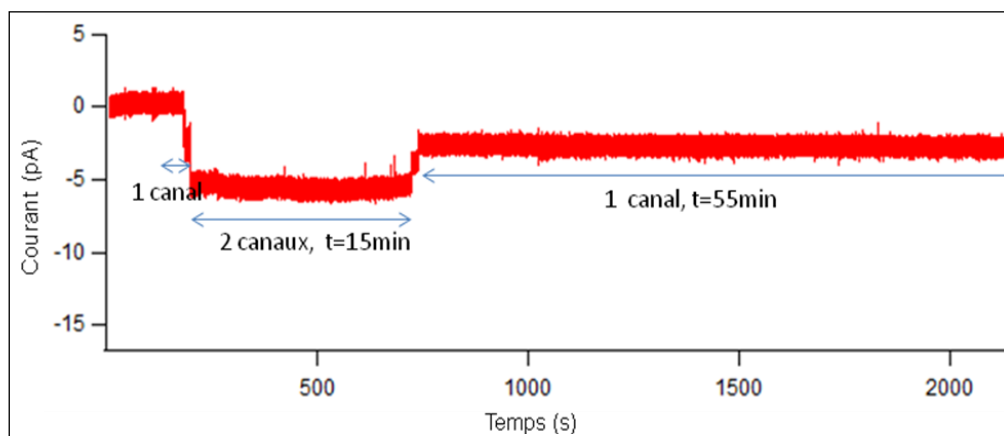
Le polymère ZE164, de taille équivalente à celle de la bicouche lipidique, a montré des résultats encourageants dans la formation de canaux permanents, qui vont faire l'objet du paragraphe suivant.

IV.6. Les canaux permanents

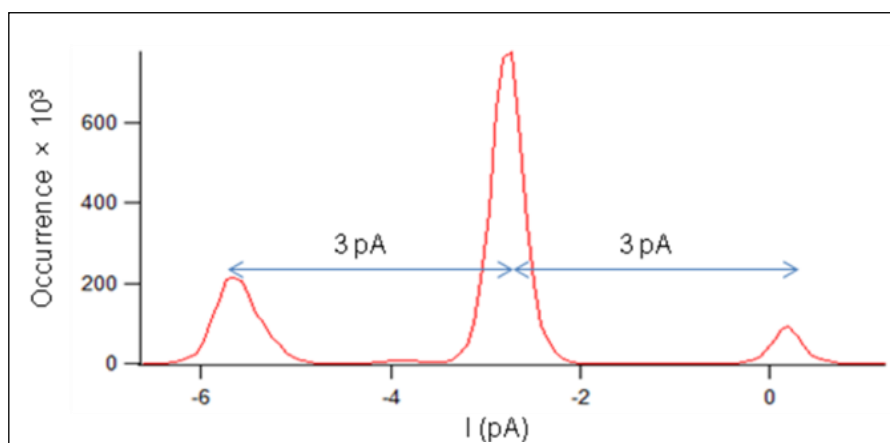
Nous avons vu dans le paragraphe précédent, la capacité des polymères en étoile ZE164 à s'insérer dans les membranes lipidiques avec des temps d'insertion élevés. Ces observations ont été faites pour une gamme de concentration variant de 0,2 μM à 1 μM . Ici, nous présentons les différents types de canaux permanents obtenus, leur durée de vie, ainsi que leur diamètre apparent.

IV.6.1. Courant en fonction du temps pour différentes concentrations en ZE164

Les mesures électriques obtenues pour une concentration en cyclodextrine de 0,2 μM et de 1 μM avec une différence de potentiel appliquée de -100mV sont reportées respectivement sur les figures IV-7 et IV-8.



A



B

FIG. IV.7- A) Mesure du courant en fonction du temps induit par l'ouverture d'un canal permanent pour une tension appliquée de -100mV et pour des concentrations en cyclodextrines de $0,2\text{ }\mu\text{M}$ B) Histogramme représentant l'occurrence en fonction du courant pour le composé ZE164 à $0,2\text{ }\mu\text{M}$ pour une tension appliquée de -100 mV

Sur la figure IV-7(A) nous pouvons observer deux sauts de courants conduisant à un saut de -6 pA , ce qui correspond à la formation de deux canaux avec une durée de vie d'environ 15 min. Avec le départ d'une macromolécule de la membrane, le courant remonte à -3pA , indiquant la présence cette fois d'un seul canal ionique, avec une durée de vie proche de l'heure. Après ce laps de temps, la membrane finit par se déstabiliser.

Afin de déterminer de manière certaine la valeur du courant unitaire, pour une différence de potentiel de -100 mV appliquée, un histogramme présentant le nombre d'événements en fonction de leur intensité est présenté sur la figure IV-8, B. Nous pouvons observer sur celui-ci, un pic à -6 pA, correspondant à l'ouverture des deux canaux ioniques permanents, ainsi que d'un pic à -3 pA, de très forte occurrence, attribué au canal permanent unitaire, le pic à 0 pA correspondant à la membrane seule.

Pour une concentration en polymère ZE164 cinq fois plus élevée, c'est-à-dire à 1 μM , la trace obtenue pour une différence de potentiel appliquée de -100mV, ainsi qu'une mesure du courant en fonction du temps sur une gamme de tension appliquée de $\pm 100\text{mV}$, sont reportées respectivement sur les figure IV-8 et IV-9.

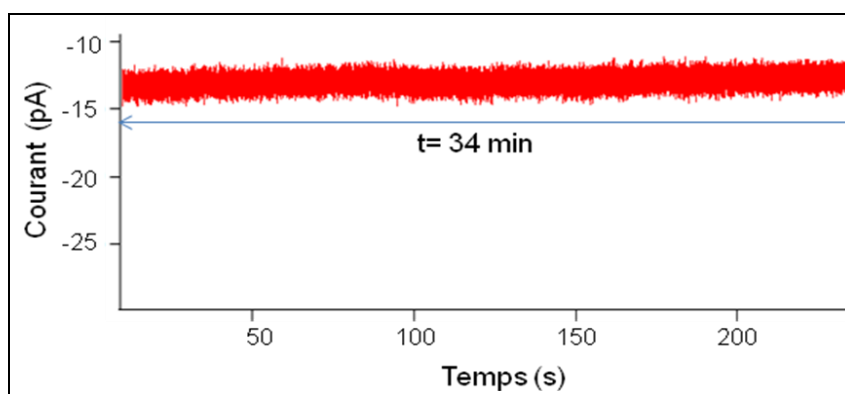
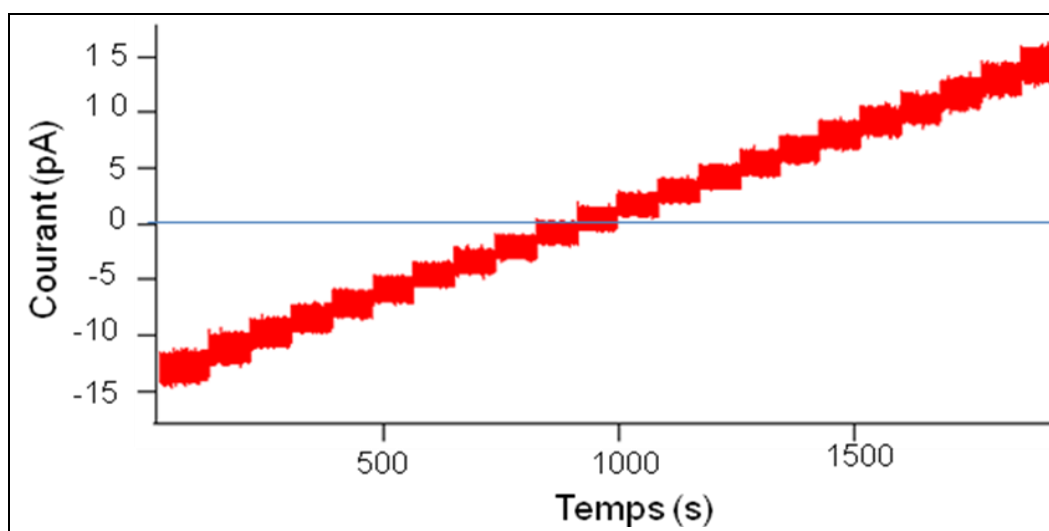


FIG. IV. 8- Mesure du courant en fonction du temps induit par l'ouverture de canaux pour une tension appliquée de -100 mV et pour des concentrations en cyclodextrines de 1 μM

Sur la trace de la figure IV-8, nous observons un courant de -12 pA, durant une demi-heure (en considérant la rampe figure IV.9), puis la membrane se déstabilise et finit par rompre. En comparant cette trace à celle de la figure IV-7 (A), nous pouvons en conclure que nous sommes en présence de 4 canaux ouverts simultanément. Cet exemple est intéressant, car il montre l'insertion instantanée et simultanée des polymères, c'est-à-dire dès leur incorporation dans le compartiment cis. Notons qu'avant l'insertion des polymères, la membrane formée est parfaitement stable (à 0 pA pour une tension appliquée de -100 mV) et imperméable. Nous avons également réalisé une rampe de -100 à +100 mV, par pas de 10 mV de 1 min (figure IV-9).



