

N° d'ordre : 2545

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ÉCOLE DOCTORALE DE SCIENCES CHIMIQUES

par **Sylvain CAILLOL**

Ingénieur ENSCM

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : **POLYMERES**

**SYNTHESE ET CARACTERISATION DE NOUVEAUX COPOLYMERES
POTENTIELLEMENT AUTOASSOCIATIFS**

Soutenue le : 8 octobre 2002

Après avis de :

MM.	E. DELLACHERIE – Professeur - ENSIC	Rapporteur
	M. VERT – Directeur de Recherche - CNRS	Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

MM.	Y. GNANOU	Directeur de Recherche - CNRS	Président
	E. DELLACHERIE	Professeur - ENSIC	Rapporteur
	M. VERT	Directeur de Recherche - CNRS	Rapporteur
	A-F. MINGOTAUD	Chargée de Recherche - CNRS	Examineur
	R. MEYRUEIX	Ingénieur – Flamel Technologies	Examineur
	A. SOUM	Professeur – ENSCPB	Examineur

Ce manuscrit s'accompagne dans sa version intégrale d'un document annexe confidentiel réservé à l'usage unique de la société Flamel Technologies et du LCPO. Ce document rassemble en effet les travaux de recherches menés sur la synthèse et la caractérisation de copolymères polylactide-poly(acide glutamique) aux architectures contrôlées et pouvant conduire à des systèmes particuliers cœur-écorce.

SI...

Si tu peux voir détruit l'ouvrage de ta vie
Et sans dire un seul mot te remettre à rebâtir,
Ou perdre d'un seul coup le gain de cent parties
Sans un geste et sans un soupir ;

Si tu peux être amant sans être fou d'amour,
Si tu peux être fort sans cesser d'être tendre
Et, te sentant haï, sans haïr à ton tour,
Pourtant lutter et te défendre ;

Si tu peux supporter d'entendre tes paroles
Travesties par des gueux pour exciter des sots,
Et d'entendre mentir sur toi leurs bouches folles
Sans mentir toi-même d'un seul mot ;

Si tu peux rester digne en étant populaire,
Si tu peux rester peuple en conseillant les rois
Et si tu peux aimer tous tes amis en frère
sans qu'aucun d'eux soit tout pour toi ;

Si tu sais méditer, observer et connaître
Sans jamais devenir sceptique ou destructeur ;
Rêver, mais sans laisser ton rêve être ton maître,
Penser sans n'être qu'un penseur;

Si tu peux être dur sans jamais être en rage,
Si tu peux être brave et jamais imprudent,
Si tu sais être bon, si tu sais être sage
Sans être moral ni pédant ;

Si tu peux rencontrer Triomphe après Défaite
Et recevoir ces deux menteurs d'un même front,
Si tu peux conserver ton courage et ta tête
Quand tous les autres les perdront,

Alors les Rois, les Dieux, la Chance et la Victoire
Seront à tout jamais tes esclaves soumis
Et, ce qui vaut mieux que les Rois et la Gloire,
Tu seras un homme, mon fils

R. Kipling

REMERCIEMENTS

Une thèse est à la fois un travail très personnel et un projet impliquant une équipe tout entière et dont la réalisation, comme tout projet, est soumise à de nombreuses contraintes.

J'ai été accueilli en novembre 1998 dans le Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Bordeaux par Monsieur Michel Fontanille qui dirigeait ce laboratoire. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour la confiance qu'il m'a accordée en me permettant de vivre cette expérience passionnante. Je tiens également à remercier très sincèrement Monsieur Yves Gnanou, nouveau directeur du LCPO, des excellentes conditions de travail qu'il m'a permis de trouver dans le LCPO.

Monsieur Alain Soum a dirigé mes recherches pendant ces années de thèse. Je lui adresse mes profonds et sincères remerciements. Merci de votre confiance dans mes travaux, et de l'autonomie que vous m'avez accordée.

Madame Anne-Françoise Mingotaud a suivi mes recherches tout au long de ma thèse. Elle a su me prodiguer conseils et encouragements pendant mes travaux et ce, jusqu'au moment de ma soutenance. Je souhaite lui adresser mes remerciements très sincères pour son aide si précieuse et pour sa présence.

Cette thèse s'est effectuée en collaboration avec la société Flamel Technologies de Vénissieux. Je tiens à ce titre à remercier son directeur, Monsieur Gérard Soula, pour m'avoir accueilli au sein de sa société. Je remercie également Monsieur Rémi Meyrueix pour sa contribution scientifique. Je tiens également à remercier très sincèrement Monsieur Nathan Bryson pour la pertinence de ses conseils scientifiques ainsi que pour son accueil au sein de son laboratoire.

Madame Edith Dellacherie, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy et Monsieur Michel Vert, Directeur de Recherches au CNRS ont accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Je leur adresse mes respectueux remerciements et tiens également à leur signifier ma gratitude pour leurs précieux commentaires.

Je tiens également à remercier très profondément Madame Michèle Schappacher qui a été une source intarissable de conseils, d'aide et de bonne humeur durant ces années de labo.

Cette expérience passionnante n'aurait peut-être pas été menée jusqu'au bout sans le soutien scientifique et/ou amical de tant d'autres.

Un merci collectif à toute l'équipe de permanents du LCPO et surtout Stéphane Carlotti, Daniel Taton, Sébastien Lecommandoux, Manu Ibarboure, Michel Schappacher, Eric Papon, Henri Cramail, Etienne Duguet de l'ICMCB, Nadine Richard, Nicole Buzat, Corinne Gonçalves et tous les autres...

Mais surtout à vous, parce que c'était vraiment bien quand vous étiez tous là...Tic, René, Claude le Président de La Fondation, Le Coach ce Gaillard, Le Canadien, Mokembe Laomo, La Cox, Sofaïe, Estelle, Céline, Alex, Nono the Jedi, El Mayor, Jean-Marc, Myriam, Demis Roussos, Abraham, Le Séb Gib, Sandaïe, Sir Francis from India, Séverine, Fred, Delphine, Radha, Bindu, Dona, - take care.

LISTE DES ABREVIATIONS

AED	Analyse enthalpique différentielle
Bz L-Glu	L-Glutamate de benzyle
CES	Chromatographie d'exclusion stérique
Conv.	Conversion
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
\overline{DP}_n	Degré de polymérisation en nombre
$I = \overline{M}_w / \overline{M}_n$	Indice de polymolécularité
IR	Infra rouge
D,L-LA	Lactide (mélange racémique 50/50)
L-LA	Lactide (100% d'isomère L)
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization - time of flight
\overline{M}_n	Masse molaire moyenne en nombre
\overline{M}_v	Masse molaire moyenne viscosimétrique
\overline{M}_w	Masse molaire moyenne en masse
NCA	N-carboxyanhydride
PBLG	Poly(L-glutamate de benzyle)
PGA	Poly(acide glutamique)
PLA	Poly(lactide)
PLGA	Poly(L-acide glutamique)
PLLA	Poly(L-lactide)
Poly(A-b-B)	Copolymère à blocs A-B
Poly(A-co-B)	Copolymère statistique A-B
Poly(A-g-B)	Copolymère greffé B greffé sur A
RMN ^1H	Résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ^{13}C	Résonance magnétique nucléaire du carbone
RMN ^{31}P	Résonance magnétique nucléaire du phosphore
ROP	Polymérisation par ouverture de cycle
T_f	Température de fusion
T_g	Température de transition vitreuse
THF	Tétrahydrofurane

SOMMAIRE

<i>INTRODUCTION GENERALE</i>	<i>1</i>
-------------------------------------	-----------------

Chapitre Bibliographique

<i>PREMIERE PARTIE : SYSTEMES A LIBERATION CONTROLEE</i>	<i>7</i>
I- L'insuline et le traitement du diabète	7
II- La libération contrôlée de médicaments	9
III- Les architectures pour la libération contrôlée	11
<i>DEUXIEME PARTIE : LE POLYLACTIDE</i>	<i>17</i>
I- Introduction	17
II- Synthèse du polylactide	18
III- Mécanismes de la polymérisation du lactide par ouverture de cycle	19
1° Mécanisme cationique de la polymérisation par ouverture de cycle du lactide	20
2° Mécanisme anionique de la polymérisation par ouverture de cycle du lactide	22
3° Mécanisme de polymérisation par coordination/insertion	23
<i>TROISIEME PARTIE : LE POLY(GLUTAMATE DE BENZYLE)</i>	<i>30</i>
I- Introduction	30
II- Synthèse de polypeptides	30
III- Mécanisme de polymérisation des N-CarboxyAnhydrides	31
1° Polymérisation amorcée par l'eau	32
2° Polymérisation amorcée par les amines primaires	33
3° Polymérisation amorcée par les amines secondaires	36
4° Polymérisation amorcée par les amines tertiaires	38
5° Polymérisation amorcée par d'autres types d'amorceurs	38
IV- Etude cinétique de la polymérisation du NCA de Glutamate de benzyle	40

Synthèse du Polylactide

<i>PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION</i>	<i>46</i>
<i>DEUXIEME PARTIE : SYNTHESE ET CARACTERISATION</i>	<i>47</i>
I- L'amorceur fonctionnalisé	47
II- Le polylactide fonctionnel	50
1° Synthèse du polylactide à fonction protégée	50
2° Déprotection des extrémités de chaîne et dosage du Zn résiduel	56
III- Polymérisation du L-lactide amorcée par un alcoolate de lanthane	58
<i>TROISIEME PARTIE : ETUDE CINETIQUE</i>	<i>61</i>
I- Rappels bibliographiques	61
1° Le lactate de Zn / Zn métal	61
2° Le zinc tétra-coordiné	63
3° Le diéthylzinc	66
4° Conclusion	66
II- Etude cinétique expérimentale de la polymérisation du L-lactide	66
1° Détermination de la concentration en monomère à l'équilibre	67
2° Détermination de l'ordre partiel en monomère	68

3°) Ordre partiel en amorceur _____	70
4°) Vitesse de polymérisation _____	71
III- Conclusion _____	72

Synthèse du Poly(glutamate de benzyle)

<u>PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION</u>	75
<u>DEUXIEME PARTIE : SYNTHESE ET CARACTERISATION DU</u>	
<u>POLYGLUTAMATE DE BENZYLE</u>	76
<u>TROISIEME PARTIE : SYNTHESE DU POLY(ACIDE GLUTAMIQUE)</u>	80

Synthèse de Copolymères Poly(lactide-co-glutamate de benzyle)

<u>PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION</u>	85
<u>DEUXIEME PARTIE : SYNTHESE DE COPOLYMERES A BLOCS</u>	86
I- Synthèse du copolymère poly(lactide-b-glutamate de benzyle) _____	86
II- Caractérisation des copolymères poly(lactide-b-glutamate de benzyle) _____	88
III- Déprotection et caractérisation du copolymère _____	90
IV Conclusion _____	92

Partie Expérimentale

<u>PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION</u>	94
<u>DEUXIEME PARTIE : CONDITIONS EXPERIMENTALES</u>	94
I- Purification des réactifs _____	94
1°) Diéthylzinc _____	94
2°) L-lactide _____	96
3°) NCA de L-glutamate de benzyle _____	101
II- Modes opératoires de synthèse _____	101
1°) Le terbutyl-N-(3-hydroxy)carbamate _____	101
2°) Le N-(terbutylcarbamate)propanolate de zinc _____	102
3°) Le N-carboxyanhydride de L-glutamate de benzyle _____	103
4°) Synthèse du polylactide amorcée par le N-(terbutylcarbamate)propanolate de zinc _____	105
5°) Synthèse du poly(glutamate de benzyle) _____	106
6°) Synthèse du poly(lactide-b-glutamate de benzyle) _____	106
7°) Déprotection de la fonction amine primaire du polylactide _____	107
8°) Clivage des fonctions ester de benzyle sur le PBLG _____	107
9°) Clivage des fonctions ester de benzyle sur le copolymère à blocs _____	108
III- Caractérisation des composés synthétisés _____	109
1°) Le polylactide amorcé par le N-(terbutylcarbamate)propanolate de zinc _____	109
2°) Le polylactide amorcé par La(OiPr) ₃ _____	110
3°) Le L-glutamate de benzyle _____	111
4°) Le poly(L-glutamate de benzyle) _____	112
5°) Le poly(acide glutamique) _____	112
6°) Le copolymère à blocs poly(lactide-b-glutamate de benzyle) _____	113

7°) Le copolymère à blocs poly(lactide-b-acide glutamique)	113
<i>TROISIEME PARTIE : TECHNIQUES EXPERIMENTALES / CHARACTERISATION</i>	<i>115</i>
I- Détermination des masses molaires	115
1°) Viscosimétrie	115
2°) Chromatographie d'exclusion stérique	117
3°) Tonométrie	117
4°) Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire	118
II- Etude cinétique	118
<i>CONCLUSION GENERALE</i>	<i>121</i>
<i>ANNEXES</i>	<i>125</i>

La recherche dans le domaine des biomatériaux trouve sa source dans la volonté des humains d'être capables de réparer leurs tissus endommagés avec des substituts artificiels afin d'améliorer – et d'allonger - leur vie¹. C'est sur un papyrus que l'on retrouve la trace de la première utilisation de matériaux artificiels pour réaliser des sutures (4000 av. JC), et de métaux pour la réparation osseuse (2000 av. JC)². Plus tard, les premiers Indiens ont utilisé la soie et les cheveux comme matériaux de suture et des tissus naturels comme le placenta ont même servi de peau de remplacement dans les années 1900³. C'est au XIXème siècle que les progrès de la métallurgie ont conduit à l'introduction du métal pour la réparation osseuse et la prothésie dentaire. Enfin, la première guerre mondiale et son cortège de blessés ont hissé l'acier inoxydable et d'autres métaux au rang de matériaux majeurs pour les implants orthopédiques dans les premières années du XXème siècle.

La croissance exponentielle de l'industrie des polymères après la seconde guerre mondiale a conduit à la découverte de nouveaux matériaux présentant des propriétés spécifiques à ce type d'application. Dans les prémices de ce développement, la recherche ne s'intéressait qu'aux matériaux biologiquement inertes, comme le Dacron[®], le Téflon[®] ou le Silastic[®]. En effet, à cette époque, on pensait qu'un matériau ne pouvait pas être biocompatible s'il n'était pas inerte. Ce n'est que dans les années 1980 qu'il a été démontré qu'aucun matériau n'était vraiment inerte et que parfois les interactions entre l'implant et les tissus pouvaient même se révéler bénéfiques. C'est cette étape qui a permis d'accéder à l'utilisation d'implants interactifs tels que les prothèses poreuses et à celle de polymères biodégradables à l'intérieur

Introduction Générale

du corps humain. Comme les implants dégradables ne nécessitent pas d'intervention chirurgicale pour être retirés, ces polymères biodégradables sont particulièrement adéquats lorsqu'il s'agit de réaliser un implant temporaire. Les sutures, les dispositifs de fixation osseuse et les **systèmes de libération contrôlée** sont des applications largement étudiées pour ces polymères biodégradables.

La libération contrôlée d'un médicament se produit quand un polymère (naturel ou synthétique) est judicieusement combiné à un principe actif de façon que ce dernier soit libéré, par le polymère, dans des conditions préétablies. Cette libération peut être constante, cyclique ou déclenchée par l'environnement ou par des événements externes. Dans tous les cas, le but de la libération contrôlée est double, il doit permettre :

- D'augmenter la durée d'action du principe actif en maintenant sa concentration dans l'organisme supérieure à la concentration minimale efficace le plus longtemps possible.
- De diminuer la toxicité du produit en réduisant la hauteur du pic de concentration dans l'organisme.

Le système idéal de libération contrôlée doit être de plus biocompatible, simple à stériliser, facile à utiliser pour le patient ; il doit en outre permettre d'incorporer une grande quantité de principe actif qu'il doit protéger des enzymes du corps humain et doit se dégrader ou être éliminé sans problème. Enfin, il doit présenter un profil de cinétique de libération du principe actif correspondant à l'objectif recherché.

Beaucoup de ces systèmes sont fondés sur des polymères dont la structure n'évolue pas dans le corps humain. Cependant, les efforts de recherche se concentrent maintenant dans le domaine des polymères biodégradables. Ces polymères sont dégradés dans l'organisme à la suite d'un processus biologique ; il n'est donc pas nécessaire de les retirer une fois la libération du médicament effectuée.

La plupart de ces polymères se dégradent par hydrolyse en composés de taille de plus en plus faibles, biologiquement éliminables. Dans certains cas, comme le polylactide, le polyglycolide et les polypeptides, les produits de la dégradation entrent dans un processus métabolique. C'est ainsi que l'acide lactique, issu de la dégradation du polylactide, pénètre dans le cycle de Krebs où il finit par être dégradé en H₂O et CO₂. La dégradation peut s'effectuer selon une hydrolyse en masse – la dégradation est uniforme dans toute la matrice

Introduction Générale

polymère – ou se produire uniquement à la surface – la vitesse de dégradation est alors proportionnelle à la surface du matériau.

La formulation la plus fréquemment utilisée pour ces systèmes biodégradables est constituée de microparticules administrées par voie orale ou injectées par voie sous-cutanée. Pour réaliser de tels dispositifs, les chercheurs se sont intéressés à plusieurs types de systèmes : suspensions colloïdales de polymères avec ou sans tensio-actif, microcapsules... Les copolymères aux architectures constituées de segments hydrophobes et hydrophiles ont aussi été étudiés⁴. Ces copolymères ont en effet la possibilité de former une structure micellaire stable en phase aqueuse⁵. Les segments hydrophobes se regroupent afin de minimiser l'énergie interfaciale avec l'eau et forment ainsi un cœur hydrophobe, alors que les segments hydrophiles s'étendent dans l'eau pour former une « chevelure » hydrophile. Il existe ensuite deux stratégies distinctes de piégeage de principe actif :

- Le greffage covalent du principe actif sur le polymère. La modification chimique du principe actif nécessite de reprendre les études de toxicologie (long et coûteux).
- L'association ou encapsulation non covalente. Comme la plupart des médicaments possèdent un caractère hydrophobe, on peut les piéger facilement dans le cœur de la particule (Figure 1) par des interactions de Van Der Waals.

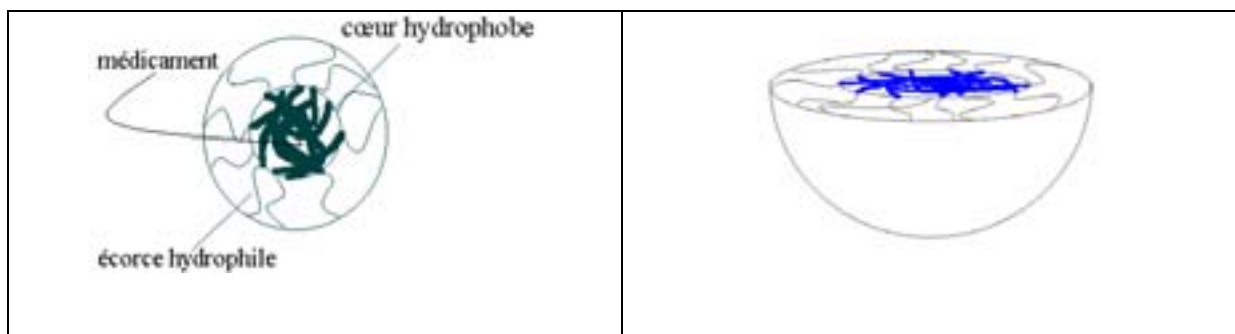


Figure 1

Particule cœur-écorce

Les polyesters aliphatiques appartiennent à la famille des polymères biodégradables et même bioassimilables car les produits de leur dégradation sont compatibles et métabolisés par l'organisme. C'est grâce à ces propriétés que l'utilisation de ces polymères connaît un essor croissant depuis les trente dernières années. Ils sont en effet couramment utilisés comme

Introduction Générale

matériaux chirurgicaux à usage temporaire (sutures, plaques, vis...) mais aussi comme matrices permettant d'encapsuler et de libérer des principes actifs dans le corps humain. La synthèse de ces polyesters s'effectue selon deux voies principales : la polycondensation (polymérisation par étapes) et la polymérisation par ouverture de cycle (polymérisation en chaîne). La première voie est largement utilisée dans l'industrie mais elle présente de nombreux inconvénients dès que l'on s'attache au contrôle de la polymérisation pour des applications biomédicales. Seule la seconde voie permet en effet de contrôler correctement l'architecture des polymères, leur masse molaire et d'ajuster les propriétés physico-chimiques de chaque matériau aux applications envisagées.

Les polymères synthétiques réalisés à partir d'acides aminés naturels occupent également une place importante au sein de la grande famille des polymères biodégradables. Ils sont aussi bioassimilables car directement métabolisables par le corps humain. Les protéases humaines (pepsine, trypsine, chymotrypsine...) attaquent en effet la fonction amide et clivent la liaison N-C. De plus, certains de ces polypeptides sont connus pour s'auto-associer en solution aqueuse pour former des particules.

Depuis la découverte initiale de l'insuline en 1922 par Banting et Best, le but ultime de toutes les recherches sur ce médicament est d'en trouver une forme orale. Encore actuellement, l'insuline n'est administrée aux diabétiques que par injection. La voie orale reste en effet inefficace, car l'insuline ingérée subit l'attaque des enzymes protéases de l'organisme qui la dégradent comme n'importe quelle autre protéine. Pour réussir l'administration orale de l'insuline, il faut donc la protéger de l'action de ces enzymes et ainsi favoriser sa vectorisation dans le corps humain.

Dans cet objectif, l'étude concernée par nos travaux consiste en la synthèse de nouveaux copolymères, potentiellement auto-associatifs en milieu aqueux, susceptibles de former des nanoparticules afin d'encapsuler l'insuline, permettant ainsi sa protection et sa vectorisation à travers l'organisme, lors de l'administration orale. Une application à d'autres protéines pourrait ensuite être envisagée.

Le choix des polymères constitutifs de ces copolymères s'est porté sur le polylactide et le poly(acide glutamique). L'un et l'autre sont en effet bioassimilables ; le polylactide est un polyester aliphatique hydrophobe, et le poly(acide glutamique) un polypeptide hydrophile. Le

Introduction Générale

polylactide est synthétisé à partir du L-lactide et le poly(acide glutamique) à partir du N-carboxyanhydride de L-glutamate de benzyle.

Le but précis de cette thèse de doctorat est donc de synthétiser et de caractériser des copolymères à blocs, amphiphiles, composés de polylactide et de poly(acide glutamique). Ces polymères seront ensuite testés par la société FLAMEL TECHNOLOGIES pour leurs propriétés éventuelles d'autoassociation et d'encapsulation de protéines.

Le compte rendu de ces recherches sera présenté dans de ce manuscrit en cinq chapitres :
Le premier sera consacré aux rappels bibliographiques afférents à notre étude. Nous réservons le deuxième à l'étude détaillée de la synthèse du polylactide fonctionnalisé et à sa caractérisation. Le troisième est dévolu à l'étude du poly(glutamate de benzyle), précurseur du poly(acide glutamique), à sa synthèse et à ses caractérisations. Le quatrième chapitre est consacré à la synthèse des copolymères présentant des architectures à blocs. Enfin, en ce qui concerne le cinquième chapitre, il rassemble tous les modes opératoires expérimentaux qui se rapportent à cette étude. Afin de faciliter la lecture de ce mémoire, nous avons également rassemblé dans ce chapitre des annexes qui concernent des données tirées de la littérature sur les différents produits qui sont à la base de nos copolymères.

¹ R. Lyman, **1983**, Polymers in Medicine. Biomedical and Pharmacological Applications, Chiellini, Giusti Eds., 215-218

² H. Frommelt, Makromol. Chem., Makromol. Symp., **1987**, 12, 281-301

³ S. Silver, Biocompatibility : Interactions of Biological and Implantable Materials, **1989**, vol 1

⁴ J.P. Mc Gee, M. Singh, X.M. Li, H. Diu, D.T. O'Hagan, J. Microencapsulation, **1997**, 14, 197-210

⁵ Z. Tuzar, P. Kratochvil, Adv. Colloid Interface Sci., **1976**, 6, 201

Chapitre Bibliographique

PREMIERE PARTIE : SYSTEMES A LIBERATION CONTROLEE	7
I- L'insuline et le traitement du diabète	7
II- La libération contrôlée de médicaments	9
III- Les architectures pour la libération contrôlée	11
DEUXIEME PARTIE : LE POLYLACTIDE	17
I- Introduction	17
II- Synthèse du polylactide	18
III- Mécanismes de la polymérisation du lactide par ouverture de cycle	19
1°) Mécanisme cationique de la polymérisation par ouverture de cycle du lactide	20
2°) Mécanisme anionique de la polymérisation par ouverture de cycle du lactide	22
3°) Mécanisme de polymérisation par coordination/insertion	23
TROISIEME PARTIE : LE POLY(GLUTAMATE DE BENZYLE)	30
I- Introduction	30
II- Synthèse de polypeptides	30
III- Mécanisme de polymérisation des N-CarboxyAnhydrides	31
1°) Polymérisation amorcée par l'eau	32
2°) Polymérisation amorcée par les amines primaires	33
3°) Polymérisation amorcée par les amines secondaires	36
4°) Polymérisation amorcée par les amines tertiaires	38
5°) Polymérisation amorcée par d'autres types d'amorceurs	38
IV- Etude cinétique de la polymérisation du NCA de glutamate de benzyle	40

PREMIERE PARTIE : SYSTEMES A LIBERATION CONTROLEE

I- L'insuline et le traitement du diabète

Les peptides et les protéines ont toujours joué un rôle à part au sein de la médecine en général. Les progrès récents de la biotechnologie et de la pharmacie ont conduit à une utilisation toujours plus importante de protéines dans les thérapies. Depuis les dix dernières années, la FDA (Food and Drug Administration), a autorisé, aux Etats-Unis plus de vingt médicaments dérivés des biotechnologies et plusieurs centaines sont à différentes étapes de la procédure d'autorisation¹. Aujourd'hui, plus de mille sociétés sont impliquées dans la recherche concernant les biotechnologies. Les peptides et les protéines utilisés dans diverses thérapies pourront comporter des agents anticancéreux, des hormones, des analgésiques, des facteurs de croissance...Cependant, l'application clinique de ces composés est limitée en raison de plusieurs problèmes tels qu'une faible stabilité chimique et physique, et le manque de groupements permettant leur absorption et leur distribution dans l'organisme. C'est pourquoi pour que ces médicaments deviennent disponibles, il est essentiel de les incorporer dans des systèmes de libération efficaces et sans danger.

Les protéines, en effet, ne sont en général pas administrées par voie orale car elles sont digérées et transformées en leurs acides aminés constitutifs par les diverses enzymes présentes tout au long du circuit gastro-intestinal. Les acides aminés sont alors absorbés par l'épithélium gastro-intestinal mais ils ont perdu l'activité biologique que possédait la protéine originelle. C'est pourquoi, même si les biotechnologies permettent de synthétiser de plus en plus de médicaments à base de protéines, on continue à les administrer sous forme d'injections.

L'insuline est le seul traitement existant pour les patients insulino-dépendants (atteint de diabète de type I). Cette maladie est certainement due à une destruction auto-immune des cellules β du pancréas qui synthétisent l'insuline. Privés d'une quantité suffisante d'insuline, ces patients ne peuvent métaboliser correctement le glucose ; leur taux de glucose sanguin est alors extraordinairement élevé (hyperglycémie) alors que celui du glucose intra-cellulaire reste extrêmement faible. Les complications chroniques de cette maladie sont très graves : rétinopathie (le diabète est la première cause de cécité), neuropathie, néphropathie, complications cardiovasculaires et susceptibilité accrue aux infections². Le diabète non-

Premier Chapitre : Etude Bibliographique

insulino-dépendant est une maladie différente, caractérisée par une absence de réponse de l'organisme à l'insuline. Les patients qui souffrent de ce diabète de type II ont en général des taux d'insuline très élevés mais, souvent à cause de l'âge et/ou de l'obésité, ils ne peuvent pas métaboliser correctement le glucose non plus. Le contrôle du taux de glucose sanguin est complexe. Une seule dose journalière d'insuline ne suffit pas pour maintenir un taux de glucose faible. La plupart des patients doivent s'administrer eux-mêmes au moins deux injections sous-cutanées d'insuline chaque jour, et même trois ou quatre pour obtenir un meilleur contrôle. C'est pourquoi une formulation orale de l'insuline comme unique thérapie ou associée à des injections, permettrait de diminuer considérablement les effets secondaires de ces injections tout en apportant un meilleur confort au patient.

Les barrières naturelles de l'organisme³ les plus importantes pour l'administration orale résident dans le circuit gastro-intestinal. On en trouve deux : la barrière physique, constituée d'une couche de cellules très serrées qui forment le tissu épithélial et la barrière enzymatique qui détruit toute l'activité biologique de la protéine (c'est pourquoi la biodisponibilité orale des protéines ne dépasse pas 3 à 4%⁴).

Beaucoup de stratégies différentes ont été employées pour améliorer la biodisponibilité orale des protéines. La plupart du temps, elles consistent en une aide au franchissement des barrières d'absorption intestinales. L'utilisation d'agents de pénétration est une première méthode envisagée. Ces composés (détergents, acides gras...) rendent le mucus et la couche épithéliale perméable en écartant les jonctions intercellulaires. Cependant, les composés employés risquent d'endommager ou de solubiliser totalement les membranes cellulaires et d'entraîner des inflammations locales ou de faire pénétrer dans le lumen intestinal des composés indésirables tels que des agents pathogènes. Des comprimés pelliculés ont aussi été employés. Ils ne protégeaient l'insuline que contre les enzymes de l'estomac et la libéraient dans l'intestin. Des inhibiteurs de protéases ont aussi été testés avec une efficacité contestée. Quant à la dernière méthode, la plus intéressante, elle consiste à encapsuler l'insuline dans des microparticules pour la protéger de ces enzymes.

II- La libération contrôlée de médicaments

La libération contrôlée d'un principe actif dans le corps humain peut être réalisée selon plusieurs techniques, que l'administration soit orale ou non :

- Enrobage classique du médicament dans une capsule ou un comprimé qui sera dégradé par les enzymes du circuit gastro-intestinal. Cette technique ne permet pas de préserver le principe actif des enzymes protéases.
- Encapsulation par des liposomes. Ce sont des vésicules constituées d'une bicouche de phospholipides, ordonnées selon des agencements lamellaires. Un obstacle majeur à l'utilisation des liposomes réside dans leur reconnaissance et leur élimination par le système réticulo-endothélial.
- Les hydrogels sont des structures en trois dimensions, gonflées d'eau, composées essentiellement de polymères ou de copolymères amphiphiles qui ne sont pas toujours bioassimilables.

Une alternative efficace à ces systèmes conventionnels consiste à utiliser des polymères et copolymères biocompatibles pour former des particules. Le principe actif qu'elles contiennent est libéré par diffusion (*diffusion du principe actif à travers la particule*), par érosion (*érosion progressive de la particule conduisant à la libération du principe actif*) ou par une combinaison de ces deux phénomènes^{5,6,7}.

La compréhension des mécanismes de dégradation des polymères dans l'organisme est importante pour permettre de concevoir un système particulier de libération contrôlée et permet d'expliquer les comportements cinétiques. Ils ont été classés en trois catégories.

Dans la première, des liaisons biodégradables sont incorporées au sein de la matrice polymère. Le clivage de ces liaisons transforme le polymère initialement insoluble dans l'eau en fragments solubles. L'hydrolyse de ces liaisons peut s'effectuer chimiquement ou enzymatiquement.

Dans la deuxième catégorie, c'est un réseau réticulé qui contient des liaisons hydrolysables dont le clivage libère des fragments de polymères solubles. La taille de ces fragments dépend de la densité de ces liaisons hydrolysables au sein du réseau polymère.

Dans la troisième, le polymère ne subit aucune modification chimique, il n'est pas dégradé. L'eau diffuse simplement à l'intérieur du réseau polymère, le gonfle, ce qui permet aux médicaments piégés à l'intérieur de se libérer. Le système finit par se solubiliser car il est devenu entièrement hydrophile.

Premier Chapitre : Etude Bibliographique

Les microsphères et les nanosphères sont les morphologies les plus efficaces pour la libération contrôlée ; elles ne nécessitent aucune opération chirurgicale puisqu'on peut les administrer par simple injection ou encore par voie orale⁸.

Une des premières études décrivant la libération d'une protéine à partir de microcapsules de poly(lactide-co-glycolide) est due à Chang⁹ en 1976. Une étude plus détaillée a été réalisée dix ans plus tard dans laquelle de l'insuline était libérée *in vivo* et *in vitro* à partir de microsphères de PLA¹⁰. Trois systèmes de libération contrôlée de protéines réalisés à partir de copolymères de poly(lactide-co-glycolide) ont été approuvés et sont disponibles sur le marché. Il s'agit de Lupron Dépôt[®], de Zoladex[®] et de Décapeptyl[®], qui libèrent tous les trois un peptide analogue de la LHRH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone)¹¹.

Le développement de l'administration intraveineuse de systèmes de libération contrôlée doit remplir certaines conditions. D'abord la quantité de médicament encapsulé doit représenter une fraction importante du système (plus de 30%). Ensuite l'efficacité de l'encapsulation doit être la plus grande possible (on doit arriver à encapsuler le médicament avec un rendement de plus de 80%). Le système doit de plus être lyophilisable, redispersable, biodégradable, stérilisable et d'une taille permettant sa circulation dans l'organisme sans être éliminé trop rapidement¹².

Les copolymères à blocs dans des solvants sélectifs¹³ (un bon solvant d'un bloc mais un mauvais de l'autre bloc) forment des structures micellaires par associations des segments insolubles. Ce type de micelle multimoléculaire avec une architecture cœur-écorce a été observé pour la première fois par Plestil et Baldrian¹⁴ par Diffusion de Rayons X aux Petits Angles (SAXS) sur des copolymères triblocs polystyrène-polybutadiène-polystyrène dans un solvant du polystyrène.

C'est Volkheimer qui a montré en 1975 que des particules de copolymères comprises entre 5 et 110µm pouvaient traverser l'entérocyte de façon paracellulaire¹⁵. Et c'est Ringsdorf¹⁶ qui a initié cette conception des micelles de copolymères à blocs comme système de libération contrôlée.

III- Les architectures pour la libération contrôlée

De nombreux exemples de systèmes de libération contrôlée de médicaments sont désormais décrits dans la littérature. Certains de ces systèmes sont fondés sur l'utilisation d'homopolymères, de copolymères diblocs ou triblocs qui forment des particules, soit par autoassociation, soit à l'aide de tensio-actifs ou font intervenir des copolymères greffés ou des hydrogels. Seule une faible partie de tous ces systèmes est constituée de polymères entièrement biodégradables : on trouve en effet le plus souvent des particules composées d'un seul polymère biodégradable (généralement du polylactide) ou de copolymères dont un seul est biodégradable, l'autre étant simplement toléré par l'organisme ou excrété.

C'est ainsi que de nombreuses équipes se sont intéressées à l'étude du polylactide, et à son utilisation sous forme de copolymères avec d'autres types de polymères. Jie et Zhu¹⁷ ont réalisé une étude de biodégradabilité de copolymères statistiques poly(lactide-co-carbonate de triméthylène) avec des compositions en polylactide variant de 15 à 100%. Ils réalisent leurs synthèses en masse à 140°C et obtiennent des masses molaires de l'ordre de 20000g/mol, avec des indices de polymolécularité de 2. Les copolymères poly(lactide-co-oxyde d'éthylène) ont aussi beaucoup été étudiés, surtout sous la forme d'architectures à blocs. L'équipe de Li¹⁸ a ainsi synthétisé des copolymères à blocs poly(lactide-b-oxyde d'éthylène). Le lactide est polymérisé en masse, amorcé par de l'octoate d'étain et du poly(oxyde d'éthylène). La masse molaire du bloc PLA est de 6000g/mol. Ces copolymères contiennent 5 à 50% de POE et ont permis de réaliser des particules de 0,5 à 5µm. Les particules ont été synthétisées à l'aide de tensioactifs. L'équipe de Lim¹⁹ et Park s'est quant à elle penchée sur les copolymères triblocs polylactide-poly(oxyde d'éthylène)-polylactide, macroamorcés par le poly(oxyde d'éthylène) dihydroxy téléchélique de $\overline{M}_w = 1000$ ou 3400g/mol et de l'octoate d'étain en solution dans le toluène. Les polylactides ont des $\overline{M}_w = 50000$ g/mol. Ces copolymères, dont l'architecture tribloc n'a pas été réellement prouvée, ont permis à Lim de réaliser des particules de 100µm, avec l'aide de tensioactifs, pour encapsuler 3,4% en masse d'albumine de sérum bovin. Les particules sont relativement grosses et ne permettent pas d'encapsuler une grande quantité de médicaments. Une autre architecture a été conçue par Cho²⁰ et al., il s'agit de copolymères greffés, des chaînes polylactide de 4 à 20000g/mol étant greffées sur du poly(oxyde d'éthylène). Ces copolymères contiennent 3 à 40% de POE et ont des masses molaires de 10 à 20000g/mol. La polymérisation du lactide est amorcée par

Premier Chapitre : Etude Bibliographique

l'octoate d'étain ($I = 1,3$) ou par $\text{Al}(\text{Et})_3$ ($I = 2$). La dégradabilité de ces copolymères a aussi été étudiée.