B

FIG.IV.9- Mesure du courant en fonction du temps induit, par l'ouverture de canaux pour une série de tension appliquée de ± 100 mV et pour des concentrations en cyclodextrines de $1\mu\text{M}$.

Nous pouvons observer sur cette trace d'une droite de pente non nul et passant par zéro. L'ensemble de ces résultats est autant d'éléments permettant l'hypothèse de la formation de canaux multiples.

Nous avons montré dans cette partie la formation de plusieurs types de canaux ioniques avec des temps de vie élevés. Nous supposons que des sauts de courant de 3 pA correspondent à des canaux permanents à l'échelle unique. Nous attribuons ainsi des sauts plus importants à des pores multiples indépendants. Par ailleurs, nous avons observé que la formation des canaux à l'échelle unique ou celle des pores multiples se font de manière très rapide (de la seconde à quelques minutes) juste après l'insertion des polymères dans le compartiment cis. Cependant, de plus amples études sont nécessaires, comme une étude systématique de la probabilité d'ouverture du pore en fonction de la concentration, pour montrer réellement l'effet de celle-ci sur les types de canaux et pour mettre en évidence le nombre de molécules impliquées dans la formation du pore, afin de montrer de manière certaine la formation d'un canal unimoléculaire transmembranaire.

IV.6.2. Diamètres apparents des canaux permanents

Pour caractériser complètement un canal, il est nécessaire de déterminer son diamètre apparent. Afin de répondre à cette question, lors de la formation des canaux permanents, une série de rampe de -100 mV à $+100$ mV est effectuée, mesures permettant de tracer la courbe de l'intensité mesurée en fonction de la tension appliquée, $I=f(V)$, pour chaque concentration (figure IV-9).

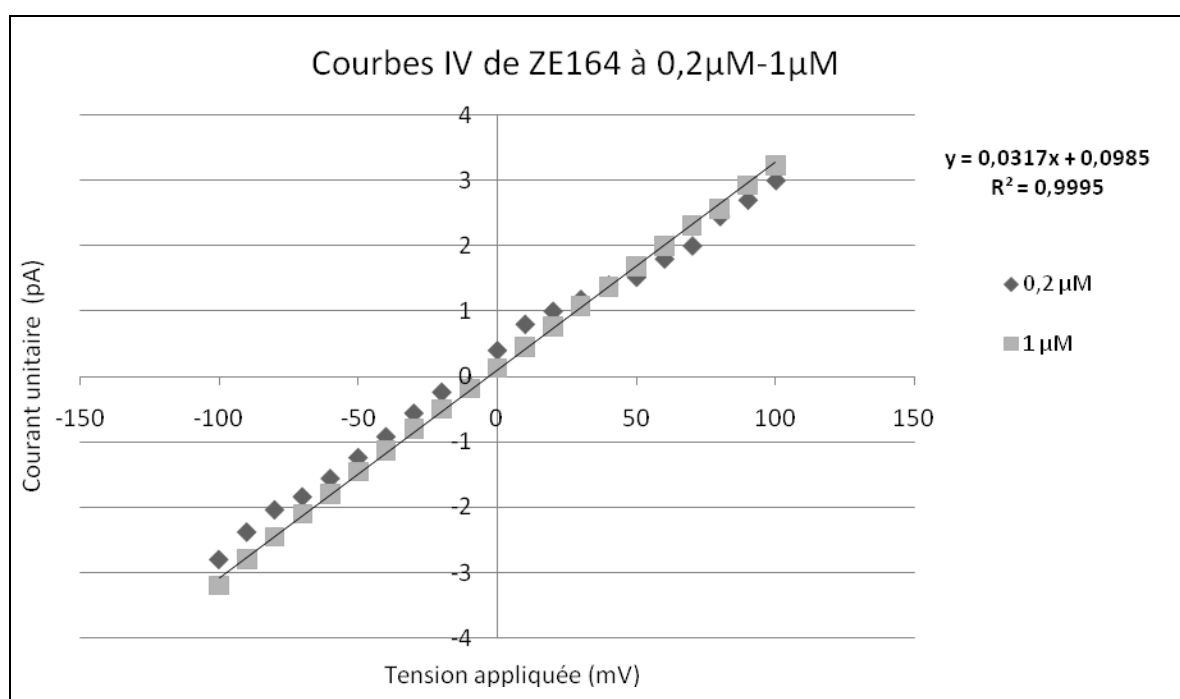


FIG. IV.10- Intensité du courant en fonction de la tension appliquée

Sur la figure précédente, en reportant le courant mesuré en fonction de la tension appliquée, nous pouvons observer une droite linéaire ($R^2 = 0,9995$) de pente égale à 0,0317 S, dans le cas d'un canal unitaire et quelque soit la concentration en cyclodextrine. Etant donné la linéarité de la courbe I-V et de l'absence de rectification, nous pouvons être assurés de la symétrie du canal, malgré la non symétrie complète de la molécule formant ce pore. Le fait d'avoir une géométrie asymétrique n'est pas suffisante pour induire une rectification.

Ainsi, la courbe de l'intensité en fonction de la tension étant indépendante de la concentration en polymères, la pente est indentique quelque soit la concentration macromoléculaire. La résistance du pore est indépendante de la quantité de polymère

introduite. L'équation IV-2 permet d'estimer les diamètres apparents obtenus pour les canaux permanents à 0,2 et 1 μM (tableau IV-2).

Concentrations en cyclodextrines	Epaisseur de la membrane	Rp (G Ω)	Dapp (Å)
0,2 μM canal unique	6,2 nm	31,5	1,4
1 μM 1 unité	5,2 nm	31,5	1,4

Tableau IV-2 : Caractéristiques du pore formé par le composé ZE164 à différentes concentrations dans des membranes lipidiques synthétiques

Dans le tableau IV-2, nous pouvons constater que les diamètres apparents déterminés à partir des valeurs des résistances des pores et des épaisseurs des membranes sont indépendants de la quantité de cyclodextrines. Pour les deux types de canaux, le diamètre apparent est égale à 1,4 Å, ce qui est bien inférieur au diamètre de la β -CD qui est de 7 Å et des ions K^+ et Cl^- de 1,68 et 3,61 Å respectivement.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette valeur quelque peu incohérente. La première hypothèse a été émise par Badi et al.⁷ qui ont fait les mêmes observations dans le cas d'hémi-canaux à base de cyclodextrine, caractérisés par électrophysiologie. Ils montrent que cette sous-estimation du diamètre apparent n'est pas liée à la présence de décane dans la cavité de la CD qui diminuerait ce diamètre⁵. De même, cela ne peut provenir de la formation de rotaxane, par la complexation d'une chaîne POE avec la cavité de la CD⁶. En réalité, la loi d'Ohm ne peut pas être directement appliquée aux canaux ioniques. La faible constante diélectrique de la membrane crée une haute barrière énergétique qui réduit fortement le transport des ions⁸. En utilisant l'approche de Nernst-Planck^{9,10}, une expression approximative de la conductance G du canal est donnée par la formule :

$$G = 2\pi R^2 c \frac{\lambda}{L} \exp(-\delta E / k_B T) \quad \text{Equation IV-3}$$

Avec λ : la conductance ionique équivalente dans l'eau, c : la concentration en ion, R : le rayon du canal, L : la longueur du canal, et δE : l'énergie d'activation non diffusionnelle.

En utilisant l'expression de Parsegian pour estimer δE^9 , qui est égale à $\delta E = 28,38/R$ kcal.mol⁻¹ lorsque R est mesuré en angstrom, il est possible d'écrire la relation suivante entre le rayon effective R_{eff} estimé à partir de la loi d'Ohm et R (en Å).

$$R_{eff}^2 = R^2 \exp\left(-\frac{\delta E}{k_B T}\right) = R^2 \exp\left(-\frac{47,3}{R}\right) \quad \text{Equation IV-4}$$

Le résultat obtenu pour le rayon du canal R est égale à 8,4 Å. Cette valeur est bien plus supérieure au rayon de la β -CD (rayon R=3,5 Å), ce qui s'explique par le fait que l'estimation de Parsegian sur-estime la barrière de l'énergie d'activation.

En outre, étant donné les dimensions du canal, canal qui est relativement court, en plus de cette résistance de pore classique, il existe une résistance d'accès des ions à ce pore. Il n'est pas rare que, dans ce cas, la résistance du pore (correspondant à la somme de la résistance du pore obtenu avec la loi d'Ohm et la résistance d'accès) soit multipliée par un facteur deux⁶.