Des copolymères à partir de PEO et de polypeptides ont aussi été le sujet de nombreuses études. C'est le cas pour Cho²¹ qui a synthétisé des copolymères triblocs poly(glutamate de benzyle)-b-poly(oxyde d'éthylène)-b- poly(glutamate de benzyle). Le bloc POE a une masse molaire de 2000g/mol, les blocs polypeptides des masses de 1500 à 15000g/mol. Le POE joue le rôle de macroamorceur du NCA de glutamate de benzyle, mais aucune preuve n'a été apportée quant à la structure réelle des copolymères triblocs. Les auteurs ont étudié la structure des copolymères synthétisés mais ne se sont pas intéressés à une application éventuelle de leurs objets. Kugo s'est également intéressé à ce type de copolymères²² PBLG-b-POE-b-PBLG mais avec des masses molaires \overline{M}_n supérieures, entre 10000 et 70000g/mol et des indices de polymolécularité assez élevés, $I = 2$. Le POE a été aussi associé à des polypeptides tels que l'acide aspartique. Kataoka et coll.^{23,24} ont ainsi réalisé des micelles de moins de 50nm avec des copolymères à blocs PEO-b-poly(aspartate de benzyle). Le PEO a une masse molaire de 5000g/mol, et 20 unités d'aspartate de benzyle sont copolymérisées à la suite. Le copolymère subit une déprotection visant à cliver les groupements ester benzylique. Le copolymère poly(oxyde d'éthylène-b-acide aspartique) leur permet de synthétiser des micelles par émulsion et dialyse. Ce sont des particules dynamiques dans lesquelles ils ont encapsulé de la doxorubicine²⁵ ou du lysozyme de blanc d'œuf²⁶. Ces mêmes copolymères ont enfin permis à Kataoka²⁷ et Yokoama d'encapsuler de l'adriamycine, un agent anti-cancéreux, dans leurs particules et d'effectuer des tests de libération contrôlée *in vivo*.

Le polylactide a aussi été très souvent associé au polyglycolide pour concevoir des systèmes de libération contrôlée. Plusieurs de ces systèmes sont désormais commercialisés, il s'agit de Zoladex[®] (Zeneca), Decapeptyl[®] (Ipsen Biotech) et Prostat SR[®] (Lederle). Mc Gee s'est intéressé à ces systèmes, il a synthétisé à l'aide de tensioactifs des particules de 0,5 à 100 μm à partir de copolymères statistiques poly(lactide-co-glycolide) de masse molaire 18000g/mol. Ces particules lui ont permis d'encapsuler entre 0,5 et 5% de protéine²⁸. Mehta a aussi réalisé des particules d'environ 50 μm à partir de copolymères poly(lactide-co-glycolide) de 1500 à 20000g/mol. Dans la catégorie des copolyesters, Song²⁹ a synthétisé des copolymères poly(ϵ -caprolactone)-b-polylactide de $\overline{M}_n = 4000\text{g/mol}$, avec des compositions massiques ϵ -caprolactone/lactide de 90/10, 75/25 et 60/40 qui lui ont permis d'obtenir des particules de 40

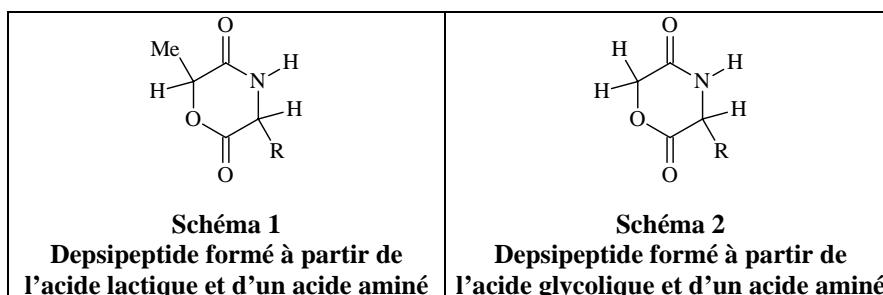
à 500 μ m. Ces particules, un peu trop grosses pour certaines applications, étaient capables d'encapsuler 10 à 20% en masse de Norgestrel (contraceptif). Enfin, c'est de l'insuline que Carino³⁰ a réussi à encapsuler dans des particules à base de copolymères commerciaux statistiques poly(lactide-co-glycolide) de $\overline{M}_w = 3800\text{g/mol}$. Leurs particules mesurent moins de 5 μ m et permettent d'encapsuler 1,6% d'insuline. L'efficacité de libération *in vivo* de ces particules est assez faible, cela est sûrement dû à la taille trop élevée et à la faible quantité d'insuline encapsulée. Les auteurs espèrent augmenter cette efficacité en diminuant la taille des particules.

En outre, d'autres copolymères ont été largement étudiés, il s'agit des copolypeptides. Deming a publié une étude sur des copolymères à blocs polylysine-polyglutamine et polyglutamine-polyleucine par polymérisation par ouverture de cycle de NCA³¹. Les masses molaires de ses copolymères sont de 30000 à 80000g/mol, et il a étudié la digestion de ses polymères. L'équipe de Meyrueix s'intéresse aussi beaucoup au sujet. Ils ont publié en 1999 un article consacré à la synthèse de particules formées de copolymères à blocs de polyleucine-b-poly(glutamate de sodium)³². Ces copolymères s'auto-associent en solution aqueuse en petits disques de 200nm et en cylindres de 100nm. Leurs copolymères sont composés de 50% de leucine et 50% de glutamate de sodium (en mole). Les \overline{M}_n théoriques sont de 18000g/mol, mais ils obtiennent deux populations de copolymères dont la plus importante (80%) a une \overline{M}_w supérieure à 5000g/mol et un indice de polymolécularité supérieur à 4. Ces particules ne permettent pour l'instant d'encapsuler que des quantités limitées d'insuline.

Enfin, concernant les copolymères polylactide-polypeptides, qui ont été moins étudiés, nous avons retenu certaines études pertinentes. Ainsi, que les travaux de Gotsche et Höcker ont contribué à initier nos recherches. Dans leur article de 1995, ils synthétisent en effet des copolymères à blocs polylactide-b-polypeptide³³, où le bloc polypeptide est constitué de L-alanine, de L-phénylalanine ou de L-leucine. Leur stratégie emprunte deux voies distinctes de macroamorçage du bloc peptidique par le bloc polylactide fonctionnalisé par une amine primaire. Dans la première voie, l'amine primaire provient de l'amorceur du polylactide, alors que dans la seconde voie, l'apparition de cette fonction est consécutive à une modification chimique du polymère. Le polylactide, de masse molaire $\overline{M}_n = 18000\text{g/mol}$, est synthétisé en 12 heures à 80°C, et la polymérisation est amorcée par $\text{Bu}_2\text{Sn}(\text{OMe})_2$ (*composé très toxique en raison des liaisons Bu-Sn*) ou par Et_2Zn . Le bloc polypeptide est quant à lui synthétisé en

48 heures à température ambiante. Les auteurs retrouvent 30 à 40% de polylactide n'ayant pas réagi dans le milieu réactionnel de copolymérisation, en raison d'une fonctionnalisation incomplète du macroamorceur. Cela explique les divergences des valeurs théoriques et expérimentales des rapports de composition en lactide et acides aminés. En effet, pour des valeurs théoriques de 50/50, les valeurs expérimentales sont 8/92, 14/86, et pour des valeurs théoriques de 67/33, les valeurs expérimentales sont 10/90, 33/67.

Rypacek quant à lui a étudié des copolymères statistiques polylactide-co-polypeptide³⁴. Il a en effet effectué des copolymérisations de lactide et de NCA de glutamate de benzyle, d'aspartate de benzyle ou de phénylalanine amorcées par de l'octoate d'étain. Il a montré que le mécanisme de copolymérisation d'un NCA avec le lactide est celui du monomère activé. Il a copolymérisé jusqu'à 15% d'acides aminés avec le lactide. Mais il a obtenu de grandes différences entre les valeurs théoriques et expérimentales de ses masses molaires ($\overline{M}_{n \text{ théo}} = 14000\text{g/mol}$ et $\overline{M}_{n \text{ exp}} = 5000\text{g/mol}$). Les indices de polymolécularité sont d'environ 1,5. Il n'a pas étudié d'applications précises de ses objets et ne s'est intéressé qu'à la dégradation des polymères. Il s'est ensuite penché sur la synthèse de copolymères à blocs polylactide-polypeptide (aspartate de benzyle ou glutamate de benzyle). Il synthétise des polypeptides fonctionnalisés OH par ouverture de cycle de NCA et modification chimique du bout de chaîne. Il macroamorce ensuite le L-lactide par la fonction hydroxy du polypeptide et de l'octoate d'étain comme catalyseur. Son étude ne comprend pas l'analyse des masses molaires des copolymères synthétisés. Les études suivantes consacrées aux copolymères polylactide-polypeptides utilisent une voie particulière de synthèse. Elles se fondent sur la copolymérisation statistique par ouverture de cycle de deux monomères cycliques, le lactide et un depsipeptide (Schéma 1, Schéma 2), hétérocycle composé d'un monomère acide lactique ou glycolide et d'un acide aminé. Chaque ouverture de ce cycle conduit donc à l'ajout d'un motif dimère acide lactique-acide aminé ou acide glycolique-acide aminé.



C'est ainsi que Tasaka a étudié les copolymères polylactide-co-polyglycolide-co-polysérine³⁵ par copolymérisation du lactide et d'un depsipeptide formé d'acide glycolide et de sérine. Il a ensuite greffé des blocs polylactides par macroamorçage à partir des fonctions alcool des motifs sérine. Les masses molaires obtenues pour ses copolymères sont $\overline{M}_n = 40000$ à 50000g/mol avec des indices de polymolécularité élevés $I = 3$. Jin s'est aussi intéressé à des synthèses identiques, mais par copolymérisation du lactide et d'un depsipeptide formé d'acide lactique et de sérine amorcée par l'octoate d'étain³⁶. Ses copolymères, de $\overline{M}_n = 30000$ à 60000g/mol contiennent 1 à 9% de sérine.

L'équipe de Langer a aussi largement étudié les copolymères polylactide-polypeptide à partir de la copolymérisation du lactide et de depsipeptides formés d'acide lactique et d'acide aminé. Ils ont en effet synthétisé des copolymères statistiques polylactide-co-polysérine en amorçant la copolymérisation par de l'octoate d'étain³⁷. Ils ont également utilisé ces copolymères pour macroamorcer la polymérisation de blocs greffés de polylysine^{38,39} ou de poly(acide aspartique)⁴⁰; ce dernier permettant une réticulation photochimique des copolymères après modification chimique par un agent réticulant. Ils ont étudié la dégradation de ces polymères et effectué des tests mécaniques sur les polymères réticulés dont une application pourrait être la réparation tissulaire. Ces polymères ont des masses molaires $\overline{M}_n = 45000\text{g/mol}$, mais ces valeurs sont uniquement mesurées par RMN ^1H et il n'y a aucune autre analyse complémentaire concernant les masses molaires de ces objets pourtant complexes. Son équipe a également utilisé des copolymères polylactide-co-polylysine synthétisés selon la même méthode et greffés avec des blocs polylysine, polyalanine ou poly(acide aspartique) pour synthétiser des particules de 5 à $8\mu\text{m}$ à l'aide de tensioactifs⁴¹. Ces particules leur ont permis d'encapsuler entre 2 et 18% en masse de rhodamine. Mais les tailles de ces particules sont extrêmement étalées, et il semble que cela soit dû à un étalement des masses molaires des copolymères mis en jeu et que cette étude ne mentionne pas. Enfin, Huang et Eastal⁴² ont synthétisé des copolymères triblocs polylactide-poly(glutamate de benzyle)-polylactide, par macroamorçage du L-lactide par un polypeptide diamino téléchélique et de l'octoate d'étain. Mais leur étude, appliquée à la synthèse de gels biodégradables n'inclut pas la mesure expérimentale des masses molaires de leurs copolymères et ne prouve pas réellement la difonctionnalité de poly(glutamate de benzyle) pour conduire aux copolymères triblocs.

L'obtention de particules support de principe actif à partir de copolymères biodégradables de polyesters et de poly(acide aminé) semble être la voie la plus prometteuse car elle seule

Premier Chapitre : Etude Bibliographique

permet d'obtenir des propriétés de bioassimilation totale, associée à une bonne protection du principe actif. *Il faut pour cela considérer qu'un copolymère composé de blocs biodégradables est lui-même biodégradable.* On peut ainsi espérer obtenir une meilleure vectorisation que pour celles à base de copolypeptides en raison d'une protection plus efficace. Ces copolymères permettent en outre de conférer les propriétés d'amphiphilie recherchées, contrairement aux copolyesters. Néanmoins, dans la plupart des cas publiés ces copolymères sont synthétisés avec des amorceurs potentiellement toxiques comme l'octoate d'étain.

En ce qui concerne l'utilisation des depsipeptides, elle ne permet pas d'accéder à une réelle architecture à bloc ou greffée nécessaire à la stabilité de la particule et à une protection efficace. C'est pour toutes ces raisons que nous avons choisi de synthétiser des copolymères à blocs ou greffés à partir de lactide et de glutamate de benzyle en utilisant un amorceur différent dont nous détaillerons les avantages dans la suite de ce document. Cette voie originale pourrait s'avérer prometteuse et amener de réels progrès .

DEUXIEME PARTIE : LE POLYLACTIDE

I- Introduction

Le polylactide ou poly(acide lactique) est un polyester aliphatique synthétisé généralement soit par condensation à partir d'un α -hydroxy acide (l'acide lactique), soit par polymérisation par ouverture de cycle, à partir d'un monomère cyclique : le lactide (Schéma 3).

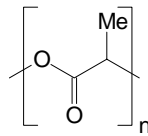


Schéma 3
Poly(acide lactique)

C'est un polymère biorésorbable aux propriétés thermoplastiques, de module et de résistance élevés. Cependant, ses propriétés mécaniques dépendent fortement de la voie de synthèse et de la qualité du polymère synthétisé (composition, pureté, masse molaire...). Ce polymère a connu récemment un intérêt grandissant pour deux raisons principales.

On peut préparer de l'acide lactique en grandes quantités (jusqu'à 10^5 tonnes par an) à partir de n'importe quel polysaccharide selon un procédé biotechnologique. Ainsi la production de polylactide peut être fondée sur des ressources renouvelables et être indépendante du prix ou de l'approvisionnement en pétrole.

Les propriétés physiques (notamment mécaniques) du polylactide peuvent être contrôlées facilement en modifiant la composition du mélange d'isomères L ou D⁴³.

On peut utiliser le PLA pour réaliser des objets par injection ou moulage, on peut l'étirer sous forme de films ou de fibres et son domaine d'application s'étend de l'industrie de l'emballage aux applications biomédicales (sutures, implants, libération contrôlée...).

La dégradation normale de ce polymère résulte d'une simple hydrolyse à pH neutre, sans avoir recours à des enzymes. Selon la composition du polymère, la taille et l'épaisseur de l'échantillon, l'hydrolyse peut être terminée en quelques mois à quelques années. Le taux d'hydrolyse dépend bien sûr de la température, de la quantité de monomère résiduel et d'acide présents. Cette vitesse de dégradation contrôlable est d'un grand intérêt pour les applications biomédicales et pharmaceutiques⁴⁴.

II- Synthèse du polylactide

La synthèse du polylactide peut se faire selon deux voies principales de polymérisation (Schéma 4) :

Dans la première, l'acide lactique est polymérisé par polycondensation, ce qui donne un polymère de faible masse molaire (qui est la plupart du temps inutilisable tel quel), il faut utiliser des agents de couplage en raison de nombreuses réactions secondaires de terminaison dues à la présence d'impuretés, d'eau, à la viscosité du mélange réactionnel et aux réactions de rétroscission qui conduisent à la formation de cycles lactide⁴⁵.

Dans la deuxième voie le polylactide est obtenu par polymérisation par ouverture de cycle d'une dilactone à 6 atomes, le lactide. Compte tenu du contrôle cinétique partiel de la réaction, les valeurs de la masse molaire du polymère sont bien plus élevées que dans la méthode précédente (plus de 100.000g/mol). Nous allons décrire plus en détail cette dernière méthode puisque c'est celle que nous avons utilisée pour nos travaux.

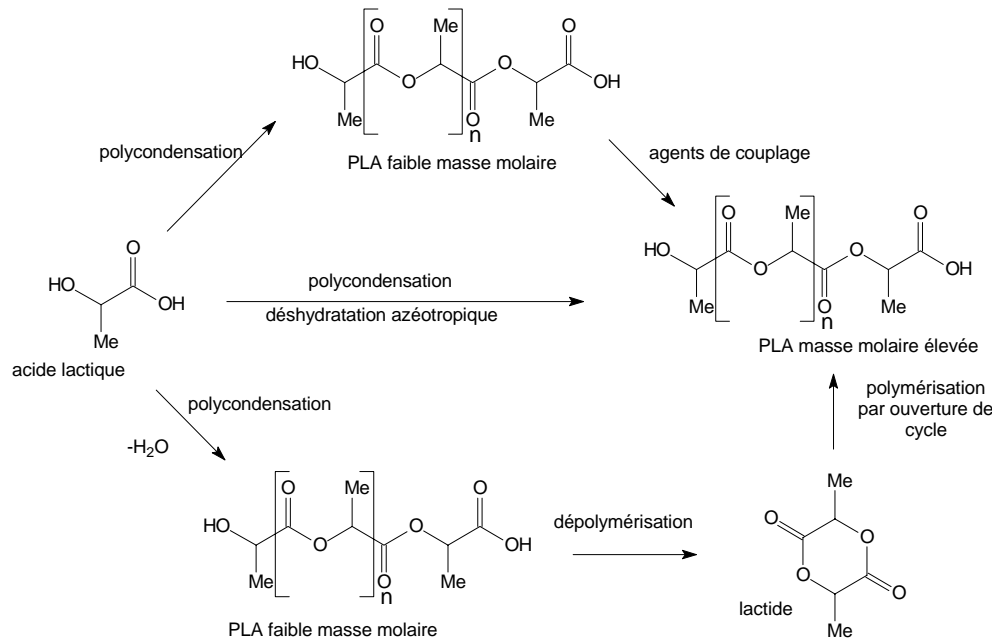


Schéma 4
Méthodes de synthèse du PLA

III- Mécanismes de la polymérisation du lactide par ouverture de cycle

La polymérisation par ouverture de cycle s'affranchit des limitations bien connues de la polymérisation des hydroxy acides (Annexe1). Avec des conditions plus douces, on peut synthétiser des polyesters de masse molaire élevée en peu de temps. Pourvu que l'étape de propagation ne s'accompagne d'aucun transfert ni de réaction de terminaison, on peut prévoir la masse molaire à partir du rapport $[M]_0/[A]_0 = \text{concentration initiale en monomère} / \text{concentration initiale en amorceur}$.

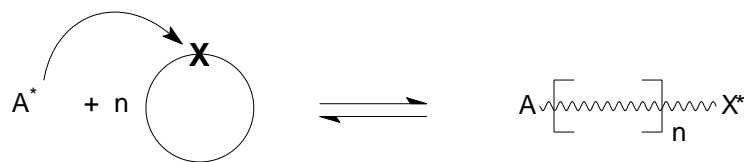


Schéma 5
Schéma général d'une polymérisation par ouverture de cycle

La polymérisabilité du lactide comme tout monomère cyclique dépend simultanément de facteurs thermodynamiques et cinétiques. Comme toutes les polymérisations en général, la polymérisation par ouverture de cycle est une réaction équilibrée (Schéma 5), il faut donc tenir compte de la concentration en monomère à l'équilibre qui, dans le cas de ces polymérisations, n'est pas toujours négligeable.

D'autres réactions équilibrées ont lieu au cours de la polymérisation, il s'agit de réactions secondaires : rétroscissions ou transestérifications intra-moléculaires et redistributions ou transestérifications inter-moléculaires (Schéma 6, Schéma 7).

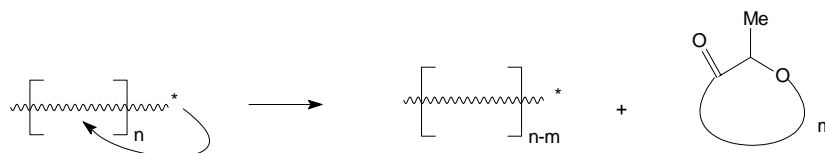


Schéma 6
Réaction de rétroscission

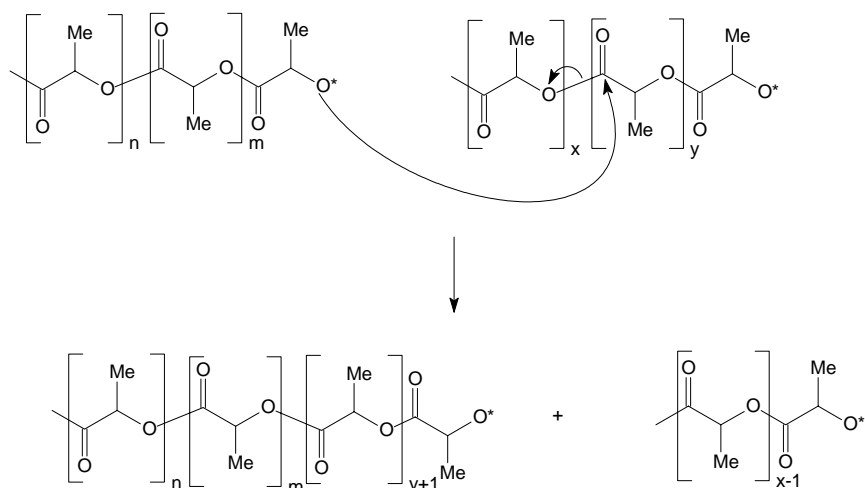


Schéma 7
Réaction de redistribution

La polymérisation par ouverture de cycle du lactide peut s'effectuer selon différents mécanismes (cationique, anionique, coordination) que nous décrivons dans la suite de ce chapitre ; nous détaillerons tout particulièrement le mécanisme de polymérisation par coordination/insertion qui est celui de la méthode de synthèse que nous avons employée.

1°) Mécanisme cationique de la polymérisation par ouverture de cycle du lactide

On peut séparer les amorceurs utilisés en polymérisation cationique par ouverture de cycle en quatre groupes : les acides protoniques, les acides de Lewis, les agents alkylants et les agents acylants. Le mécanisme de polymérisation cationique des lactones qui avait d'abord été proposé par Cherdron et al.⁴⁶, a longtemps été considéré comme exact. Il consistait en une attaque électrophile sur l'oxygène endocyclique de la lactone qui entraînait la rupture de la liaison acyl-oxygène avec la formation d'un ion acyl carbonium susceptible de propager la réaction.

Ce mécanisme a été remis en cause par Penczek et al.⁴⁷ en 1984. En effet une analyse des bouts de chaînes polymères par RMN et par IR montrait l'existence d'extrémités fonctionnalisées ester de méthyle. Penczek suggère que le mécanisme réel procède par un intermédiaire, un dialcoxy carbocation cyclique (a). La lactone est en fait méthylée dans un premier temps puis on assiste à la rupture de la liaison oxygène-alkyle de l'hétéro cycle (Schéma 8)⁴⁸. En ce qui concerne la polymérisation du lactide, Kricheldorf et Dusing ont comparé l'efficacité d'une large gamme d'amorceurs parmi lesquels des acides de Brönsted,

Premier Chapitre : Etude Bibliographique

de Lewis ou des agents d'alkylation. Seuls l'acide trifluorométhanesulfonique ($\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$) et le trifluorométhane sulfonate de méthyle ($\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Me}$) se sont révélés efficaces. Cette particularité du lactide serait due à la moins grande sensibilité de l'atome de carbone secondaire du lactide (b), vis-à-vis d'une attaque nucléophile, comparée à celle des carbones primaires situés en α de l'oxygène dans les lactones (Schéma 9).

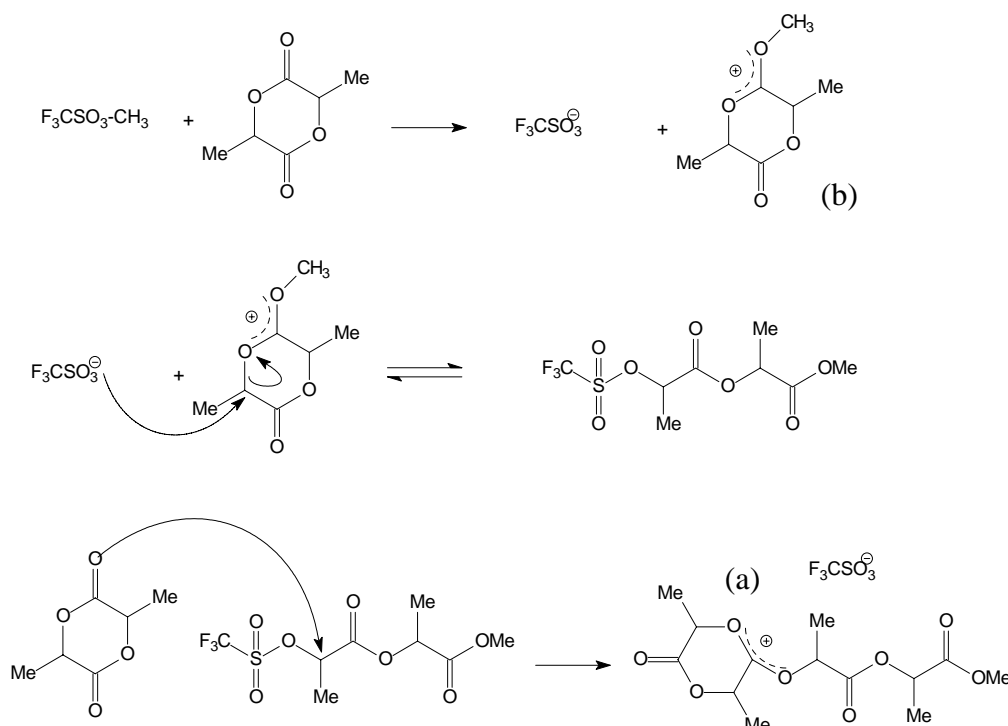


Schéma 8
Mécanisme de polymérisation cationique du lactide

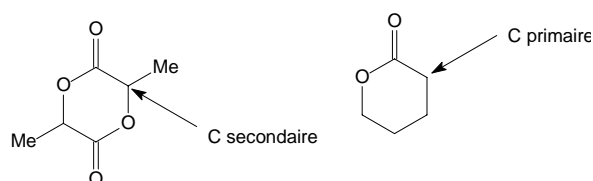


Schéma 9

En ce qui concerne la phase de propagation, la polymérisation cationique donne lieu à des temps de polymérisation assez longs (48 heures à 50°C pour polymériser entièrement le lactide⁴⁸) et des réactions secondaires de transestérifications inter- et intra-moléculaires nombreuses.

2°) Mécanisme anionique de la polymérisation par ouverture de cycle du lactide

Le principal avantage de la polymérisation anionique réside dans les durées des polymérisations : elles sont beaucoup plus courtes que précédemment (90% de conversion lors de la polymérisation du lactide amorcée par du méthanolate de potassium en 10 minutes à 20°C⁴⁹).

Les amorceurs les plus couramment employés sont des dérivés organométalliques des carboxylates et des alcoolates de métaux alcalins, associés parfois à des éthers couronnes⁵⁰.

Ces amorceurs doivent être de nucléophilie élevée pour être efficaces à des températures relativement basses (ce qui limite l'apparition des réactions secondaires)^{56,51,52}. Néanmoins si cette nucléophilie est trop importante, l'amorçage se produit par déprotonation du monomère⁵³ (Schéma 10). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le méthanolate de potassium⁴⁹ et le terbutanolate de potassium⁵⁴.

Le mécanisme de la polymérisation anionique repose sur une attaque nucléophile de l'amorceur sur le carbone électropositif de la fonction carbonyle du monomère, suivie du clivage de la liaison oxygène-acyle (Schéma 11). La propagation procède donc par des espèces actives de type alcoolate⁵⁵. Ce mécanisme a été confirmé par les études de Kricheldorf⁵⁶ et d'Hofman⁵⁷ qui ont prouvé par RMN l'existence de groupements ester de méthyle et hydroxyle aux extrémités des polymères amorcés par du méthanolate de potassium.

Malgré tous les essais réalisés, le contrôle de la polymérisation par cette voie est difficile. Les réactions de transestérifications inter- et intra-moléculaires ne peuvent être évitées, ce qui rend aléatoire la synthèse de copolymères à blocs⁵⁸.

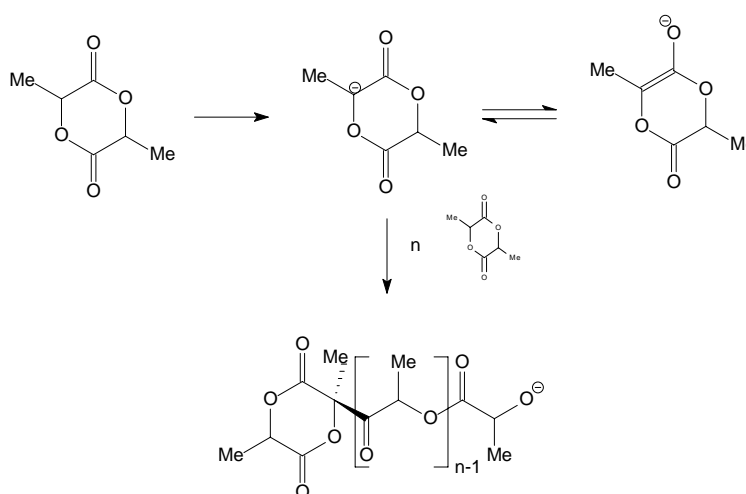


Schéma 10
Amorçage selon une réaction de déprotonation

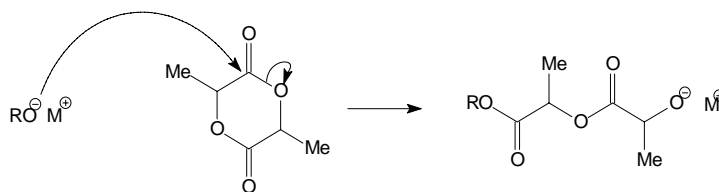


Schéma 11
Mécanisme d'amorçage anionique du lactide

3°) Mécanisme de polymérisation par coordination/insertion

Comme nous l'avons indiqué précédemment, la polymérisation ionique du lactide est perturbée par des réactions secondaires de transestérifications inter-moléculaires et intra-moléculaires. Ces réactions secondaires sont dues à une réactivité trop élevée du centre actif alcoolate qui amorce et propage la polymérisation. Une voie possible pour retarder ou éliminer ces réactions est de diminuer la réactivité de l'alcoolate, par exemple en modifiant la nature du contre-ion. C'est pourquoi de nombreux groupes de recherche ont utilisé comme amorceur des alcoolates et des dérivés organométalliques des métaux de transition des groupes II, III et IV de la classification périodique, tels que le zinc, le titane, le germanium et surtout l'aluminium et l'étain^{59, 60}.

En fait, quel que soit le type d'alcoolate de métal, la polymérisation se produit selon un processus de **coordination/insertion** analogue qui implique la coordination du monomère sur le métal et son insertion dans la liaison **Métal-Oxygène**.

a) Les amorceurs à base d'aluminium

Un des systèmes d'amorçage de la polymérisation du lactide selon un mécanisme par coordination/insertion fait appel aux composés à base d'aluminium et surtout à

l'isopropanolate d'aluminium qui permet d'obtenir des polymères avec une faible polymolécularité et des masses molaires contrôlées dans des temps relativement courts^{61, 62}.

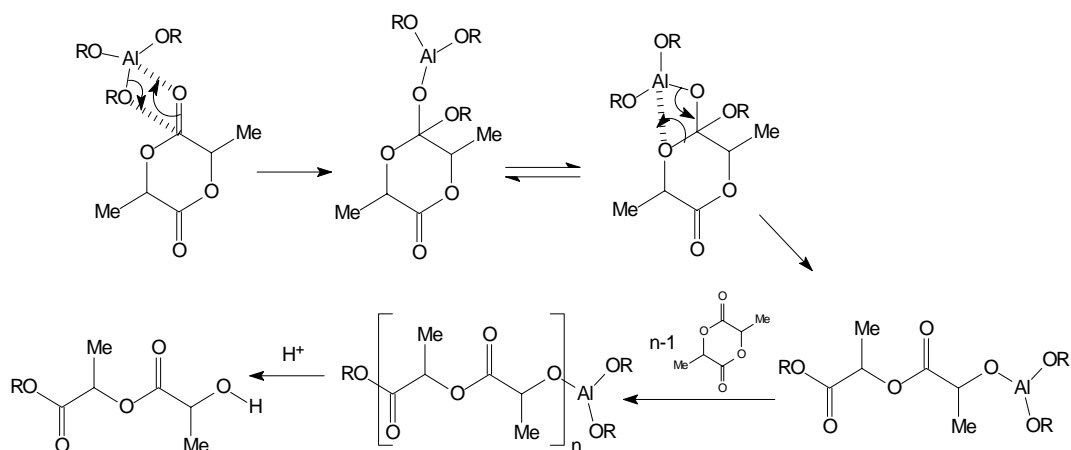


Schéma 12
Mécanisme de polymérisation du lactide amorcée par Al(OiPr₃)

Le mécanisme d'une telle polymérisation a été étudié en détail par Dubois^{63, 66} (Schéma 12). Il met en jeu la coordination de l'oxygène de la liaison carbonyle du lactide sur l'atome d'aluminium, puis l'insertion du motif lactide dans la liaison alcoolate-aluminium suivie de la rupture de la liaison acyl-oxygène.

En solution dans les solvants apolaires, cette polymérisation présente une période d'induction attribuée au réarrangement de l'amorceur agrégé⁶⁴ lors de l'addition du monomère qui est polaire. Ainsi, l'isopropanolate d'aluminium génère trois sites de polymérisation. La propagation se produit sur des chaînes non agrégées (ordres cinétiques unitaires) et les auteurs ont pu calculer une constante de vitesse de polymérisation (0,010 L/mol/s à 70°C dans le toluène)^{65, 66}.

Il faut cependant noter que cette polymérisation amorcée par l'isopropanolate d'aluminium est une polymérisation équilibrée et que cet aspect n'a pas été pris en compte dans les travaux de Dubois et al⁶⁷. La concentration en lactide à l'équilibre à 25°C a été déterminée expérimentalement et est comprise entre **0,01mol/L**⁶⁷ et **0,02mol/L**⁸⁷.

Enfin, l'équipe de Dubois a aussi utilisé cette voie pour synthétiser des copolymères à blocs par macroamorçage à partir d'un polymère hydroxy fonctionnel⁶⁸.

b) Les amorceurs à base d'étain

Les carboxylates de métaux sont aussi utilisés pour amorcer les polymérisations des lactones selon un mécanisme de coordination/insertion mais ils bénéficient d'un caractère moins nucléophile que les alcoolates et se comportent comme des **catalyseurs** et non comme de réels amorceurs. Pour que ces carboxylates puissent amorcer la polymérisation du lactide, il faut ajouter au milieu réactionnel des composés portant un proton actif (alcools en particulier). Ce sont ces composés qui vont jouer le rôle d'amorceurs, la coordination au monomère étant catalysée par les carboxylates⁶⁹. Si on n'introduit pas de coamorceur, ce sont des impuretés présentes dans le milieu réactionnel qui vont jouer ce rôle⁷⁰. Ces polymérisations sont le plus souvent réalisées en masse, à des températures proches de 120-150°C.

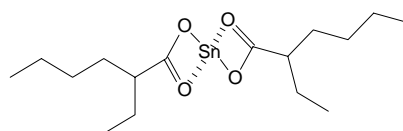


Schéma 13
Octoate d'étain

L'octoate d'étain (2-éthyl hexanoate d'étain) (Schéma 13) est l'amorceur le plus employé et sûrement le plus étudié de tous ceux qui permettent de polymériser le lactide. La préférence qu'il lui a été accordée réside dans ses nombreuses qualités : il est en effet soluble dans la majorité des lactones (utilisation dans les polymérisations en masse), il ne présente qu'une faible toxicité (il a été approuvé par la FDA américaine) et il a une activité catalytique très importante qui permet de synthétiser des polymères de très forte masse molaire avec un taux de racémisation faible.

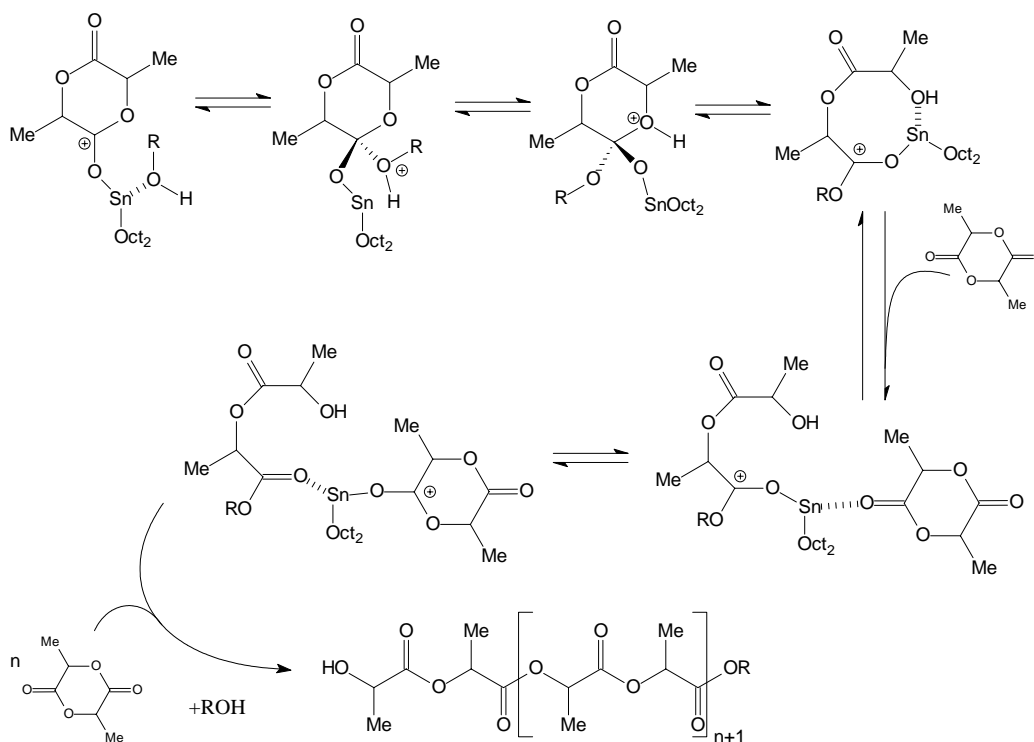


Schéma 14

Mécanisme de polymérisation du lactide amorcé par SnOct₂

Le mécanisme de polymérisation du lactide amorcé par cet amorceur a été étudié par de nombreux chercheurs, mais certaines incertitudes persistent encore concernant les effets de certaines variables. Le mécanisme proposé par Du⁷¹ (Schéma 14) intègre le rôle de coamorceur joué par l'étain ainsi que la participation de composés portant des groupes hydroxyle. Kricheldorf⁷² a lui aussi proposé un mécanisme par coordination/insertion et a démontré par RMN ¹H qu'il n'y avait pas d'insertion des groupes octoate aux extrémités des chaînes mais insertion des groupes alkyles R provenant des composés hydroxyles R-OH.