Par ailleurs, il ne faut pas oublier que les ions K^+ et Cl^- sont solvatés et possèdent des sphères d'hydratation dont nous devons prendre en compte l'existence pour leur passage à travers le canal. En effet, étant donné les dimensions du canal, dans le cas d'un ion K^+ solvaté (figure IV.11), le passage de l'ion et des molécules d'eau associées ne peut se faire que s'il y a déshydratation à l'approche du canal de rayon $a = 0,35$ nm (β -CD). Il est sûr que l'énergie liée à cette déshydratation est en mesure de réduire la mobilité ionique à l'approche du canal, ce qui n'est pas du tout pris en compte dans les formules utilisées⁶ (Equation IV-2).

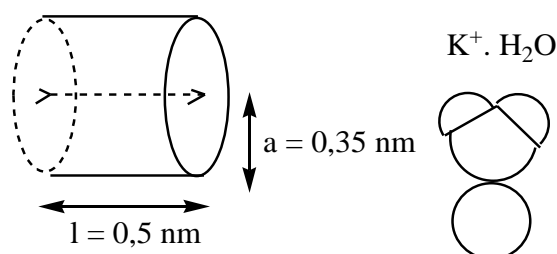


FIG.IV.11-Géométrie du canal présumé pour le calcul de la résistance du pore (R_p) (Equation IV-2), en présence d'un ion K^+ solvaté représenté à la même échelle que le pore.

Enfin, Hille⁶ nous donne un autre paramètre qui pourrait éventuellement réduire la mobilité effective des ions : la présence d'eau dans la cavité de la cyclodextrine⁷. La présence de celle-ci dans les canaux ioniques mène au couplage des flux ioniques et des mouvements de l'eau.

Toutes ces hypothèses peuvent expliquer la valeur du diamètre apparent obtenue qui ne paraît pas réaliste en vue de la taille de la cavité de la β -cyclodextrine.

IV.7. Structure moléculaire / activité

Nous allons étudier ici l'influence de la structure des macromolécules sur l'activité des canaux ioniques. Sur la figure IV.12 sont reportées les structures des molécules synthétisées au laboratoire : polymères en étoile à 7 et à 21 branches POE de Badi⁷ ainsi que les polymères en étoile à 14 branches de POE (ZE167 et ZE164) (figure IV-12, A), les traces électriques obtenues à partir de ces polymères (figure IV-12, B), et les hypothèses des différents mécanismes de formation des canaux ioniques et leurs caractéristiques (figure IV-12, C).

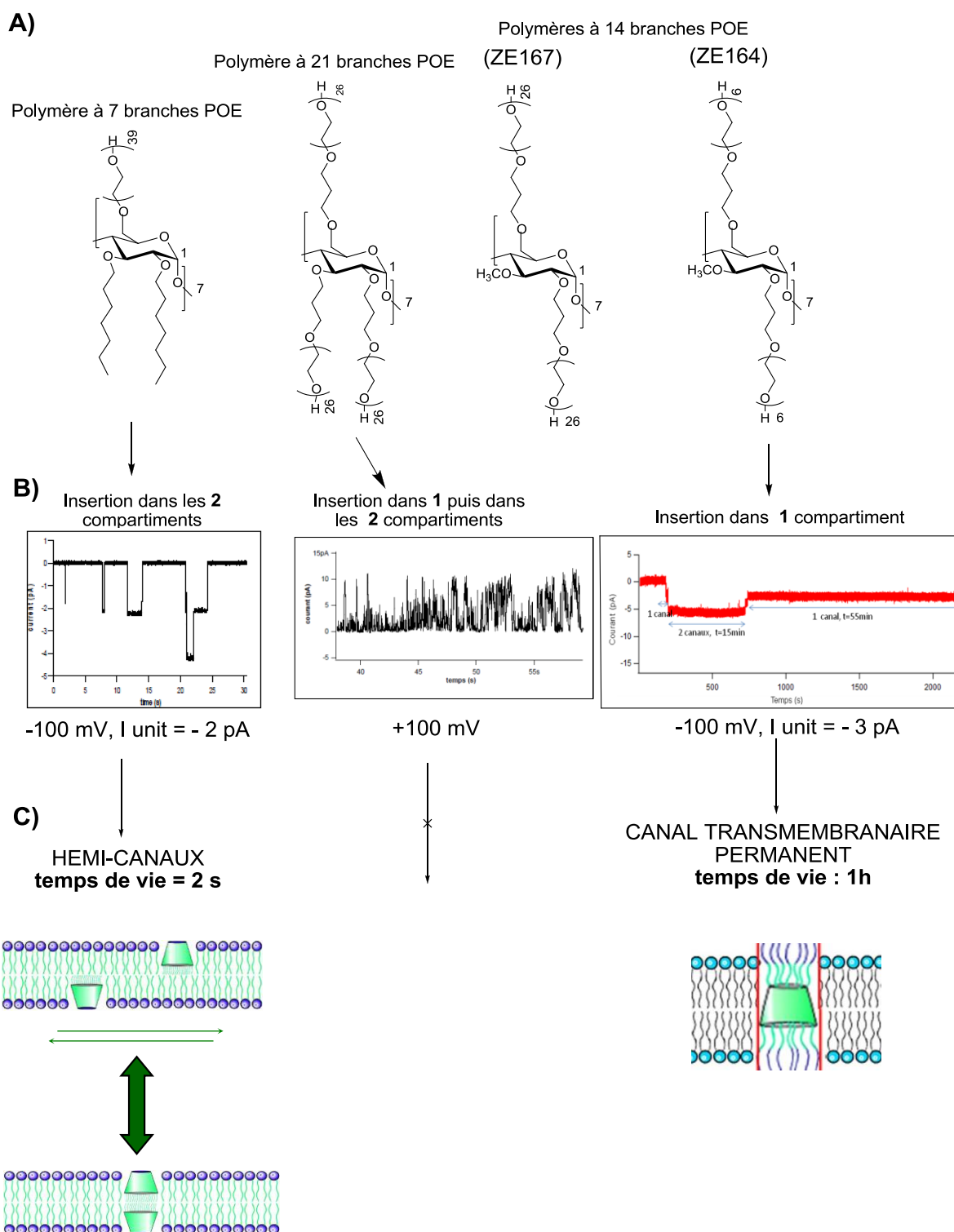


FIG. IV.12- A) Structure moléculaire, B) Analyses électrophysiologiques, C) Mécanismes de formation des canaux ioniques

Les polymères en étoile à 7 branches de POE de Badi et al.⁷, ajoutés dans les deux compartiments, ont montré des sauts de courants de -2 pA pour un canal unitaire. Des

hémi-canaux sont ainsi formés avec des temps d'ouverture très courts, de l'ordre de la seconde.

En comparant les polymères en étoile à 21 branches POE et à longues chaînes POE ($n(\text{OE})=26$) de Badi aux polymères en étoile ZE167 à 14 branches de POE ($n=26$), nous pouvons étudier l'influence du nombre de branches de POE. Celui-ci semble négligeable puisque, dans les deux cas, les études électrophysiologiques n'ont montré aucune trace d'insertion de canaux. Ainsi, le nombre de branches qui composent le polymère en étoile, ne semble pas être lié à son activité, contrairement à la longueur des chaînes POE, que nous avons vu dans le paragraphe précédent. En effet, comme nous l'avons étudié précédemment le polymère ZE164 à 14 branches POE et $n(\text{OE})=6$ a permis de former des canaux permanents avec des temps d'ouverture de l'ordre de l'heure. La question de l'utilité d'avoir une structure plus symétrique à 14 branches est à l'ordre du jour. La synthèse d'une molécule à base de CD avec 21 branches plus courtes ($n=6$) et l'étude de son insertion dans les membranes répondraient à cette question.

Par ailleurs, notons que dans le cas des hémi-canaux, les macromolécules à 7 branches de POE ont été insérés dans les deux compartiments et des pores se forment environ 30 min après leur incorporation, tandis que dans notre cas, la formation de canaux permanents se fait de manière très rapide juste après l'insertion du polymère en étoile dans un seul compartiment, caractérisant ainsi un canal transmembranaire.

IV.8. Conclusion et perspectives

Dans cette partie, nous avons montré l'insertion de polymères en étoile de structure bien définie, à l'image des canaux permanents. En effet, nous avons observé l'importance du rôle des chaînes de poly(oxyde d'éthylène) amphiphiles et hydrosolubles, ainsi que l'influence de leur taille dans la capacité des macromolécules à s'insérer dans les bicouches lipidiques. Ainsi, un polymère en étoile à cœur cyclodextrine et à branches poly(oxyde d'éthylène) de taille proche de celle de la bicouche lipidique a montré une propension à s'insérer dans les membranes sous forme de canaux permanents à l'échelle unique ou sous forme de pores multiples en fonction de la concentration en cyclodextrines.

Cependant, une étude systématique complémentaire en faisant varier la concentration en polymère est nécessaire pour prouver l'effet de la concentration sur le type de canaux formés et pour avoir une idée du mécanisme de formation du pore. En effet, la relation entre probabilité d'ouverture de pores et concentration nous donnerait une certitude sur l'obtention de canal transmembranaire.