Les masses molaires sont ainsi calculées à partir du rapport de la concentration en monomère sur la concentration en coamorceur $[M]/[CoAm]$, et non par le rapport de la concentration en monomère sur la concentration en octoate d'étain. Cependant, les valeurs expérimentales et théoriques des \overline{DP}_n sont assez différentes, ce qui prouve que ce système d'amorçage ne permet pas un très bon contrôle des masses molaires. Les auteurs⁷² expliquent que ces différences peuvent être dues à un fractionnement résultant de la phase de précipitation dans le méthanol, d'autant plus que les indices de polymolécularité relevés sont supérieurs à 2.

La cinétique de polymérisation a été étudiée par Dittrich⁷³ qui a déterminé des ordres unitaires en monomère et en catalyseur sans conclure sur le mécanisme.

c) Les amorceurs à base de zinc

Pour synthétiser du polylactide par ouverture de cycle à partir du lactide, beaucoup d'amorceurs peuvent être utilisés. Cependant, si on destine ces polylactides à des applications biomédicales, des amorceurs non toxiques sont requis. Les catalyseurs les plus répandus, utilisés dans l'industrie, sont l'octoate d'étain et le zinc métal. Le premier est très efficace, mais l'utilisation de l'étain, tout comme celle de l'aluminium, est sujette à caution quand il s'agit de procédés biomédicaux en raison de la toxicité de ces métaux vis-à-vis du métabolisme humain⁷⁴, même si l'étain a été autorisé comme additif alimentaire par la FDA. Cette situation génère une recherche intense d'amorceurs entièrement résorbables, non toxiques. L'idéal serait un catalyseur ou un amorceur qui puisse être métabolisé par le corps humain. L'équipe de Michel Vert est éminemment reconnue pour tous ses travaux sur la synthèse de matériaux bio-dégradables à base de polylactide et directement appliqués à la chirurgie. Beaucoup de ses travaux ont porté sur l'amorçage de la réaction de polymérisation du L-lactide par des dérivés du zinc.

Les sels ou les complexes dérivés du zinc sont très prometteurs de ce point de vue, car le zinc est un oligo-élément qui peut être présent dans le corps humain à des taux élevés⁷⁵ et ses dérivés organiques sont souvent très réactifs. Plusieurs de ces composés ont été testés pour la polymérisation du lactide ces quarante dernières années, mais la plupart d'entre eux ont beaucoup d'inconvénients.

La poudre de zinc est un bon amorceur, facile à manipuler, mais il faut la séparer du polylactide après la polymérisation⁷⁶.

De plus, des résultats récemment publiés montrent que la réaction est complexe et difficilement contrôlable⁷⁷.

En ce qui concerne le diéthyl zinc, il est auto-inflammable à l'air, très réactif et pose des problèmes de contrôle des masses molaires⁷⁸.

Kleine⁷⁹ a utilisé le chlorure de zinc pour amorcer du L- et du D,L-lactide mais son étude ne mentionne ni les valeurs des rendements, ni celles de la viscosité de la solution, ni celles de la masse molaire des polymères obtenus.

Bero a utilisé l'oxyde de zinc et le stéarate de zinc qui ne permettent d'obtenir que des oligomères et entraînent des réactions de racémisation partielle du polylactide, surtout quand ils sont utilisés à des concentrations assez élevées⁷⁸.

Quant à Nijenhuis, il a testé la polymérisation amorcée par du $Zn(DMH)_2$ (le zinc bis(2,2-diméthyl-3,5-heptanedionato-O,O')) à 120°C, en masse. Les résultats qu'il a obtenus semblent

corrects mais le ligand du zinc n'appartient pas au métabolisme humain et sa toxicité est inconnue⁸⁰ (Schéma 15).

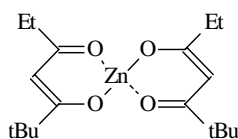


Schéma 15
Zn(DMH)₂

Plus récemment, Kricheldorf⁸¹ a mené une étude comparative de la polymérisation du L-lactide amorcée par divers amorceurs à base de zinc (lactate, glycolate et mandelate de zinc ; chlorure, bromure et iodure de zinc). Les résultats de ces travaux montrent que ce type de polymérisations réalisées, en masse, à 120°C et 150°C, ne permettent d'atteindre que des conversions limitées au bout de temps de polymérisation assez longs (20 à 200 heures).

Cette étude est importante puisque elle concerne des composés jusque là peu étudiés. On peut cependant déplorer qu'il n'y ait pas, en général, de comparaison entre les valeurs expérimentales et théoriques des masses molaires des polymères synthétisés, cette comparaison étant un indicateur intéressant pour juger la qualité d'un amorceur. Ces valeurs ne sont données et discutées que dans le cas d'un amorçage par le lactate de zinc avec des alcools utilisés comme coamorceurs (alcool benzylique, testostérone...). Dans ce cas, en masse à 150°C, Kricheldorf remarque que la polymérisation est mieux contrôlée qu'en l'absence de coamorceur mais les valeurs des masses molaires expérimentales et théoriques restent quand même bien différentes.

d) Les amorceurs à base d'alcoolates de terres rares

L'utilisation des complexes à base d'aluminium, d'étain ou d'autres métaux de transition a permis de limiter certaines réactions secondaires qui diminuent le contrôle de la réaction de polymérisation par ouverture de cycle du lactide. La réactivité des centres actifs correspondants reste néanmoins faible, ce qui a conduit récemment plusieurs groupes de recherche à tester des dérivés de terres rares comme nouveaux systèmes d'amorçage. Ces amorceurs apportent un compromis entre les amorceurs dérivés des métaux et les amorceurs

anioniques ; en effet, leur réactivité est voisine de celle des amorceurs anioniques et leur sélectivité vis à vis des réactions secondaires est proche de celle des dérivés aluminiques. Depuis les dix dernières années, les dérivés de terre rares connaissent ainsi un développement croissant. Les lanthanides sont des éléments du groupe III-b de la classification périodique concernée par le remplissage de la couche 4f. L'yttrium et le scandium sont inclus dans ce groupe, désigné sous le nom de « terres rares », car ils se trouvent dans la même colonne de la classification périodique que le lanthane et présentent donc des propriétés chimiques analogues. On peut classer ces amorceurs en quatre catégories : les halogénures, les acétates, les alcoolates et les lanthanocènes.

Parmi tous les dérivés de terres rares, ce sont en fait les alcoolates qui conduisent aux résultats les plus intéressants. Les propriétés de ces amorceurs sont étroitement liées à la nature des ligands alcoolates qui les composent. La grande différence d'électronégativité entre l'oxygène et le lanthanide induit une forte polarisation de la liaison $M^{\delta+}-O^{\delta-}$ rendant ainsi le métal sensible aux attaques nucléophiles et l'oxygène sensible aux attaques électrophiles. Aussi, ces alcoolates de lanthanides sont sensibles aux agents protoniques, ce qui nécessite des conditions anhydres pour leur manipulation. Pour compenser partiellement la polarité de la liaison $M^{\delta+}-O^{\delta-}$, ces amorceurs ont tendance à s'agréger en espèces dans lesquelles le métal peut atteindre un haut degré de coordination. En fait, les ligands se coordinent aux lanthanides de façon intermoléculaire par l'intermédiaire des oxygènes. Enfin, des phénomènes d'échange rapide entre sites alcoolate ont été mis en évidence et ils sont de deux types : intramoléculaires ou intermoléculaires entre un alcool et le ligand alcoolate.

La première équipe ayant utilisé des alcoolates de terres rares pour polymériser le lactide est celle de Mc Lain^{82,83} en 1991. Ces auteurs montrent que ces amorceurs donnent lieu à des polymérisations plus ou moins contrôlées et permettent d'atteindre une conversion en monomère presque totale en quelques minutes.

Par la suite, plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à ce type de polymérisation^{84,85,86}. Les résultats sont très variables, ils dépendent en particulier de la nature de l'atome de « terres rares » (Y, La,...) et des conditions de polymérisation. Néanmoins, il semble que sous certaines conditions^{87,88}, ce type de polymérisation permet d'obtenir en un temps très court, des poly lactides d'architecture relativement bien contrôlée (polymolécularité faible, réactions secondaires très limitées).

TROISIEME PARTIE : LE POLY(GLUTAMATE DE BENZYLE)

I- Introduction

Nous présentons, dans cette partie, le poly(glutamate de benzyle) qui est le précurseur du poly(acide glutamique). On passe de l'un à l'autre par une déprotection des fonctions acides lors de l'hydrolyse des groupements esters de benzyle.

Le poly(glutamate de benzyle) ou poly(L-glutamate de γ -benzyle) est l'exemple le plus étudié dans la famille des poly(α -acides aminés) qui ont une place particulière au sein des polymères synthétiques. Ces polypeptides sont constitués (Schéma 16) de résidus R d' α -acides aminés liés par des liaisons peptidiques (liaisons amides). On les obtient par polymérisation des acides aminés correspondants (Schéma 17).

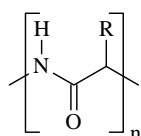


Schéma 16

Motif de répétition d'un polypeptide où
R est le résidu de l'acide aminé

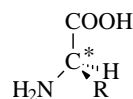


Schéma 17
Acide aminé

Les polypeptides, en tant que polyamides, sont d'un grand intérêt pour le chimiste. Certains d'entre eux peuvent être étirés sous forme de fibres ou de films ou solubilisés dans des solvants polaires ou apolaires. Néanmoins, leur intérêt principal réside dans leur utilisation comme modèle des protéines naturelles, en particulier par l'étude de leurs propriétés physico-chimiques.

II- Synthèse de polypeptides

Les méthodes de synthèse des polypeptides par polycondensation des acides aminés ne sont pas très efficaces et ne permettent pas de synthétiser des polypeptides de masses molaires élevées en raison de réactions secondaires importantes à la température élevée nécessaire pour la réaction (150-200°C)⁸⁹. Une méthode de choix pour obtenir de tels polymères consiste à polymériser des N-CarboxyAnhydrides (NCA). Ce sont des dérivés cycliques des acides

aminés, polymérisables par ouverture de cycle qui donnent les poly(acides aminés) correspondants⁹⁰.

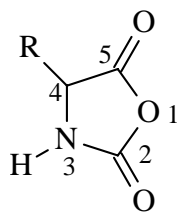


Schéma 18
N-Carboxyanhydride (NCA) ou Anhydride de Leuchs

Les NCA des α -acides aminés ont quatre sites réactifs : deux électrophiles et deux nucléophiles. Cette réactivité multiple, associée à leur capacité à polymériser est la source d'une chimie très complexe. Les deux centres électrophiles sont les carbones C2 et C5, les deux centres nucléophiles sont le carbone C4 et l'azote N3. Les études sur la polymérisation des NCA ont débuté avec les travaux de Wessely⁹¹ et ont duré plusieurs dizaines d'années.

Les difficultés d'étude de cette polymérisation sont non seulement dues à la réactivité multiple des NCA mais aussi à la faible solubilité des polypeptides dans les solvants organiques. En effet la précipitation de la chaîne peptidique en croissance affecte la réactivité des bouts de chaîne et modifie la cinétique de la polymérisation.

III- Mécanisme de polymérisation des N-Carboxyanhydrides

Les NCA peuvent être polymérisés en masse ou en solution. La polymérisation en masse est généralement réalisée à haute température et donne des polypeptides de faible degré de polymérisation. A contrario, la polymérisation en solution peut être réalisée à faible température, elle peut être contrôlée et permet d'obtenir des peptides de masses molaires élevées. Cette dernière technique a ainsi remplacé les méthodes préparatives utilisant la polymérisation en masse. Il est en revanche essentiel d'utiliser des solvants inertes purs (diméthylformamide, dioxane, tétrahydrofurane) pour les polymérisations en solution afin d'obtenir des polymères aux masses molaires élevées et sans impureté. Il est à noter qu'on peut utiliser des solvants tels que l'eau (qui réagit avec les NCA), car la vitesse de polymérisation est bien supérieure à la vitesse d'hydrolyse.

Premier Chapitre : Etude Bibliographique

La polymérisation des NCA dans des solvants inertes ne démarre qu'en présence de l'amorceur. Les réactions mettant en jeu les NCA dépendent beaucoup de la nature de cet amorceur. Il a été montré que ni les radicaux, ni les cations, ni les acides ne peuvent amorcer la polymérisation des NCA. Les 4 principales classes d'amorceurs sont les nucléophiles protiques, les nucléophiles aprotiques, les bases aprotiques, les composés organométalliques. Trois classes de nucléophiles protiques ont largement été utilisées pour amorcer la polymérisation des NCA, il s'agit de l'eau, des amines primaires et des amines secondaires. On compare et classifie les amorceurs de chacune de ces trois catégories selon deux critères : le site d'attaque sur le NCA et la comparaison de la réactivité de l'amorceur par rapport à la réactivité de la chaîne en croissance.

Concernant le premier critère, l'eau, les alcools et les amines primaires attaquent exclusivement l'hétérocycle du NCA sur le C5, alors que pour les amines secondaires, cela dépend de leur rapport nucléophilie/basicité. Ce rapport dépend de la basicité de ces amines mais aussi de l'encombrement stérique de leurs substituants.

Concernant le deuxième critère, l'eau, les alcools et les amines aromatiques sont moins nucléophiles que la chaîne en croissance. L'amorçage est donc plus lent que la propagation et le degré de polymérisation est supérieur au rapport $[M]_0/[A]_0$. Par contre, les amines primaires aliphatiques et les amines secondaires peu encombrées sont plus nucléophiles que la chaîne en croissance, l'amorçage est donc plus rapide que la propagation et le degré de polymérisation se rapproche du rapport $[M]_0/[I]_0$.

1°) Polymérisation amorcée par l'eau

L'eau a été le premier composé utilisé pour amorcer la polymérisation des NCA dans des solvants organiques. L'étape d'amorçage correspond à la décomposition hydrolytique du NCA (Schéma 19). L'étape de propagation (Schéma 20) correspond au mécanisme classique de propagation de la polymérisation des NCA.

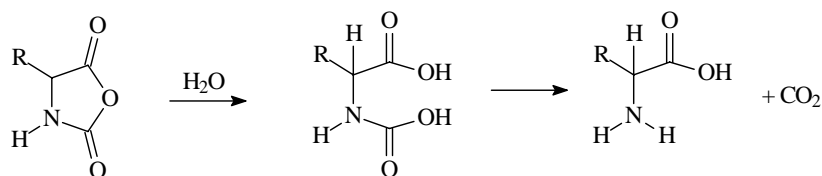


Schéma 19
Décomposition hydrolytique d'un NCA

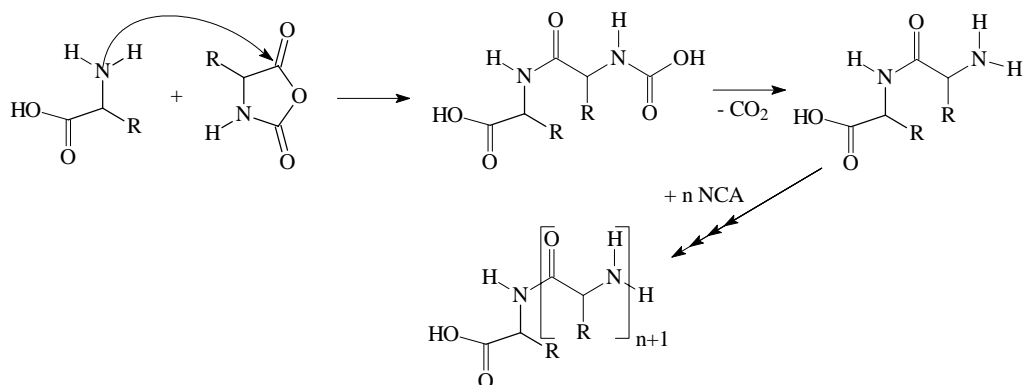


Schéma 20
Etape de propagation de la polymérisation des NCA

2°) Polymérisation amorcée par les amines primaires

La réaction d'une amine primaire sur un NCA (Schéma 21) donne un adduit possédant à son tour une fonction amine primaire susceptible de propager la polymérisation selon le même mécanisme d'attaque nucléophile. Ce mécanisme a été nommé mécanisme « amine » par Wessely, Waley et Watson qui l'ont mis en évidence les premiers^{92,93,94}. Il a été étudié en détail et confirmé récemment par plusieurs auteurs^{95,96,97}.

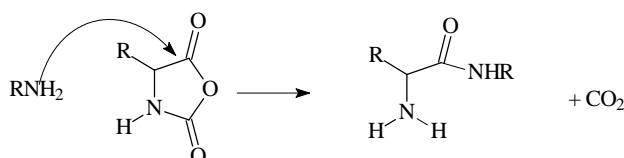


Schéma 21
Amorçage de la polymérisation d'un NCA par une amine primaire

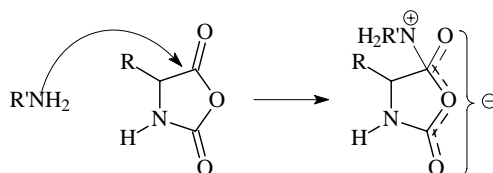


Schéma 22

Zwitterion de résonance formé lors de l'attaque du NCA par une amine primaire

Après examen approfondi des résultats de leurs études cinétiques, Waley et Watson ont envisagé une addition réversible de l'amine sur le C5 du NCA. Quant à l'adduit intermédiaire, il correspond certainement selon ces auteurs au zwitterion de résonance⁹⁸ (Schéma 22).

Cette forme permet en effet d'expliquer la faible entropie d'activation de l'étape d'addition⁹⁹. La décomposition de cet intermédiaire en acide carbamique instable ou en son zwitterion a été démontrée par Bailey¹⁰⁰ qui a isolé et identifié ces composés. Ces derniers se décarboxylent alors rapidement pour donner la forme amide de l'acide aminé (Schéma 23).