Pour les exemples de canaux permanents cités, les diamètres apparents déterminés sont de l'ordre de 1,4Å, ce qui est inférieur au diamètre de la cyclodextrine. Cet écart proviendrait de la formule utilisée pour les calculs, non adaptée aux CDs, différentes hypothèses étant émises.

Cependant, nous avons atteint l'objectif initial de cette thèse qui était de former des canaux permanents artificiels, à l'échelle unique. En effet, nous avons observé des durées de vie allant de plusieurs minutes à 1 heure, ce qui laisse envisager la possibilité de faire passer des molécules à travers le pore formé (translocation), comme dans le cas des l' α -hémolysine.

Le diamètre de la β -CD laisse envisager le passage de POE ou de dextran. Des essais avec du POE 1 kDa, 2 kDa, 4 kDa et 10 kDa n'ont montré aucun résultat concluant. Néanmoins, dans le cas du dextran sulfate, nous avons obtenu des résultats encourageants. Le protocole de cette expérience a consisté à introduire le polymère ZE164 dans un seul compartiment en présence de dextran 8kDa à 6% dans une solution de KCl 1M. La trace ainsi obtenue à +100 mV est reportée sur la figure IV-12.

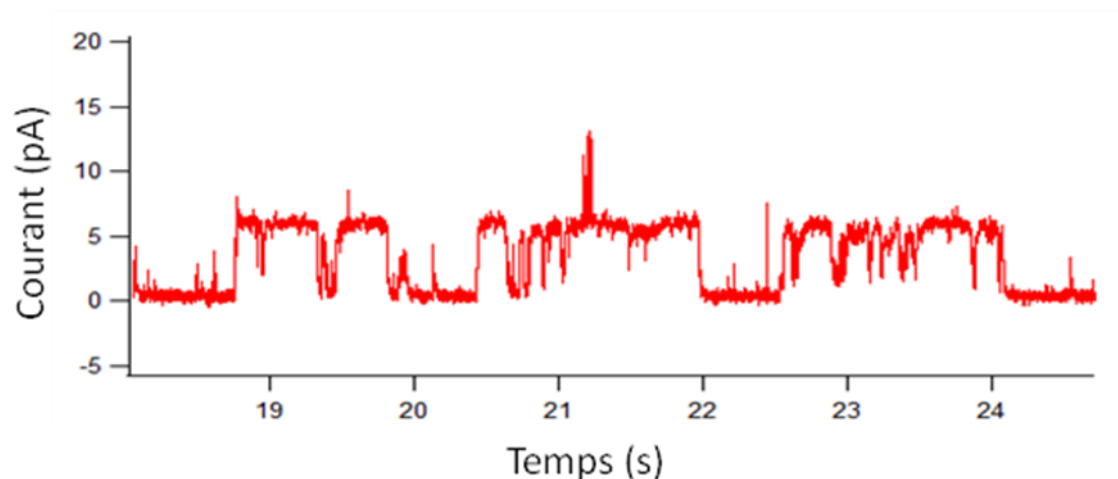


FIG.IV.12- Trace obtenue pour une tension appliquée de +100 mV et pour une concentration en ZE164 de 0,2 μ M, en présence de dextran sulfate

Nous pouvons observer sur la trace de la figure IV-12 des sauts de courants de +6 pA, que l'on peut attribuer à l'ouverture de deux canaux simultanément au vu des résultats obtenus précédemment. Cependant, le passage du dextran sulfate ne peut pas être mis en évidence de manière certaine, étant donné que les fréquences d'échantillonnage et de filtre n'étaient pas adaptées pour détecter ces passages. Une expérience va être réalisée dans de meilleures conditions pour s'assurer du passage de macromolécules, dextran ou ADN, à travers ces pores.

Références bibliographiques du chapitre IV

1. Badi, N. ; Polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène amorcée par des cyclodextrines modifiées : application à l'étude des canaux artificiels, *Thèse de doctorat de l'université d'Evry-Val-d'Essonne* **2006**.
2. Matile, S.; Sakai, N.; The characterization of Synthetic Ion Channels and Pores, *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, **2007**, 391-416.
3. Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, L. K.; Artificial transmembrane ion channels from self-assembling peptide nanotube, *Nature* **1994**, 369, 301–304.
4. Vial, F.; Oukhaled, A.G.; Auvray, L.; Tribet, L.; Long-living channels of well defined radius opened in lipid bilayers by polydisperse, hydrophobically-modified polyacrylic acids, *Soft Matter* **2007**, 3, 75-78.
5. Huin, C.; Le Gall, T.; Barteau, B. ; Pitard, B. ; Montier, T. ; Lehn, P. ; Chéradame, H. ; Guégan, P. ; Direct evidence of DNA transfer across a model membrane by neutral amphiphilic block copolymer, *Physical Chemistry Chemical Physics*, soumis.
6. Hille, B.; Ion channels of excitable membranes, *Third edition Sinauer* **2001**.
7. Badi, N.; Auvray, L.; guégan, P.; Synthesis of Half-Channels by the Anionic Polymerization of Ethylene Oxide Initiated by Modified Cyclodextrin, *Advanced Materials* **2009**, 21, 40, 4054-4057.
8. Bacri, L.; Benkhaled, A.; Guégan, P.; Auvray, L.; *Langmuir* **2005**, 21, 5842.
9. Parsegian, A.; *Nature* **1969**, 221, 844.
10. Neumcke, B.; Läuger, P.; *Biophys. J.* **1969**, 9, 1160.
11. Jordan, P.C., *Biophys. Chem.* **1981**, 13, 203.

Conclusions et perspectives

Afin de mieux comprendre le fonctionnement des canaux ioniques naturels, indispensables au bon fonctionnement des organismes vivants, des analogues artificiels ont été synthétisés. Depuis une trentaine d'années, de nombreux progrès ont été réalisés dans la réalisation de canaux ioniques artificiels présentant un large panel d'architecture. Dans ce contexte, nous avons choisi la cyclodextrine constituée d'une cavité et de nombreuses fonctions hydroxyle chimiquement modifiables, permettant d'accéder à différentes structures pouvant avoir un intérêt dans des applications de canaux ioniques. L'objectif de ce travail était d'obtenir des canaux ioniques permanents.

Pour cela, dans une première étape, nous avons procédé à des modifications sélectives des cyclodextrines, afin d'obtenir en position 3 un groupement méthyl et en positions 2 et 6 des fonctions hydroxyle de réactivité équivalente, des groupements hydroxypropyl dans ce travail, ces fonctions étant réparties de part et d'autre du cône tronqué de la cyclodextrine. Cette molécule a été obtenue en 3 étapes avec une pureté très intéressante, la mise au point de cette molécule ayant nécessité de nombreuses optimisations.

Dans notre approche, ces dérivés de cyclodextrines ainsi obtenus ont servi de macro-amorceurs de la polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène. Cette polymérisation a nécessité de nombreuses mises au point, aboutissant à l'obtention de différentes β -cyclodextrines à 14 branches de POE de différentes longueurs. Ces réactions ont révélé un nombre de centres actifs constant au cours du temps et des distributions de masses molaires moyennes étroites, ce qui montre un contrôle de la polymérisation anionique. La pureté des polymères est démontrée et la spectroscopie par RMN DOSY a confirmé le fait que les branches de POE étaient accrochées sur les amorceurs de cyclodextrine.

Ces différentes β -cyclodextrines amphiphiles hydrosolubles à 14 branches de POE, possédant différentes longueurs, ont été testées par électrophysiologie. Les résultats ont montré l'importance de la taille des chaînes POE, qui doit être en adéquation avec celle de la bicouche lipidique. Les polymères en étoile de faible masse molaire, et de structure bien précise, ont montré une propension à s'insérer dans les bicouches lipidiques à l'image des canaux permanents, c'est-à-dire avec des temps de résidence longs, de près de 1h pour un canal à l'échelle unique.

L'objectif de la thèse est donc rempli, des canaux ioniques permanents ayant été obtenus, avec des résultats encourageants et évidemment de nouvelles interrogations sur ces systèmes.

La question du mécanisme de formation du canal est en cours d'étude, afin de s'assurer de l'obtention d'un canal unimoléculaire transmembranaire, en déterminant la probabilité d'ouverture du pore en fonction de la concentration.

L'importance de la longueur des branches de POE sur la β -cyclodextrine a été démontrée, mais la question de l'utilité de la modification sélective en positions 2 et 6, afin d'obtenir 14 branches sur la β -cyclodextrine, est posée. En effet, une molécule à 21 branches de POE, mais courtes, pourrait éventuellement permettre l'obtention de canaux ioniques transmembranaires.

Des études relatives à la sélectivité ionique de ces canaux peuvent être également envisagées.

Réaliser cette bibliothèque de molécules pour établir une relation structure / propriétés, structure / activité présente un intérêt très important dans le domaine des canaux ioniques et ouvre la voie sur différentes applications potentielles : étude de la translocation de molécules et macromolécules à travers un canal permanent, étude de leur action sur des membranes de bicouches lipidiques de cellules érythrocytaires (bactériologie), possibilité de modifier ces nanopores pour les rendre actifs...