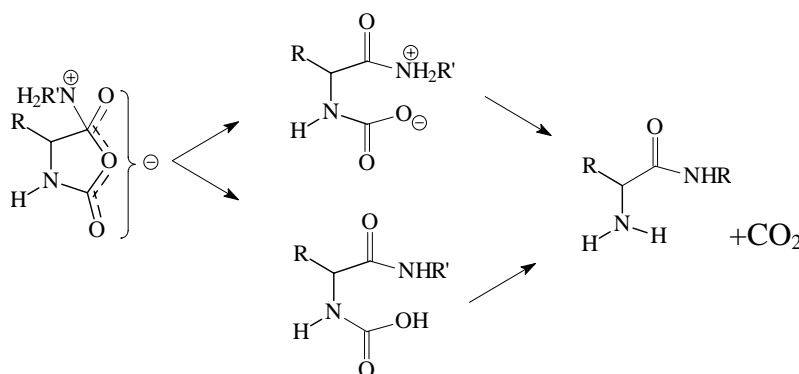


Schéma 23

Décarboxylation du zwitterion

Cette étape de décarboxylation peut être gênée voire empêchée par une partie de l'amorceur n'ayant pas réagi ou par le groupe terminal amine secondaire de la chaîne polymère en croissance. La croissance de la chaîne polymère va alors s'opérer selon le mécanisme carbamate, mis en évidence pour la première fois par Blout et Idelson¹⁰¹ (Schéma 24).

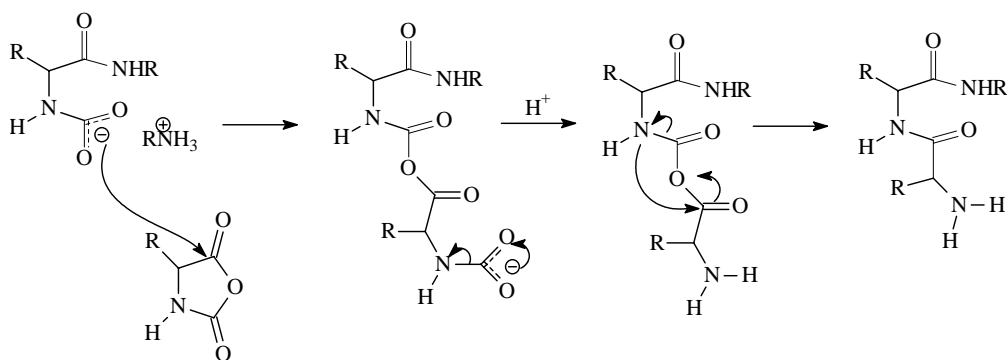


Schéma 24
Mécanisme caramate

La terminaison de la polymérisation des NCA s'effectue lorsque tout le monomère a été consommé et les chaînes peptidiques sont ainsi fonctionnalisées par des groupes amine primaire. Cependant, un autre mode de terminaison peut se produire, en particulier pour les polypeptides de NCA de glutamate de benzyle. C'est Hanby¹⁰² qui a mis en évidence la présence de ce mode de terminaison. La fonction amine terminale vient réagir sur le carbonyle du dernier monomère pour former un hétérocycle stable à 5 atomes, une pyrrolidone (Schéma 25).

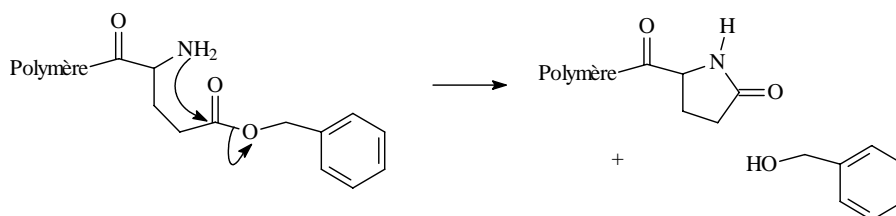


Schéma 25
Terminaison par cyclisation du bout de la chaîne peptidique

Cette réaction peut se produire soit après la fin de la polymérisation (même plusieurs jours après pour un temps de polymérisation de quelques heures) soit pendant la polymérisation, terminant alors la chaîne en croissance et jouant ainsi un rôle négatif sur le contrôle de la polymérisation.

3°) Polymérisation amorcée par les amines secondaires

En fonction de leur rapport nucléophilie/basicité, les amines secondaires peuvent attaquer les NCA selon deux mécanismes différents : le mécanisme amine ou le mécanisme du monomère activé. Ce sont les études expérimentales qui ont permis de classer les amines secondaires en deux catégories :

- Celles dont le rapport Nucléophilie/Basicité est élevé (amines secondaires aliphatiques portant des substituants plus encombrants que les groupements éthyle)
- Celles dont le rapport Nucléophilie/Basicité est faible (amines aromatiques et les amines secondaires aliphatiques aux substituants moins encombrants)

Les amines de cette dernière catégorie vont donc attaquer le cycle NCA sur l'azote N3 en arrachant un proton. Le monomère ainsi activé va alors pouvoir réagir sur un autre NCA pour former un adduit dimère (Schéma 26).

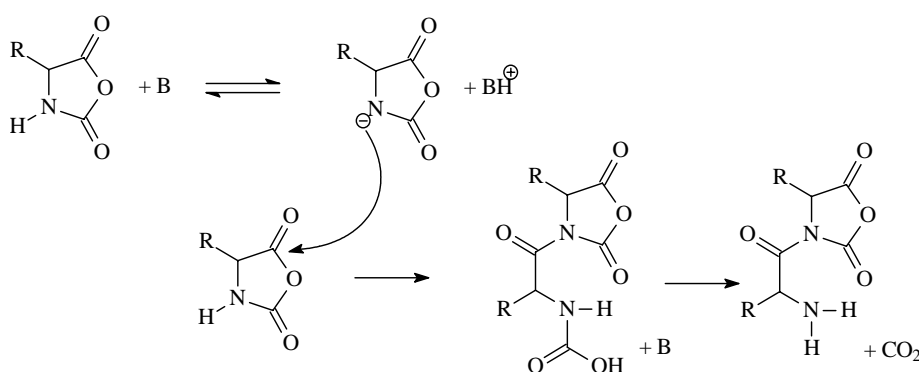


Schéma 26
Mécanisme du monomère activé pour les amines secondaires basiques

Après l'étape d'amorçage du mécanisme du monomère activé, l'étape de propagation peut revêtir trois formes différentes.

En effet, dans un premier cas, la fonction amine primaire du dimère (Schéma 26) peut venir attaquer un NCA en C5 selon le mécanisme « amine » (Schéma 27).

Dans un deuxième cas, c'est un autre monomère activé qui va venir attaquer le monomère activé (toujours en C5) (Schéma 28).

Et enfin, le dimère formé dans le premier cas peut réagir avec un autre dimère pour former directement un tétramère (Schéma 29).

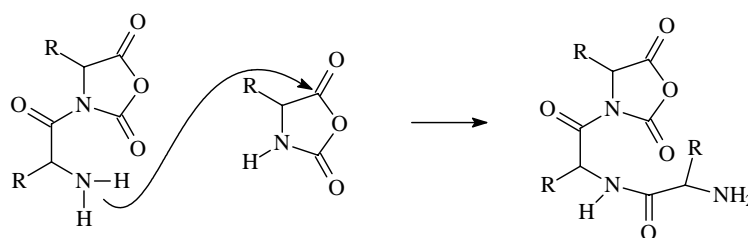


Schéma 27
1^{er} cas de propagation selon le mécanisme du monomère activé

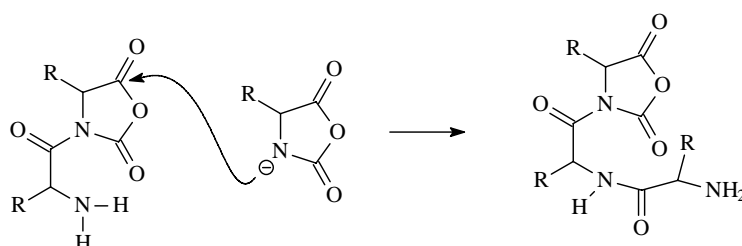


Schéma 28
2^{ème} cas de propagation selon le mécanisme du monomère activé

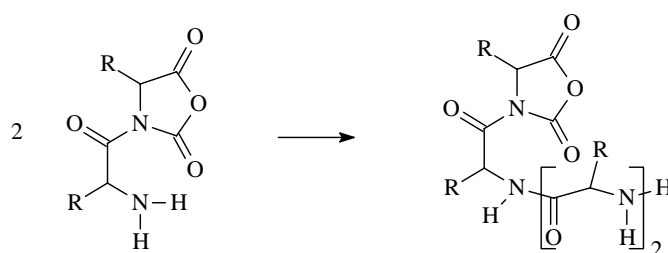


Schéma 29
3^{ème} cas de propagation selon le mécanisme du monomère activé

Bien que l'attaque de l'amino s'effectue dans la majorité des cas sur le C5, l'attaque sur le C2 n'est pas exclue¹⁰³. Quand cette attaque intervient, elle forme un acide α -uréique qui ne peut plus propager la réaction de polymérisation des NCA. Selon Sela¹⁰³, une telle réaction se produit lors de la polymérisation et ne peut en aucun cas se produire à la fin de celle-ci, ce n'est pas un mode de terminaison, mais bien une voie d'addition secondaire.

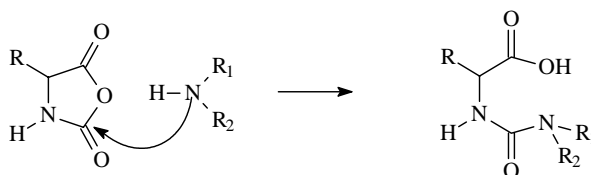


Schéma 30
Mécanisme d'attaque sur le C2

La formation de ce genre de composé dépend de la nature de l'amine¹⁰⁴ et ce phénomène est d'autant plus prononcé que l'amine est basique. De plus, comme cette réaction nécessite une énergie d'activation plus élevée que l'attaque sur le C5, elle est favorisée par les températures élevées de polymérisation.

4°) Polymérisation amorcée par les amines tertiaires

Ce sont Blout et Karlson¹⁰⁵ qui ont montré les premiers l'intérêt des amines tertiaires pour la polymérisation des NCA. Ces amorceurs conduisent en effet à des polymères dont les masses molaires sont plus élevées que celles atteintes avec les autres amorceurs, dans les mêmes conditions. Le mécanisme d'attaque de l'amine tertiaire sur le NCA suit le mécanisme du monomère activé car les amines tertiaires sont peu nucléophiles mais basiques (Schéma 26). Ballard avait d'abord proposé un mécanisme proche du mécanisme amine, mais sa théorie a été infirmée par les résultats de Bamford et Block¹⁰⁶.

5°) Polymérisation amorcée par d'autres types d'amorceurs

Des alcoolates, des carboxylates, des carbamates et des sels comme les sels de fluor peuvent aussi amorcer la polymérisation des NCA. On peut retenir la contribution de Deming¹⁰⁷ qui effectue des polymérisations de NCA à 25°C dans la DMF amorcée par des complexes du nickel, comme le bipyNi(COD) (2,2'-bipyridyl-nickel-1,5-cyclooctadiène). Ce type d'amorceur lui permet de synthétiser des polymères organisés sous forme d'hélice α ou de feuillets β en supprimant les réactions secondaires de terminaison et de transfert. Il est même parvenu à synthétiser des copolymères à blocs poly(glutamate de benzyle)-poly(lysine) par

cette méthode. Son équipe synthétise également des copolypeptides dans le THF avec NaOtBu comme amorceur¹⁰⁸.

Le Tableau 1 résume les différents mécanismes connus de polymérisation des NCA substitués ou non et montre que, pour notre étude, l'amorçage par les amines primaires semble le plus prometteur car il conduit au mécanisme le plus simple et le mieux contrôlé.

Tableau 1

Amorceur	NCA N-non substitués		NCA N-substitués	
	Amorçage	Propagation	Amorçage	Propagation
Amine Primaire	Addition nucléophile	Addition nucléophile de l'amine terminale	Addition nucléophile	Addition nucléophile de l'amine terminale
Amine tertiaire	Monomère activé	Addition nucléophile du NCA activé	Addition nucléophile de l'ion conjugué donneur de proton	Addition nucléophile de l'amine terminale
Amine secondaire	Mécanismes amines I et III concomitant	Id. que pour l'amorçage	Mécanisme amine I	Additions nucléophiles concomitantes de l'amine terminale et du carbamate terminal
Carboxylate	Monomère activé	Addition nucléophile du monomère activé		
Alcoolate	Addition nucléophile (si alcool en grande quantités) Monomère activé (si alcool en faibles quantités)	Addition nucléophile du carbamate ou Addition nucléophile du monomère activé	Addition nucléophile	Addition nucléophile du carbamate
Carbamate	Addition nucléophile (Harwood) Monomère activé (Goodman)	Addition nucléophile du carbamate ou Addition nucléophile du monomère activé		
Sel de fluor,...	Monomère activé	Addition nucléophile du monomère activé et du carbamate concomitantes		

IV- Etude cinétique de la polymérisation du NCA de glutamate de benzyle

La cinétique de polymérisation du NCA de glutamate de benzyle a été étudiée avec une grande variété d'amorceurs, dans un grand nombre de solvants différents. La méthode privilégiée de suivi cinétique de la polymérisation des NCA est la mesure du CO₂ libéré lors de la décarboxylation de la chaîne en croissance¹⁰⁹. Plusieurs types d'amines primaires ou secondaires ont été utilisés pour amorcer la polymérisation des NCA. Leur influence, ainsi que l'effet du solvant et de la température ont été étudiés.

A partir de toutes ces études, deux domaines cinétiques ont été mis en évidence pour la polymérisation des NCA, chacun du premier ordre en monomère et en amorceur¹¹⁰ (Schéma 31). Le premier domaine est caractérisé par une phase de propagation assez lente, alors que dans le deuxième domaine, la croissance de la chaîne s'effectue 4 à 6 fois plus rapidement. Ces cinétiques à deux vitesses ont été observées lors de la polymérisation du NCA de glutamate de benzyle dans des solvants peu polaires tels que le THF, le dioxane, le benzène, le nitrobenzène, ou le dichlorométhane. Dans le DMF, Lundberg et Doty¹¹¹ n'ont trouvé qu'un seul domaine lors du suivi cinétique du même monomère, alors que Nylund et Miller¹¹², lors d'une étude plus approfondie, ont bien mis en évidence les deux domaines aux cinétiques différentes. Ce type de cinétique a été observé pour plusieurs amorceurs pour plusieurs solvants différents. C'est ainsi que Cosani a mis en évidence ce phénomène pour la polymérisation du NCA de glutamate de benzyle amorcée par l'isopropylamine¹¹³ dans le dioxane. Williams est arrivé aussi aux mêmes conclusions mais en utilisant l'hexylamine¹¹⁴.

Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer ce comportement :

- Dans la première, ce comportement peut être relié à un changement de la conformation de la chaîne polymère lors de la polymérisation. La chaîne peptidique passe de la forme 'pelote statistique' à la forme 'hélice α ', conformation stable de la chaîne. Cette transition s'accompagne d'une accélération de la vitesse de polymérisation car le monomère est « adsorbé »¹¹⁷ sur les résidus au bout de la chaîne peptidique en croissance et est ainsi placé dans une position favorable à l'établissement des liaisons amides. Cette hypothèse a été avancée pour la première fois par Doty et Lundberg¹¹⁵.
- La deuxième explication est fondée sur le fait que dans des mauvais solvants du PBLG (les solvants les moins polaires) les NCA s'associent par des liaisons hydrogènes aux résidus d'acides aminés, augmentant ainsi localement la concentration en monomère. Cette

hypothèse, émise pour la première fois par Ballard¹¹⁶ ne nécessite pas la formation de la structure secondaire en hélice α . Il se produit en effet une agrégation des chaînes polymères qui conduit à une séparation de phase et ce, jusqu'à la formation d'un 'gel' physique. Ce phénomène entraîne un accroissement de la vitesse de polymérisation en raison d'une augmentation de la concentration en NCA dans la phase riche en polymère^{116,117}.

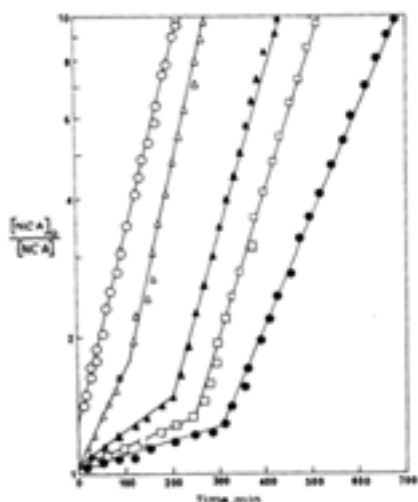


Schéma 31
Polymérisation du NCA de L-glutamate de benzyle amorcée par l'hexylamine dans le dioxane à 25°C, montrant l'accélération de la vitesse de polymérisation à cause de la séparation de phase¹¹⁰

Les preuves expérimentales de l'hypothèse 1 qui avaient été apportées par Idelson et Blout¹¹⁸ ont été remises en cause par Ballard¹²⁰. Ses travaux, ainsi que ceux de Williams¹¹⁴ et d'Elias¹¹⁹ ont clairement apporté la preuve de la véracité de la deuxième hypothèse. Ballard et Bamford avaient ainsi amorcé la polymérisation du NCA de glutamate de benzyle avec un oligopeptide de glutamate de benzyle et montré un effet du degré de polymérisation de la chaîne¹²⁰ (Schéma 32).

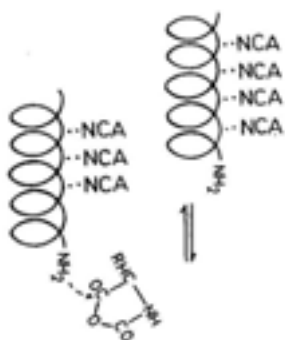


Schéma 32
L'adsorption réversible des NCA sur la chaîne peptidique en croissance augmente localement la concentration en monomère près de la chaîne ainsi l'étape de propagation intermoléculaire se produit plus fréquemment¹²⁰.