Chapitre V : Techniques expérimentales

V.1. Modifications des cyclodextrines

V.1.1. Caractéristiques et purification des produits utilisés

Les tableaux V-1 et V-2 récapitulent respectivement les caractéristiques des solvants et des réactifs utilisés lors des différentes étapes de modification des cyclodextrines. Par ailleurs, tous les produits sont préalablement purifiés et séchés avant toute utilisation.

Solvants (pureté)	Provenance	Densité à 20°C	Température d'ébullition (°C)
Acétate d'éthyle	SDS	0,903	77
Chloroforme	SDS	1,492	61
Dichlorométhane	SDS	1,33	39/40
DMF (99,9%)	SDS	0,95	153
Ethanol	Carlo Erba	0,79	78,5
Ether de pétrole	SDS	0,65	40-65
Ether éthylique	SDS	0,713	34/35
Méthanol	SDS	0,791	64,7
Pentane (95%)	SDS	0,62	35/37
THF (99,9%)	SDS	0,8893	65/66

Tableau V-1 : Caractéristiques des solvants utilisés lors des modifications des cyclodextrines

Le THF est séché sur un mélange sodium/benzophénone puis distillé sous azote.

La DMF est sur hydruure de calcium puis distillée par paroi froide sous vide avant utilisation.

Le méthanol, l'éthanol, l'éther diéthylique, l'éther de pétrole, le chloroforme et le dichlorométhane sont utilisés tels quels.

Réactifs	Provenance	Densité à 25°C	Température d'ébullition en °C
α , β , γ cyclodextrines	Wacker	-	-
9-BBN (1M dans THF)	Aldrich	0,894	-
NaOH (30%)	Prolabo	1,33	6
H ₂ O ₂ (35%)	Aldrich	1,11	-
Bromure d'allyle	Aldrich	1,398	70/71
Iodométhane	Aldrich	2,28	41-43
NaH (60%) dans l'huile	Fluka	-	-
Oxyde de baryum	Aldrich	5,7	-
Hydroxyde de baryum	Aldrich	-	-
Gel de silice 60F (35-70 μ m)	Carlo Erba	-	-
Plaques CCM	Merck	-	-

Tableau V-2 : Caractéristiques des réactifs utilisés lors des modifications des cyclodextrines

Les cyclodextrines sont tout d'abord recristallisés dans l'eau chaude, puis séchées une journée dans une étuve à vide à 80°C.

Le 9-BBN, l'hydroxyde de sodium, l'eau oxygénée sont utilisés tels quels.

Le bromure d'allyle et l'iodométhane sont distillés sous azote avant utilisation.

L'hydroxyde de sodium qui est conditionné dans l'huile, est lavé trois fois à l'aide de pentane, sous atmosphère inerte d'azote.

V.1.2. Synthèse des per(2,6-di-*O*-allyl)- α,β,γ -CDs

Dans un tricol de 250 mL, équipé d'un réfrigérant, 15g de BaO (95,9mmol, 2,6 equiv. OH₂ et OH₆) sont dissous dans 150mL de DMF/DMSO (1 :1). A ce mélange, sont additionnés, dans l'ordre, 15g de Ba(OH₂).8H₂O (47,97mmol, 1,3 equiv. OH₂ et OH₆) et

15mL de bromure d'allyle (250,9mmol, 6,8 equiv. OH₂ et OH₆). Après quelques minutes d'agitation sous atmosphère inerte, 3g de beta CD native (36,9mmol de fonction OH₂ et OH₆) est ajoutée par petite quantité et la synthèse est menée durant 5jours à l'abri de la lumière, sous atmosphère inerte.

Après ce laps de temps, une solution de NH₄OH (32%) est ajoutée et le milieu réactionnel est laissé sous agitation durant 30min, avant d'être dissous dans du chloroforme. Les matériaux inorganiques sont ensuite précipités par ajout de pentane et éliminés par filtration sur fritté. Le filtrat, contenant le produit, est lavé à l'eau afin de s'affranchir de la DMF. Après évaporation de la phase organique et séchage à la rampe à vide, un produit brut huileux de couleur jaune est obtenu. Ce dernier est purifié sur une première colonne chromatographique (SiO₂ (70% CHCl₃/ EtOAc), éluant (60% CHCl₃/ EtOAc), CCM Aluminium Silica Gel (60/40), révélation 5% H₂SO₄ / EtOH, R_f : 0,39). Une recristallisation est ensuite effectuée dans du méthanol. Le composé **1** est ainsi obtenu sous la forme d'une poudre blanchâtre. Sa structure est déterminée par RMN (¹H, ¹³C, 2D homo et hétéronucléaire) et par spectrométrie de masse (ionisation électrospray).

Per(2,6-di-*O*-allyl)-β-cyclodextrine

Rendement : 1,1 g (25%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 5.80-5.98 (14 C=CHCO, m), 5.10-5.35 (m, 28 C=CH₂), 4.96 (d, 7H₁), 4.85 (s, 7OH₃), 3.95-4.39 (m, 28 C=CCH₂O), 3.44-3.82 (m, 7H₅, 7H₃, 7H₆), 3.34-3.44 (m, 7H₄, 7H₂); ¹³C NMR (75MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 68.50 (C₆), 69.87 (C₅), 71.13, 72.48 (OCH₂), 72.71 (C₃), 79.20 (C₂), 82.81 (C₄), 100.60 (C₁), 116.60, 117.86 (C=CH₂), 134.51, 135.62 (C=CHCO); ESI-MS (m/z) 870.7 (M + 2Na)²⁺, 1719.0 (M + Na)⁺.

Per(2,6-di-*O*-allyl)-α-cyclodextrine

Rendement : 1.8g (40%), ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 5.81-5.96 (14 C=CHCO, m), 5.11-5.34 (m, 28 C=CH₂), 4.95 (d, 7H₁), 4.56 (s, 7OH₃), 3.30-4.35 (m, 28 C=CCH₂O, 7H₅, 7H₃, 7H₆, 7H₄, 7H₂); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ (ppm) 68.82 (C₆), 70.40 (C₅), 73.68 (C₃), 72.65, 73.24 (OCH₂), 78.65 (C₂), 83.52 (C₄), 101.50 (C₁), 117.37, 118.75 (C=CH₂), 134.23, 134.85 (C=CHCO); ESI-MS: m/z 749.5 (M + 2Na)²⁺, 1476.4 (M + Na)⁺.

Per(2,6-di-*O*-allyl)- γ -cyclodextrine

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 5.78-5.96 (14 C=CHCO, m), 5.08-5.33 (m, 28 C=CH₂, 7H₁), 4.84 (s, 7OH₃), 3.29-4.32 (28 C=CCH₂O, 7H₅, 7H₃, 7H₆, 7H₄, 7H₂); RMN ^{13}C (75MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 68.61 (C₆), 69.78 (C₅), 71.16, 72.09 (OCH₂), 72.09 (C₃), 79.33 (C₂), 82.22 (C₄), 98.92 (C₁), 115.99, 117.53 (C=CH₂), 134.81, 135.19 (C=CHCO); ESI-MS m/z 1008.4 (M + 2K)²⁺.

V.1.3. Synthèse des per(2,6-di-*O*-allyl-3-*O*-méthyl)- β -CDs

Dans un tricol de 100mL, surmonté d'un réfrigérant, 0,4g (10,1 mmol, 5 équiv. OH₃) d'hydruure de sodium (enrobé à 60% m/m dans de l'huile) sont introduits. Le produit, placé sous atmosphère inerte, est lavé trois fois avec de l'éther de pétrole pour enlever l'enrobage puis séché avec un courant d'azote. L'hydruure de sodium est alors mis en suspension dans 8mL de DMF anhydre sous atmosphère inerte. 0,5g du composé **1** (2,03 mmol de fonction OH₃), préalablement séchés à l'étuve à vide est alors ajouté et la réaction de réduction est menée durant 2h30. Le milieu réactionnel est ensuite refroidi dans un bain à 0°C afin d'introduire l'iodure de méthyle (0,31mL, 5,07 mmol, 2,5 équiv. OH₃). Lorsque l'addition est terminée, la réaction est maintenue sous agitation pendant 64h à température ambiante.

Afin d'arrêter l'expérience et désactiver l'hydruure de sodium qui n'aurait pas réagi, un excès d'eau est ajouté au mélange, jusqu'à ce que le dégazage cesse. Le mélange est ensuite dissous dans du chloroforme et lavé avec 100mL d'eau. Les phases organiques rassemblées sont séchées sur MgSO₄ et filtrés sur célite. Le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif (30°C) pour donner un résidu huileux de couleur jaune, séchée à l'étuve à vide à 80°C. Le composé **2** est ainsi obtenu avec un rendement de 96%. L'analyse du produit se fait par RMN et par spectrométrie de masse

Rendement (1g, 96%); RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 5.80-5.98 (14 C=CHCO, m), 5.07-5.35 (m, 28 C=CH₂, 7H₁), 3.92-4.20 (m, 28 C=CCH₂O, 7H₆, 7H₅, 7OH₃, 7H₃, 7H₄, 7H₂); RMN ^{13}C (75MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 60.69 (CH₃), 68.87 (C₅), 70.50 (C₆), 70.67, 71.17 (OCH₂), 78.80-78.99 (C₃, C₂), 81.66 (C₄), 97.88 (C₁), 115.82-115.92 (C=CH₂), 137.20-137.54 (C=CHCO); ESI-MS m/z 908.3 (M + Na + H)²⁺.

V.1.4. Synthèse des per(2,6-di-O-hydroxypropyl-3-O-méthyl)- β -CDs

Sous atmosphère inerte d'azote, dans un tricol de 100mL, équipé d'un réfrigérant, 228mg de composé **2** dans 9mL de THF anhydre sont dissous. Le milieu réactionnel est mis dans un bain de glace à 0°C, afin d'ajouter le 9-BBN. Après 48h de réaction, l'hydroxyde de sodium et l'eau oxygénée sont introduites et la réaction est menée à 80°C durant 3 jours.

Après ce laps de temps, le THF est évaporé et le produit est précipité dans du diéthyl éther. Afin d'éliminer le cycloocatanediol formé lors de la synthèse, le produit est mis à reflux dans du diéthyl éther pendant 2 jours à 40°C puis est filtré et séché à la rampe à vide. Le produit obtenu est dissout dans de l'éthanol absolu afin d'éliminer l'hydroxyde de bore (B(OH)₃) formé également durant cette synthèse. Ce dernier produit précipite dans l'éthanol. Enfin, après filtration, le filtrat est évaporé et le produit final est obtenu sous forme d'une poudre jaune pâle. Sa structure est déterminée par RMN et spectrométrie de masse.

Rendement (0,7g, 65%) ; RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 5.07 (d, 7H₁), 4.31 (d, 14OH), 3.13-3.82 (m, 7H₅, 7H₆, 7OCH₃, 7CH₂O, 7CH₂CCO, 7H₃, 7H₄, 7H₂), 1.63-1.71 (CH₂CO); RMN ¹³C (75MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 32.75, 33.21 (CH₂CO), 57.94, 58.04 (CH₂CCO)), 60.84 (OCH₃), 67.48, 67.80 (CH₂O), 69.10 (C₆), 70.67 (C₅), 78.49 (C₃), 79.97 (C₂), 81.77 (C₄), 97.62 (C₁); ESI-MS m/z 705.2 (M + 3Na)³⁺, 1046.1 (M + 2Na)²⁺.

V.2. Polymérisation anionique des oxiranes

En polymérisation un grand soin doit être apporté aux séchages des réactifs et des solvants. La présence d'impuretés dans le système peut soit inhiber les réactions, soit former des réactions secondaires indésirables.

V.2.1. Lavage et séchage du matériel

Tout le matériel utilisé (réacteur, burettes etc.) est au préalable déposé dans un four à 480°C pendant 2h, puis il est lavé à l'acide, rincé à l'eau distillée, à l'acétone et au

dichlorométhane. Il est par la suite entreposé dans une étuve à 100°C. Une fois le montage préparé, le système est connecté à une rampe à vide puis il est flammé.

V.2.2. Préparation de l'agent de déprotonation

V.2.2.1. Caractéristiques et séchage des produits utilisés

Les caractéristiques des différents produits utilisés lors de la synthèse du diphenylméthyl potassium sont données dans le tableau suivant (tableau V-3) .

Produits (pureté)	Provenance	Densité à 25°C	Température d'ébullition en °C
Diphenylméthane	Aldrich	1,006	264
Potassium (98%)	Aldrich	-	-
Naphtalène	Aldrich	-	-
Acétanilide	Aldrich	-	-
DMSO	SDS	1,013	168
THF	SDS	0,889	65/66

Tableau V-3 : Caractéristiques des produits utilisés lors de la synthèse et du dosage du DPMK

Le diphenylméthane est séché sur de l'hydruure de calcium puis est distillé sous vide secondaire dans une burette flammée.

Le potassium est lavés en boîte à gants avec du pentane sec.

Le naphtalène est purifié par recristallisation dans de l'éther.

Le THF est séché sur un mélange sodium/benzophénone. Le système est mis à chauffer à reflux sous azote ou argon jusqu'à apparition d'une coloration bleue nuit persistante. La quantité de THF souhaitée est ensuite distillée directement dans une burette préalablement flammée sous vide ou dans la burette contenant l'amorceur sec.

Le DMO est séché sur de l'hydruure de calcium dans des réacteurs connectés à une rampe à vide secondaire. Les mélanges sont dégazés cinq fois avant que les solvants ne soient distillés sous vide dans des burettes flammées.

V.2.2.2. Synthèse du diphényl méthyl potassium

Dans deux burettes préalablement tarées, sont distillés le diphénylméthane (DPM) (0,05 mol) et le THF sec (110 mL). En boîte à gants, le naphthalène (0,025 mol, 0,5équiv. DPM)₁ est ajouté au diphénylméthane. Toujours en boîte à gants, le potassium (0,05 mol) qui est lavé avec du pentane sec est introduit dans un ballon muni d'un robinet Rotaflo (préalablement flammé). Une première partie du THF (environ 80 mL) est alors ajoutée au potassium, suivie du mélange DPM/naphthalène. La burette contenant ce dernier mélange est rincée avec la quantité restante de THF (30 mL). La solution prend alors une couleur bleue, qui après quelques minutes vire au vert, puis au rouge brique et restera ainsi. Le DPMK est alors formé et devra donc être filtré (figure V-1) et dosé afin de déterminer sa concentration. La concentration de DPMK attendue est de $4,5.10^{-4} \text{ mol.ml}^{-1}$.

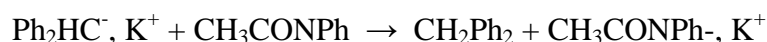


FIG. V.1 - Montage de filtration du DPMK

V.2.2.3. Dosage du DPMK

En boîte à gants, on introduit dans un ballon dégazé à la flamme, en milieu DMSO anhydre, une quantité m connue d'acétanilide (de masse molaire 135 g.mol^{-1}). Un volume V de DPMK est ajouté progressivement jusqu' à observer une coloration orange du milieu.

La réaction mise en jeu forme un nitranion incolore suivant la réaction :



La coloration qui apparaît est alors signe que la quantité stoechiométrique de DPMK a été dépassée. Nous pouvons alors déterminer la concentration en carbanion selon l'équation :

$$[\text{Ph}_2\text{HC}^-, \text{K}^+] = \frac{m}{135V}$$

V.2.3. Réactions de polymérisation anionique des oxiranes

V.2.3.1. Caractéristiques et séchage des produits

Les caractéristiques des différents produits sont données dans le tableau V-4.

Produits (pureté)	Provenance	Densité à 20°C	Température d'ébullition (°C)
Oxyde d'éthylène	Aldrich	0,882	10,7
Oxyde de propylène (99,5%)	Fluka	0,829	34-35
Alcool allylique	Aldrich	0,854	96-98
DMF	SDS	1,33	39/40
Heptane anhydre	SDS	0,95	153
Benzène (99%)	Carlo Erba	0,79	78,5

Tableau V-4 : Caractéristiques des réactifs utilisés lors des modifications des cyclodextrines

L'oxyde d'éthylène est tout d'abord laissé toute une nuit sous agitation sur des copeaux de sodium. Ensuite, il est distillé successivement sur deux films de sodium, jusqu'à persistance d'une coloration rose du sodium. Une fois séché, l'oxyde d'éthylène est distillé dans une burette flammée.

L'oxyde de propylène est séché durant 48h minimum sur CaH_2 , puis deux fois sur dibutylmagnésium.

L'alcool allylique est mis à sécher sur du tamis moléculaire 4Å avant d'être distillé sous vide.

La DMF et l'heptane sont séchés sur de l'hydruure de calcium dans des réacteurs connectés à une rampe à vide secondaire. Les mélanges sont dégazés cinq fois avant que les solvants ne soient distillés sous vide dans les burettes flammées.

Le benzène est séché sur un mélange sodium/benzophénone.

La méthode de séchage des cyclodextrines a été plus difficile à mettre au point. Les premiers essais non concluants ont été les causes directes des échecs rencontrés lors des premières réactions de polymérisation. Les dérivés de CDs sont d'abord introduits dans des burettes préalablement tarées et séchés par distillation azéotropique dans de l'heptane, celui-ci formant en effet un azéotrope avec l'eau à 79°C. Après séchage sur de l'heptane, d'autres étapes de séchage vont être menées :

Dans la burette contenant la CD modifiée va être ajoutée une petite quantité de benzène (3mL) (préalablement séché). Les molécules de benzène forment des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines et prennent ainsi la place des molécules d'eau présentes dans la cavité. La burette est ensuite séchée sur une rampe à vide secondaire.