- ¹ U.V. Bakar, J. Biomaterials Applications, **1997**, *11*, 377
- ² G. Foster, Harrison's Principles of Internal Medicine, Fauci, Braunwald, Isselbacher (Eds.), **1998**, New-York
- ³ G.P. Carino, E. Mathiowitz, Advanced, Drug Delivery reviews, **1999**, *35*, 249-257
- ⁴ G.M. Pauletti, S. Gangwar, G.T. Knipp, M.M. Nerurka, F.W. Okumu, K. Tamura, T.J. Siahaan, R.T. Borchardt, J. Control. Release, **1996**, *41*, 3-17
- ⁵ R.S. Langer, Science, **1990**, *249*, 1527-1532
- ⁶ J. Heller, Biomaterials, **1980**, *1*, 51-58
- ⁷ R. S. Langer, N. A. Peppas, Biomaterials, **1981**, *2*, 201-214
- ⁸ W.R. Gombotz, D.K. Pettit, Bioconjugate Chem., **1995**, *6*, 332-351
- ⁹ T.M. Chang, J. Bioeng., **1976**, *1*, 25
- ¹⁰ A.K. Kwong, S. Chou, A.M. Sum, M.V. Sefton, M.F.A. Gousen, J. Controlled Release, **1986**, *4*, 47-62
- ¹¹ I. Yamakawi, K.Ogawa, Chem. Pharm. Bull., **1988**, *36*, 2576-2581
- ¹² R. Gref, Y. Minamitake, M.T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer, Science, **1994**, *263*, 1600-1603
- ¹³ K. Kataoka, G.S. Kwon, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, J. Control. Release, **1993**, *24*, 119-132
- ¹⁴ J. Plestil, J. Baldran, Makromol. Chem., **1973**, *174*, 183-191
- ¹⁵ W. Wang, J. Drug Targeting, **1996**, *4*, 195-232
- ¹⁶ H. Bader, H. Rigsdorf, B. Schmitt Angew. Makromol. Chem., **1984**, *123/124*, 457-485
- ¹⁷ C.Jie, K.J. Zhu, Polymer International, **1997**, *42*, 373-379
- ¹⁸ X. Li, Y. Zhang, R. Yan, W. Jia, M. Yuan, X. Deng, Z. Huang, J. Controlled Release, **2000**, *68*, 41-52
- ¹⁹ D.W. Lim, T.G. Park, J. Applied Polymer Science, **2000**, *75*, 1615-1623
- ²⁰ K.Y. Cho, C-H. Kim, J-W. Lee, J-K. Park, Macromol. Rapid. Commun., **1999**, *20*, 598-601
- ²¹ C-S. Cho, S-W. Kim, Makromol. Chem., **1990**, *191*, 981-991
- ²² K. Kugo, A. Ohji, T. Uno, J. Nishino, Polymer J., **1987**, *19*, 375-381
- ²³ S. Cammas, K. Kataoka, Macromol. Chem. Phys., **1995**, *196*, 1899-1905
- ²⁴ G. Kwon, M. Naito, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, Langmuir, **1993**, *9*, 945-949
- ²⁵ G. Kwon, M. Naito, K. Kataoka, M. Yokoyama, Y. Sakurai, T. Okano, Colloids and Surfaces B : Biointerfaces, **1994**, *2*, 429-434
- ²⁶ A. Harada, K. Katoka, Macromolecules, **1998**, *31*, 288-294
- ²⁷ M. Yokoyama, S. Fukushima, R. Ueharo, K. Okamoto, K. Kataoka, Y. Sakurai, T. Okano, J. Controlled Release, **1998**, *50*, 79-92
- ²⁸ J.P. Mc Gee, M. Singh, X.M. Li, H. Diu, D.T. O'Hagan, J. Microencapsulation, **1997**, *14*, 197-210
- ²⁹ C.X. Song, H.F. Sun, X.D. Feng, Polymer J., **1987**, *19*, 485-491
- ³⁰ G.P. Carino, J.S. Jacob, E. Mathiowitz, J. Controlled Release, **2000**, *65*, 261-269
- ³¹ T.J. Deming, Nature, **1997**, *390*, 386-389
- ³² A. Constancis, R. Meyrueix, N. Bryson, S. Huille, J.M. Grosselin, T. Krzywicki, G. Soula, J. Colloid and Interface Science, **1999**, *217*, 357-368
- ³³ M. Gotsche, H. Keul, H. Höcker, Macromol. Chem. Phys., **1995**, *196*, 3891-3903
- ³⁴ F. Rypacek I. Stefko, L. Machova, D. Kubies, J. Brus, Polym. Prep., **1998**, *39*, 126-127
- ³⁵ F. Tasaka, H. Miyazaki, Y. Oya, T. Ouchi, Macromolecules, **1999**, *32*, 6386-6389
- ³⁶ S. Jin, K.E. Gonsalves, Polymer, **1998**, *39*, 5155-5162
- ³⁷ D.A. Barrera, E. Zylstra, P.T. Lansbury, R. Langer, J. Am. Chem. Soc., **1993**, *115*, 11010-11011

- ³⁸ D.A. Barrera, E. Zylstra, P.T. Lansbury, R. Langer, *Macromolecules*, **1995**, 28, 425-432
- ³⁹ J.S. Hrkach, J. Ou, N. Lotan, R. Langer, *Macromolecules*, **1995**, 28, 4736-4739
- ⁴⁰ J. Elisseeff, K. Anseth, R. Langer, J.S. Hrkach, *Macromolecules*, **1997**, 30, 2182-2184
- ⁴¹ G. Caponetti, J.S. Hrkach, B. Krivet, M. Pohl, N. Lotan, P. Colombo, R. Langer, *J. of Pharm. Sciences*, **1999**, 88, 136-141
- ⁴² N.F. Huang, A.J. Easteal, P. M. S. E., **2001**, 84, 1075-1076
- ⁴³ M. Yin, G.L. Baker, *Polym. Prep.*, **1998**, 39, 158-159
- ⁴⁴ M. Vert, S. Li, H. Garreau, *J. Controlled Release*, **1991**, 16, 15-26
- ⁴⁵ M. Ajioka, K. Enomoto, K. Suzuki, A. Yamaguchi, *J. Environ. Polym. Degrad.*, **1995**, 3, 225
- ⁴⁶ H. Cherdron, H. Ohse, F. Korte, *Makromol. Chem.*, **1962**, 56, 179
- ⁴⁷ A. Hofman, R. Szyranski, S. Slomkowski, S. Penczek, *Makromol. Chem.*, **1984**, 185, 655
- ⁴⁸ A. Hofman, S. Slomkowski, S. Penczek, *Makromol. Chem.*, **1987**, 188, 2027
- ⁴⁹ Z. Jedlinsky, W. Walach, *Makromol. Chem.*, **1991**, 192, 2051
- ⁵⁰ S. Sosnowski, S. Slomkowski, S. Penczek, *Makromol. Chem.*, **1991**, 192, 735
- ⁵¹ H.R. Kricheldorf, C. Boettcher, *J. Mater. Science – Pure and Appl. Chem.*, **1993**, A30, 441
- ⁵² H.R. Kricheldorf, A. Serra i Albert, *Polym. Bull.*, **1985**, 14, 497
- ⁵³ K. Ito, Y. Hashizuka, Y. Yamashita, *Macromolecules*, **1977**, 10, 821
- ⁵⁴ Z. Jedlinsky, P. Kurcok, *J. Macromol; Sci. Pure Appl. Chem.* **1995**, A52, 797
- ⁵⁵ Y. Yamashita, *Anionic Polymerization : Kinetics, Mecanism and Synthesis*, Mc Grath Ed., ACS Symposium Series, **1981**, 166-199
- ⁵⁶ H.R. Kricheldorf, I. Kreiser-Saunders, *Makromol. Chem.*, **1990**, 191, 1057
- ⁵⁷ A. Hofman, S. Slomkowski, S. Penczek, *Makromol. Chem.*, **1987**, 188, 2027
- ⁵⁸ H.R. Kricheldorf, C. Boettcher, *Makromol. Chem.*, **1993**, 194, 1665
- ⁵⁹ R.D. Lundberg, F.F. Cox, *Ring Opening Polymerization*, **1969**, 11, Frisch and Reegen Ed., New York
- ⁶⁰ H. Cherdron, H. Ohse, F. Korte, *Makromol. Chem.*, **1962**, 56, 179
- ⁶¹ H.R. Kricheldorf, M. Berl, N. Scharnagl, *Macromolecules*, **1988**, 21, 286
- ⁶² H.R. Kricheldorf, M. Berl, N. Scharnagl, *Macromolecules.*, **1988**, 21, 286
- ⁶³ Ph. Dubois, R. Jerome, Ph. Teyssie, *Makromol. Chem., Macromol. Symp.*, **1991**, 42/43, 103
- ⁶⁴ N. Ropson, Ph. Dubois, R. Jerome, Ph. Teyssie, *Macromolecules*, **1993**, 26, 6378
- ⁶⁵ Ph. Dubois, C. Jacobs, R. Jerome, Ph. Teyssie, *Macromolecules*, **1991**, 24, 2266
- ⁶⁶ C. Jacobs, Ph. Dubois, R. Jerome, Ph. Teyssie, *Macromolecules*, **1991**, 24, 3027
- ⁶⁷ A. Duda, S. Penczek, *Macromolecules*, **1990**, 23, 1636
- ⁶⁸ J. Heushen, R. Jerome, Ph. Teyssié, *Macromolecules*, **1981**, 14, 242
- ⁶⁹ M.B. Bassi, A.B. Padias, H.K. Hall, *Polym. Bull.*, **1990**, 24, 227
- ⁷⁰ A.J. Nijenhuis, D.W. Gripjma, *Macromolecules*, **1992**, 25, 6419
- ⁷¹ Y.J. Du, P.J. Lenstra, A.J. Nijenhuis, H.A.M. Van Aert, C. Bastiaansen, *Macromolecules*, **1995**, 28, 2124
- ⁷² H.R. Kricheldorf, I. Kreiser-Saunders, C. Boettcher, *Polymer*, **1995**, 36, 1253-1259
- ⁷³ W. Dittrich, R.C. Schultz, *Makromol. Chem.*, **1971**, 15, 109
- ⁷⁴ M.C. Tanzi, P. Verderio, M.G. Lampugnani, M. Resnati, E. Dejana, E. Sturani, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **1994**, 5, 393
- ⁷⁵ R.D. Ethel-Browning, *Toxicity of Industrial Metal*, Butterworths, London, **1961**, 44, 313
- ⁷⁶ G. Schwach, J. Coudane, R. Engel, M. Vert, *Polym. Bull.*, **1994**, 29, 617
- ⁷⁷ G. Schwach, J. Coudane, R. Engel, M. Vert, *Polym. International*, **1998**, 46, 177-182
- ⁷⁸ M. Bero, J. Kasperczyk, Z. Jedlinski, *Makromol. Chem.*, **1990**, 191, 2287
- ⁷⁹ J. Kleine, H. Kleine, *Makromol. Chem.*, **1959**, 30,23

- ⁸⁰ A. Nijenhuis, D.W. Grijpma, A.J. Pennings, *Macromolecules*, **1992**, 25, 6419
- ⁸¹ H.R. Kricheldorf, D-O. Damrau, *Macromol. Chem. Phys.*, **1997**, 198, 1753-1766
- ⁸² S.J. Mc Lain, US Patent 5235031, **1993**
- ⁸³ S.J. Mc Lain, N.E. Drysdale, *Polym. Prepr.*, **1992**, 33(2), 463
- ⁸⁴ W.M. Stevels, M.J.K. Ankoné, P.J. Dijkstra, J. Feijen, *Makromol. Chem. Phys.*, **1995**, 196, 1153
- ⁸⁵ W.M. Stevels, M.J.K. Ankoné, P.J. Dijkstra, J. Feijen, *Macromolecules*, **1996**, 26, 6132
- ⁸⁶ W.M. Stevels, M.J.K. Ankoné, P.J. Dijkstra, J. Feijen, *Macromolecules*, **1996**, 29, 3332
- ⁸⁷ M. Save, Polymérisation d'esters cycliques amorcée par un dérivé de terre rare, thèse de l'Université de Bordeaux 1, **2000**, n° d'ordre : 2285
- ⁸⁸ M. Save, A. Soum, *Polymer Preprints*, **2001**, 42, 655
- ⁸⁹ W.H. Carothers, *Chem. Rev.*, **1931**, 8, 353
- ⁹⁰ H. Leuchs, *Deutsch. Chem. Ges.*, **1906**, 39, 857
- ⁹¹ F. Wessely, F. Sigmund, *Z. Physiol. Chem.*, **1925**, 146, 72
- ⁹² F. Wessely, F. Sigmund, *Z. Physiol. Chem.*, **1926**, 159, 102
- ⁹³ F. Wessely, M. John, *Monatsh. Chem.*, **1928**, 50, 439
- ⁹⁴ Waley, *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A*, **1949**, 199, 499
- ⁹⁵ M. Amouyal, B. Coutin, H. Sekiguchi, *J. Macromol. Sci. Chem.*, **1986**, A23, 451
- ⁹⁶ H. Sekiguchi, *Pure and Appl. Chem.*, **1981**, 53, 1689
- ⁹⁷ H.R. Kricheldorf, R. Mülhaupt, *Makromol. Chem.*, **1979**, 180, 1419
- ⁹⁸ G.H. Bamford, H. Block, *Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins*, Wisconsin University Press, **1962**, 65
- ⁹⁹ D.G.H. Ballard, G.H. Bamford, *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A*, **1954**, 223, 495
- ¹⁰⁰ R.H. Bayley, *J. Chem. Soc.*, **1950**, 3461
- ¹⁰¹ M. Idelson, E.R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 2387
- ¹⁰² W.E. Hanby, S.G. Waley, J. Watson, E.J. Ambrose, *J. Chem. Soc.*, **1950**, 3239
- ¹⁰³ M. Sela, A. Berger, *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 1893
- ¹⁰⁴ K.D. Kopple, J.J. Katz, *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 6199
- ¹⁰⁵ E.R. Blout, R.H. Karlson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 941
- ¹⁰⁶ G.H. Bamford, H. Block, A.C.P. Pugh, *J. Chem. Soc.*, **1961**, 2057
- ¹⁰⁷ T.J. Deming, *Nature*, **1997**, 390, 386
- ¹⁰⁸ M. Yu, T.J. Deming, *Polym. Mater. Science and Eng.*, **1998**, 1, 248
- ¹⁰⁹ M. Terbojevitch, A. Cosani, E. Peggion, E. Scoffone, *Biopolymers*, **1971**, 10, 129
- ¹¹⁰ E.R. Blout, A. Asadourian, *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 955
- ¹¹¹ R.D. Lundberg, P. Doty, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 3961
- ¹¹² R.E. Nylund, W.G. Miller, *Biopolymers*, **1964**, 2, 131
- ¹¹³ A. Cosani, E. Peggion, E. Scoffone, A.S. Verdini, *Makromol. Chem.*, **1966**, 97, 113
- ¹¹⁴ F.D. Williams, M. Eshaque, R.D. Brown, *Biopolymers*, **1971**, 10, 753
- ¹¹⁵ P. Doty, R.D. Lundberg, *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 4810
- ¹¹⁶ D.G.H. Ballard, C.H. Bamford, A. Elliott, *Makromol. Chem.*, **1960**, 35, 222
- ¹¹⁷ F.D. Williams, M. Eshaque, R.D. Brown, *Biopolymers*, **1971**, 10, 753
- ¹¹⁸ M. Idelson, E.R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 3948
- ¹¹⁹ M.M.B. El-Sabbah, H.G. Elias, *Makromol. Chem.*, **1981**, 182, 1617
- ¹²⁰ D.G.H. Ballard, C.H. Bamford, *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 1039

Synthèse du Polylactide

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION	46
DEUXIEME PARTIE : SYNTHESE ET CARACTERISATION	47
I- L'amorceur fonctionnalisé	47
II- Le polylactide fonctionnel	50
1°) Synthèse du polylactide à fonction protégée	50
2°) Déprotection des extrémités de chaîne et dosage du Zn résiduel	56
III- Polymérisation du L-lactide amorcée par un alcoolate de lanthane	58
TROISIEME PARTIE : ETUDE CINETIQUE	61
I- Rappels bibliographiques	61
1°) Le lactate de Zn / Zn métal	61
2°) Le zinc tétra-coordiné	63
3°) Le diéthylzinc	64
4°) Conclusion	66
II- Etude cinétique expérimentale de la polymérisation du L-lactide	66
1°) Détermination de la concentration en monomère à l'équilibre	67
2°) Détermination de l'ordre partiel en monomère	68
3°) Ordre partiel en amorceur	70
4°) Vitesse de polymérisation	71
III- Conclusion	72

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION

Etant donné que, pour l'application envisagée, nous souhaitons le meilleur contrôle possible de l'architecture des blocs des copolymères envisagés, nous avons choisi la voie de synthèse utilisant la polymérisation par ouverture de monomères cycliques dans l'ordre suivant :

1. L-lactide pour le bloc polylactide
2. N-carboxyanhydride de l'acide L-glutamique (NCA) pour le bloc poly(acide aminé)

Néanmoins, compte tenu que la polymérisation du L-lactide conduit à un polymère hydroxyfonctionnel et que celle du NCA ne peut être amorcée correctement que par des amines primaires, une étape essentielle de la synthèse des copolymères à blocs est la fonctionnalisation par un groupe NH_2 du bloc polylactide. Parmi les deux méthodes envisageables pour réaliser cette fonctionnalisation (fonctionnalisation par terminaison ou par amorçage), afin d'obtenir le meilleur contrôle de la fonctionnalité, nous avons choisi d'utiliser un amorceur à base de zinc (voir partie bibliographique) fonctionnalisé NH_2 ou, plus précisément, un amorceur fonctionnalisé par un précurseur de NH_2 (Schéma 1). Dans ce deuxième chapitre, nous présentons les travaux réalisés en utilisant ces stratégies qui nous ont conduit à la préparation contrôlée de poly(L-lactide) fonctionnalisé NH_2 .

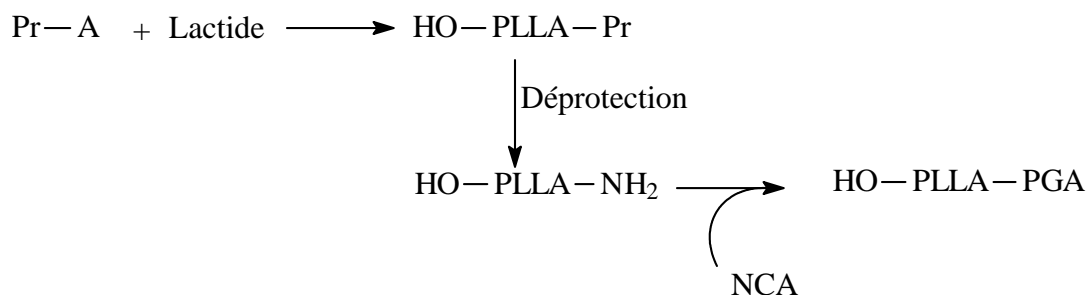


Schéma 1
Schéma de synthèse du copolymère à blocs PLLA-b-PGA

DEUXIEME PARTIE : SYNTHESE ET CARACTERISATION

I- L'amorceur fonctionnalisé

L'amorceur choisi pour la polymérisation du L-lactide va jouer un rôle primordial dans la synthèse des copolymères à blocs, puisqu'il est non seulement l'amorceur du premier bloc (le bloc polylactide) mais aussi le précurseur de l'amorceur du deuxième bloc (le bloc peptidique). Il doit donc porter les fonctions réactives nécessaires à ces deux types d'amorçage et une de ses fonctions (l'amine primaire utilisée ensuite pour l'amorçage de la polymérisation du NCA) doit être protégée lors de la polymérisation du L-lactide pour ne pas induire d'amorçage parasite. L'amorceur retenu est le N-(terbutylcarbamate)propanolate de zinc (Schéma 2) qui permet d'une part, la polymérisation du L-lactide à partir de la fonction alcoolate de zinc et, d'autre part, contient la fonction terbutylcarbamate qui est aisément transformée en fonction amine primaire. Il a d'ailleurs déjà été utilisé par Höcker et coll. pour des synthèses analogues¹.