V.2.3.2. Montage de la polymérisation anionique

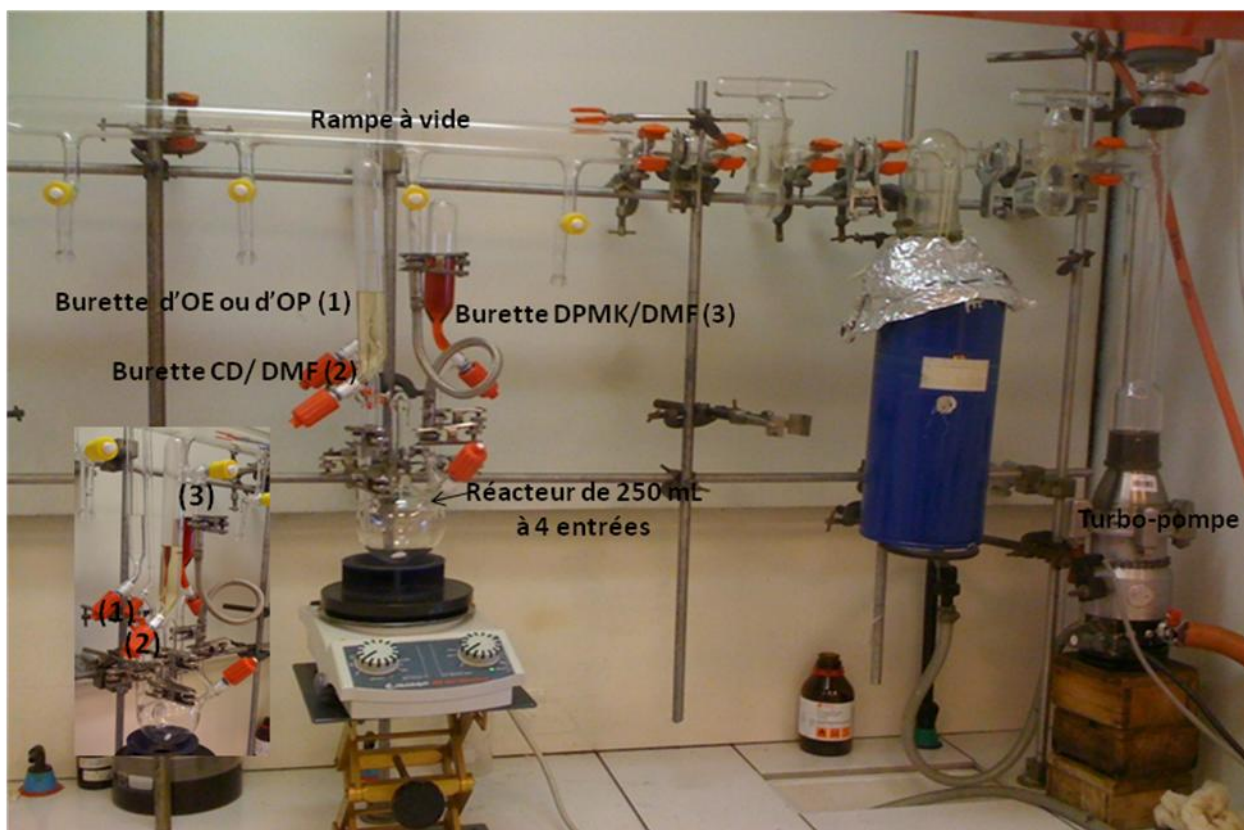


FIG. V.2 - Schéma du montage de la polymérisation anionique des oxiranes

V.2.3.3. Détails du protocole expérimental de polymérisation

Tout d'abord, la burette (1) d'oxyde d'éthylène munie d'un robinet Rotaflo est tarée et flammée sous vide avant la cryodistillation de la quantité voulue d'oxyde d'éthylène, préalablement séché comme décrit dans le paragraphe consacré au séchage des réactifs. Par ailleurs, dans la burette (2) contenant l'amorceur séché (alcool allylique ou CD modifiée), préalablement tarée, est introduit un volume connu de DMF sec. Enfin, une autre burette (3) contenant le reste de solvant est introduite dans la boîte à gants où est ajoutée la quantité de catalyseur (DPMK filtré). Cette burette est ensuite congelée à l'azote liquide afin de la mettre à nouveau sous vide.

Les trois burettes sont alors connectées à un réacteur à 4 entrées, dont une munie d'un robinet Rotaflo permettant de faire le vide comme indiqué sur le schéma précédent (figure V-2). Le réacteur est alors flammé sous vide secondaire. Après une heure de séchage sous vide, le robinet Rotaflo du réacteur est alors fermé, afin d'introduire dans

le réacteur, l'amorceur dissous dans le solvant suivie du catalyseur. Le système est laissé sous agitation à température ambiante pendant 2h à 48h selon l'amorceur. Après ce laps de temps, le réacteur est plongé dans un bain thermo-régulé à 0°C afin d'ouvrir la burette d'oxyde d'éthylène et permettre une introduction de ce monomère dans la solution d'amorceur et de solvant. Enfin, le système est chauffé à 40°C et la réaction est menée durant le temps souhaité allant de 5 jours à 35 jours selon l'expérience.

La réaction de polymérisation est arrêtée par addition d'une solution de méthanol acidifiée. Après évaporation des solvants, le polymère obtenu est purifié par sonication dans de l'éther à 60°C. La solution est filtrée et la partie insoluble est ensuite solubilisé dans du dichlorométhane afin d'éliminer les sels éventuellement formés lors de la réaction de polymérisation. Enfin, après évaporation du dichlorométhane et séchage dans une étuve à vide à 80°C, le POE en étoile est obtenu. Sa structure et sa masse molaire sont déterminées par SEC, RMN (^1H et ^{13}C) ainsi que par spectrométrie de masse (ESI-MS) dans certains cas.

V.3. Expériences d'électrophysiologie

V.3.1. Généralités

Par définition, l'électrophysiologie est une technique qui permet d'étudier les caractéristiques électrochimiques des organismes vivants. Comme les canaux ioniques, les canaux artificiels transmembranaires sont étudiés par électrophysiologie et plus précisément par patch-clamp. Cette méthode permet de mesurer les courants électriques au niveau d'une cellule, ou même d'un morceau de membrane, et jusqu'à un canal unitaire.

Le patch-clamp permet l'enregistrement des courants ioniques transitant à travers les membranes cellulaires. Cette technique fut découverte par Erwin Neher et Bert Sackman en 1976, ce qui leur valu le prix Nobel de Médecine et de Physiologie en 1991. Elle consiste à approcher une micropipette en verre remplie d'une solution ionique de composition définie d'une membrane puis à mesurer des fluctuations de courant inférieures au pico ampère.

Le patch-clamp peut être utilisé sous deux modes principaux

- le voltage-clamp ou mesure de courant en potentiel imposé

- le current-clamp ou mesure de potentiel en courant imposé

V.3.2. Dispositif de mesure

Le schéma du principe de l'expérience est représenté sur la figure V-3.

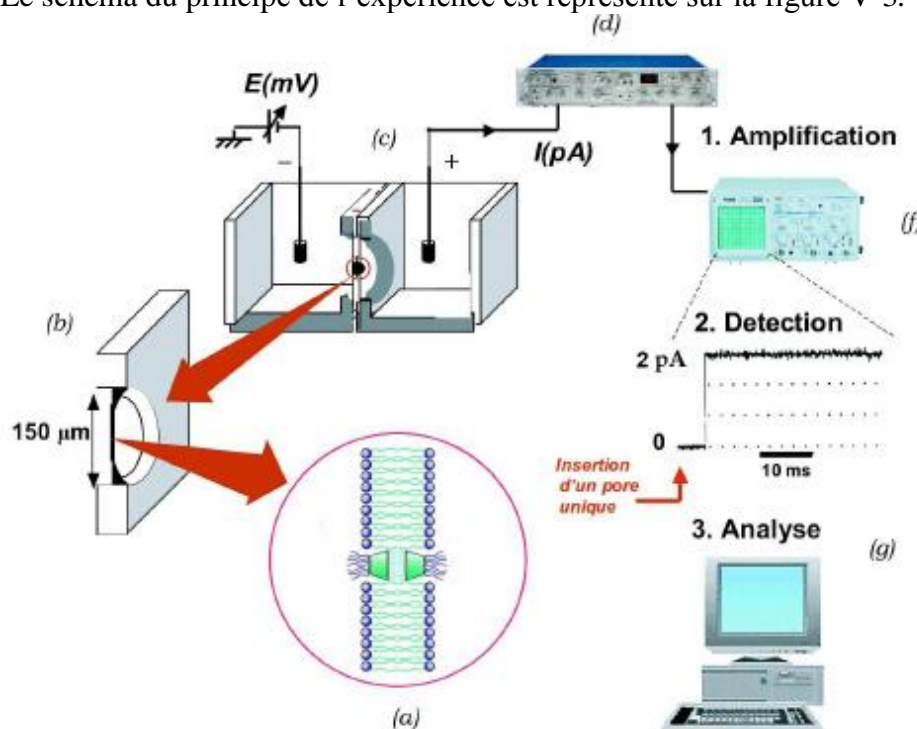


FIG. V.3 - Schéma du montage permettant d'effectuer les expériences d'électrophysiologie

La cellule de mesure (Warner Instruments) possède deux compartiments (c) d'une contenance d'environ 1,5mL séparés par une paroi percée d'un trou dont le diamètre est de 150µm (b). Une différence de potentiel est imposée entre les deux compartiments par l'intermédiaire de deux électrodes Ag/AgCl, chacune immergée dans un des compartiments (c). Les deux électrodes servent aussi à mesurer le courant circulant entre elles. Elles sont reliées comme le montre la figure V-3 (d) à une tête de mesure qui contient un convertisseur courant-potential et un préamplificateur (d). Le signal amplifié est envoyé à une chaîne d'acquisition (figure V-3 (f)) et comprenant un système amplificateur, un filtre passe bas, un convertisseur analogique-digital et un système d'enregistrement, de stockage et d'analyse sur ordinateur (g). La visualisation des spectres sur l'ordinateur est assurée par le logiciel « Igor ». En fonctionnement normal, la cellule de mesure est enfermée dans une petite cage de Faraday elle-même posée sur une table anti-vibration (sur coussins d'air). Une des parois extérieures de la cellule est

percée d'une fenêtre d'observation qui permet de contrôler le dépôt et la formation de la bicouche lipidique avec une lunette binoculaire (figure V-4).



FIG. V.4 - *Dispositif de mesure sur les bicouches : cellule de mesure, électrodes, tête de mesure, cage de Faraday (ouverte) et loupe binoculaire*

La nature du convertisseur courant-potentiel dépend de l'amplificateur utilisé. Nous utilisons deux amplificateurs différents, un amplificateur dit « de bicouches », commercialisé par la société Biologic (Grenoble) sous le nom de BLM-120 et un amplificateur dit « de patchclamp », commercialisé par la société Axon Instruments sous le nom d'Axopatch-200B. Dans le BLM-120 le convertisseur de courant est une résistance calibrée ($1\text{ G}\Omega$) aux bornes de laquelle on mesure le potentiel (1 pico-ampère correspond alors à 1 millivolt). Dans l'Axopatch, on intègre la tension aux bornes d'une capacité parcourue par le courant à mesurer si les courants sont faibles (avec en plus un dispositif adéquat de remise à zéro de la tension) ou on mesure la tension aux bornes d'une résistance si les courants sont forts.

V.3.3. Préparation des bicouches de lipides

La cuve sur laquelle se trouve le trou de $150\mu\text{m}$ est d'abord pré-traitée avec une toute petite quantité d'une solution de lipide dans le décane. Après séchage 30 minutes, la cuve est prête et peut être déposée dans l'emplacement qui lui est réservé.

Dans chaque compartiment de la cellule de mesure, sont déposés 1 mL d'une solution de KCl 1M. On dépose alors sur le trou de $150\mu\text{m}$, à la pipette ou éventuellement au

pinceau, une gouttelette de solution de lipides dans le décane. Après amincissement de la gouttelette sous l'action de la capillarité et des forces de Van der Waals, une bicouche de lipide se forme spontanément. Sa formation ainsi que son amincissement peuvent être observés directement sur l'ordinateur qui mesure en temps réel l'épaisseur de la membrane. Le phospholipide employé est le 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (diphytanoyl) en solution dans le décane à une concentration fixée à 1% en masse par volume (g/mL).

V.3.4. Préparation des solutions

Les dérivés de cyclodextrines sont prélevés et solubilisés dans de l'eau distillée à la concentration de 10 mg/mL.

La solution de lipides est préparée à une concentration de 1% en masse dans du décane. Le décane permet d'obtenir des membranes stables.

V.4. Techniques d'analyse

V.4.1. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

V.4.1.1. RMN ^1H

Les analyses RMN ^1H ont été enregistrées l'aide d'un spectromètre Bruker Avance 300 MHz.

V.4.1.2. RMN ^{13}C

Les spectres RMN ^{13}C sont réalisés à 75MHz.

V.4.1.3. Généralités sur les expériences de RMN

Les valeurs des déplacements chimiques (δ) sont exprimées en partie par million (ppm). Par ailleurs la calibration des spectres est réalisée en se basant sur le déplacement

chimique de chaque solvant deutéré. Le tableau V-5 répertorie tous les déplacements en proton résiduel et en carbone des solvants deutérés ayant servi aux analyses effectuées.

Solvants deutérés	δ_H	δ_C
DMSO-d6	2,5	39,9
CDCl ₃	7,27	77,7
D ₂ O	4,8	-

Tableau V-5 : Déplacements des protons et carbones des solvants deutérés utilisés

V.4.1.4. RMN DOSY

Les expériences RMN DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) ont été réalisées sur un spectromètre Avance 300 MHz Bruker dans le DMSO à 25°C. La calibration en température du spectromètre a été réalisée entre 298K et 313K à l'aide d'un échantillon 100% CH₃OH, la différence de déplacement chimique entre les deux pics du méthanol étant linéaire dans cette gamme de température. La force des gradients a été déterminée en utilisant un insert en plexiglass dont la taille a été mesurée avec précision (8mm \pm 0.01 de long, diamètre extérieur de l'insert égal au diamètre intérieur du tube RMN) ; l'insert est immergé dans un tube RMN contenant de l'eau H₂O très pure. La force des gradients a été déterminée en utilisant la séquence RMN calibgp et une valeur de 56.8 G/cm a ainsi été trouvée. Afin de vérifier la précision de la calibration en température et des gradients, une expérience DOSY a été réalisée sur un tube RMN contenant un mélange de H₂O/D₂O (10%/90% en moles) dont le coefficient de diffusion a été publié par Weingärtner and *al.* ($1.935 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Notre mesure de coefficient de diffusion sur ce tube a donné une valeur de $1.934 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Le parfait accord entre les deux valeurs a confirmé la précision des réglages du spectromètre RMN. Les expériences DOSY ont été réalisées en utilisant la séquence stegp1s avec 16 expériences et en faisant varier le pourcentage de gradient entre 5% et 95%. Avant chaque expérience, les temps de relaxation ont été mesurés puis les temps de gradient et de diffusion ont été optimisés.

V.4.2. Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC)

La chromatographie d'exclusion stérique a été réalisée sur des colonnes analytiques WATERS styragel types HR 4E.

La chaîne SEC WATERS comprend une pompe type HPLC 515, un injecteur standard, un détecteur U.V 2487, un réfractomètre 2410. L'injection des différents polymères est réalisée à partir d'une solution de produit dissous dans la DMF dont la concentration est égale à 3 mg/ml. Le calcul de la masse se fait à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide d'une gamme de masse d'échantillons de poly(oxyde d'éthylène) isomoléculaires.

Les chromatogrammes sont tracés à l'aide d'un logiciel Millennium version 3.2.

V.4.3. Spectrométrie de masse (ESI/MS)

L'appareil utilisé pour les mesures de spectrométrie de masse en ionisation électrospray est un spectromètre API2.

Résumé

Dans ce travail, nous présentons l'obtention de canaux permanents synthétiques, à base de cyclodextrines amphiphiles, en utilisant une méthode de polymérisation divergente d'oxiranes. Des modifications sélectives de cyclodextrines sont développées de manière à générer de nouveaux amorceurs de polymérisation anionique d'oxyde d'éthylène. Dans les conditions de synthèse utilisées, la démonstration du contrôle de la polymérisation est réalisée et l'obtention de molécules à 14 branches de POE, de longueur variable, est montrée. Parmi différentes applications envisageables, nous développons ici la possibilité d'utiliser ces molécules en étoile pour former des canaux ioniques permanents avec des temps de résidence de l'ordre de l'heure, ouvrant la voie par exemple à la translocation de molécules et de macromolécules.

Mots-clés :

Cyclodextrines amphiphiles, poly(oxyde d'éthylène) en étoile, canaux permanents artificiels.

Abstract

In this work, we present the design of artificial permanent cyclodextrin-based channels, obtained by divergent polymerization. Selective modifications of cyclodextrins have been developed to generate original initiators of ethylene oxide ring-opening polymerization. Considering the experimental conditions used, the demonstration of controlled polymerization was performed, leading to molecules with 14 PEO arms having various molar masses. Among various applications, we focused on the possibility to use this new class of star-polymer architectures as permanent ionic channels exhibiting long residence time (hour scale), paving the way to translocation of molecules and macromolecules for example.

Key words :

Amphiphilic cyclodextrins, Star-shaped poly(ethylene oxide), Artificial permanent channels.