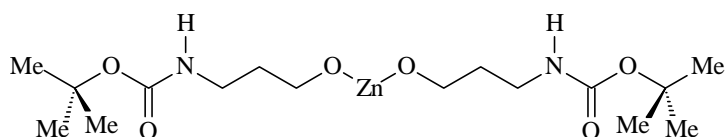


Schéma 2
N-(terbutylcarbamate)propanolate de zinc, amorceur du L-lactide

Cet amorceur est synthétisé en deux étapes (Schéma 3, Schéma 4). La première conduit, à partir d'aminopropanol et de di-terbutyl-dicarbonate, à l'obtention de terbutyl-N-(3-hydroxy)carbamate. Dans la deuxième étape, réalisée juste avant l'emploi (afin de s'affranchir d'une éventuelle désactivation partielle lors de la conservation), ce composé est traité par du diéthylzinc. L'analyse par RMN ¹H et ¹³C des produits [1] et [2] de chacune de ces étapes indique que ces réactions sont totales (aux erreurs expérimentales près) (Figure 1, Figure 2).

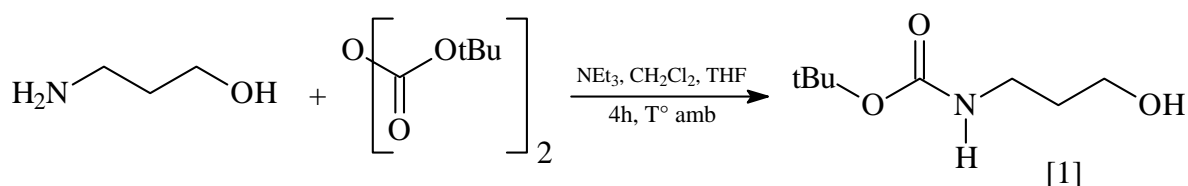


Schéma 3
Synthèse du terbutyl-N-(3-hydroxy)carbamate

Deuxième Chapitre : Synthèse du Bloc Polylactide

Cette réaction s'accompagne d'un dégagement d'éthane qui permet de suivre et de déterminer la fin de la réaction d'addition.

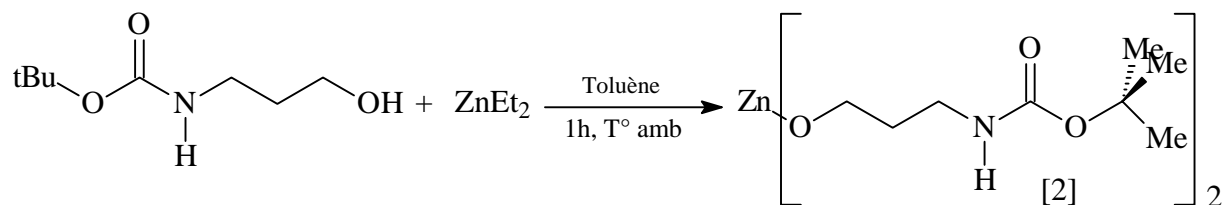
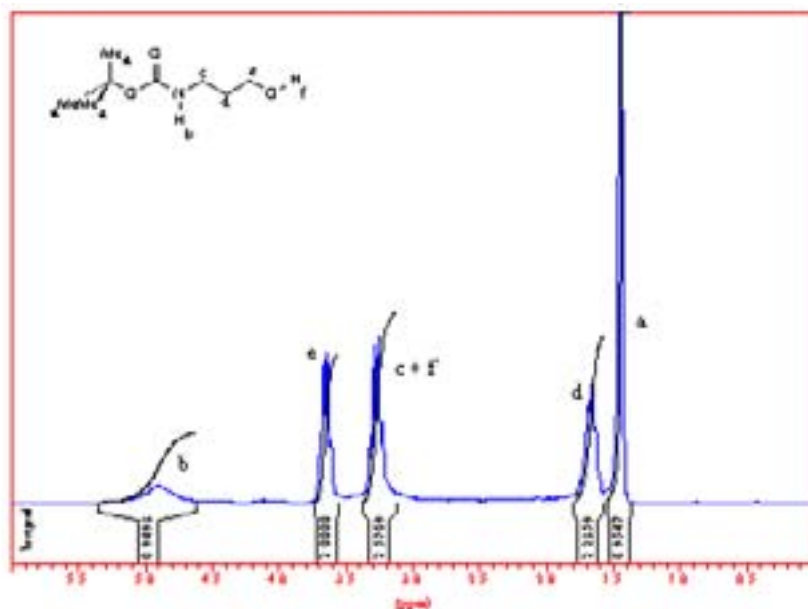


Schéma 4
N-(terbutylcarbamate)propanolate de zinc



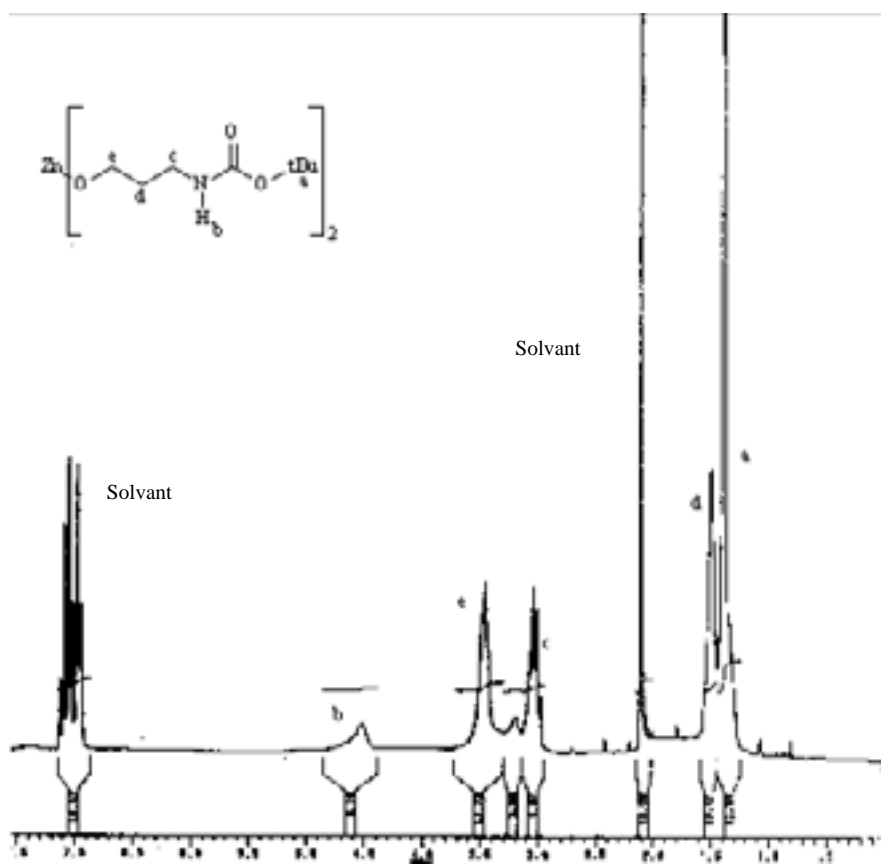


Figure 2
Spectre RMN ^1H du N-(terbutylcarbamate)propanolate de zinc [2] dans le toluène d_8

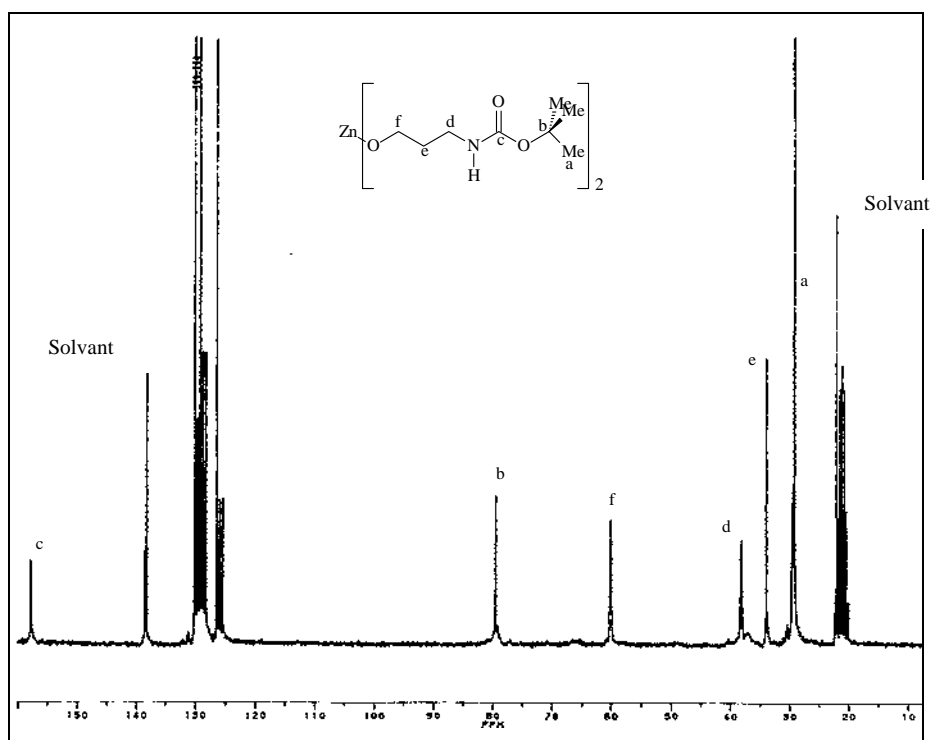


Figure 3
Spectre RMN ^{13}C du N-(terbutylcarbamate)propanolate de zinc [2] dans le toluène d_8

II- Le polylactide fonctionnel

1°) Synthèse du polylactide à fonction protégée

Le polylactide terminé par une fonction amine primaire protégée par un groupement tertbutoxycarbonyle a été synthétisé par polymérisation amorcée par le composé [2] à 80°C, dans le toluène (Schéma 5).

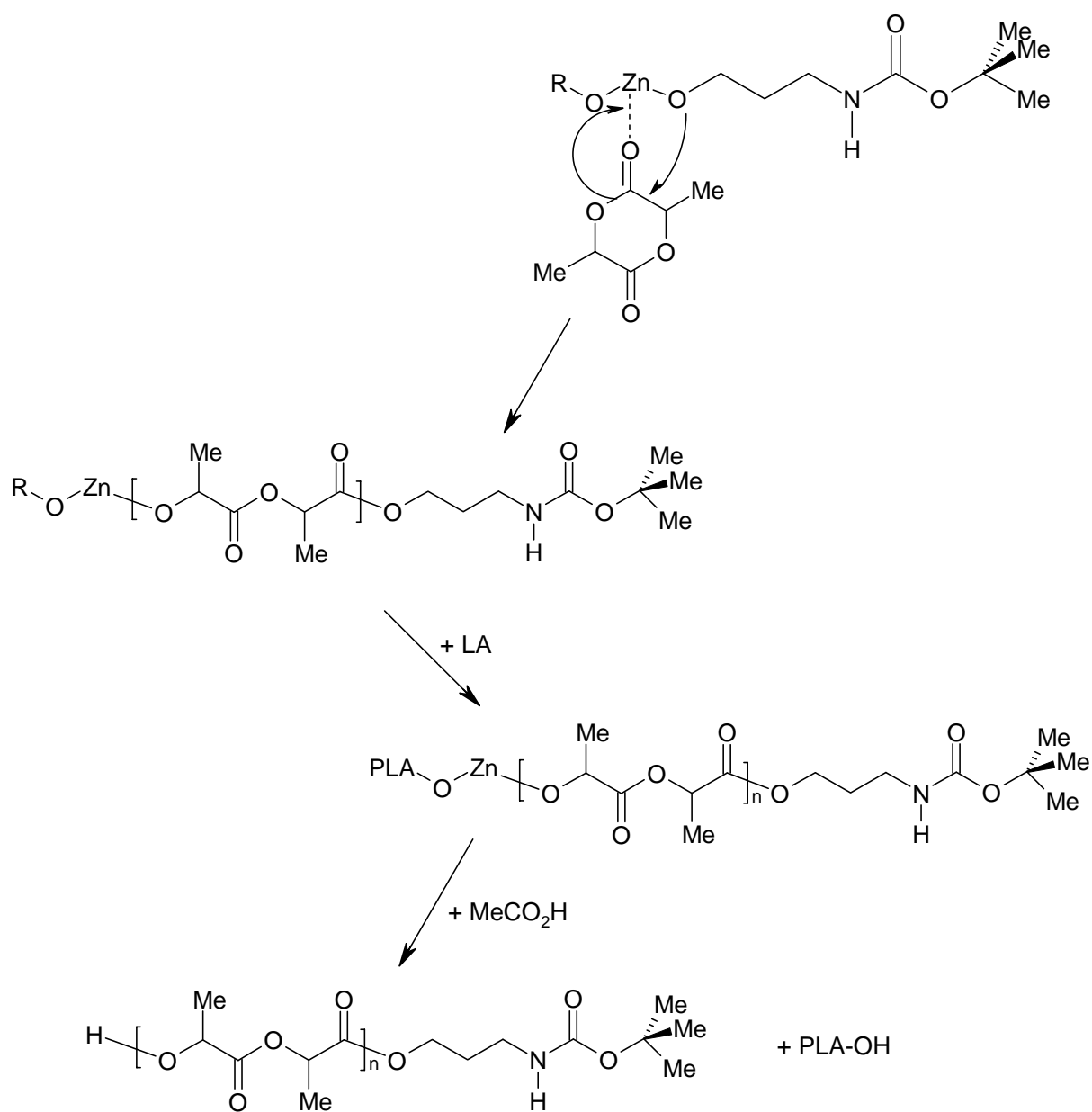


Schéma 5
Mécanisme de synthèse du polylactide

Deuxième Chapitre : Synthèse du Bloc Polylactide

Afin de limiter le taux résiduel de produits secondaires fournis par réactions de rétroscission et de redistribution, la durée de toutes les polymérisations a été fixée à 60 minutes. Cette durée permet d'atteindre des conversions pratiquement totales en monomère et de l'ordre de 80 à 95% (suivant les conditions initiales) en polymère (précipitable dans le méthanol). Compte tenu de l'application envisagée qui nécessite un bloc polylactide relativement court, les conditions initiales de la polymérisation (rapport $[M]_0/[Zn]_0$) ont été choisies pour donner des valeurs comprises entre 1500 et 3000 (soit 20 à 40 unités lactide) (Tableau 1).

Tableau 1

Valeurs des masses molaires des PLA synthétisés avant déprotection

Echantillons	\bar{M}_n exp RMN ^{a)}	\bar{M}_n exp CES ^{b)}	\bar{M}_n exp ^{c)}	\bar{M}_v exp ^{d)}	\bar{M}_n théo ^{e)}	f ^{f)}	I = \bar{M}_w / \bar{M}_n
PLLA 008	2500	2200	2200		2500	0,9	1,6
PLLA 024	2900	2900	2500		3000	1,0	1,6
PLLA 083	3500	3420			3000	1,0	<1,4
PLLA 109	3300	3360			2900	1,0	1,5
PLLA 124	2400	2280		2800	2500	1,0	1,5
PLLA 128	2800	2700		3000	2500	1,0	1,6
PLLA 144	2900	2800			2800	1,0	1,5
PLLA 199	2300	2300			2300	1,0	1,2
PLLA 205	2300	2400			2300	1,0	1,2
PLLA 271	1500	1600			1500	1,0	1,2
PLLA 285	3100	3300			3000	1,0	1,2
PLLA 313	5500	5700			5800	1,0	1,2

a) Valeur déterminée par RMN ¹H : \bar{M}_n = intensité d'un H du groupement méthyle porté par le motif de répétition/intensité d'un H des groupements méthyle du bout de chaîne

b) Valeur déterminée par l'étalonnage avec des échantillons standards de polystyrène, corrigée par le coefficient correcteur proposé par Duda et Penczek² $\bar{M}_n \text{ exp CES} = \bar{M}_n \text{ CES/PS} \cdot 0,58$

c) Valeur déterminée par tonométrie

d) Valeur déterminée par viscosimétrie (cf partie expérimentale)

e) Valeur théorique : $\bar{M}_n = (2 \cdot [L\text{-lactide}]_0 / [N\text{-terbutylcarbamatepropanolate}]_0) \cdot \text{conversion} \cdot 72$

f) Fonctionnalité $f = \bar{M}_n \text{ CES} / \bar{M}_n \text{ RMN}^1\text{H}$

Conditions expérimentales : $[M]_0=0,7\text{mol/L}$, $T=80^\circ\text{C}$, solvant : toluène, durée 1heure

Deuxième Chapitre : Synthèse du Bloc Polylactide

Pour tous les échantillons de polylactide fonctionnalisés préparés, les indices de polymolécularité sont relativement faibles (Figure 4, Tableau 1) (*d'autant plus faibles dès lors que l'on introduit la solution de monomère dans la solution d'amorceur et non l'inverse*) et l'accord entre les valeurs théoriques et expérimentales des masses molaires est relativement bon.

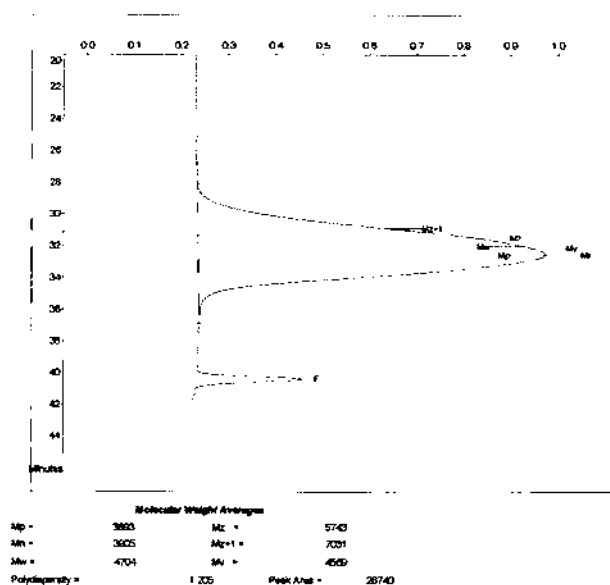


Figure 4
Chromatogramme d'exclusion stérique du PLLA 199 dans le THF – I=1,2

Ceci indique que, avec l'amorceur choisi et donc dans le cas des centres actifs alcoolate de zinc, la phase d'amorçage est très courte (devant la durée de la phase de propagation) et les réactions de redistributions intermoléculaires sont limitées (durant la phase de propagation). En ce qui concerne les redistributions intra-moléculaires qui conduisent généralement à des oligomères cycliques, elles sont également limitées ($\approx 5\%$) et les produits correspondants sont éliminés au cours de la précipitation. Ceci a été confirmé par analyse de spectrométrie de masse MALDI (Figure 5) des résidus solubles de précipitation.

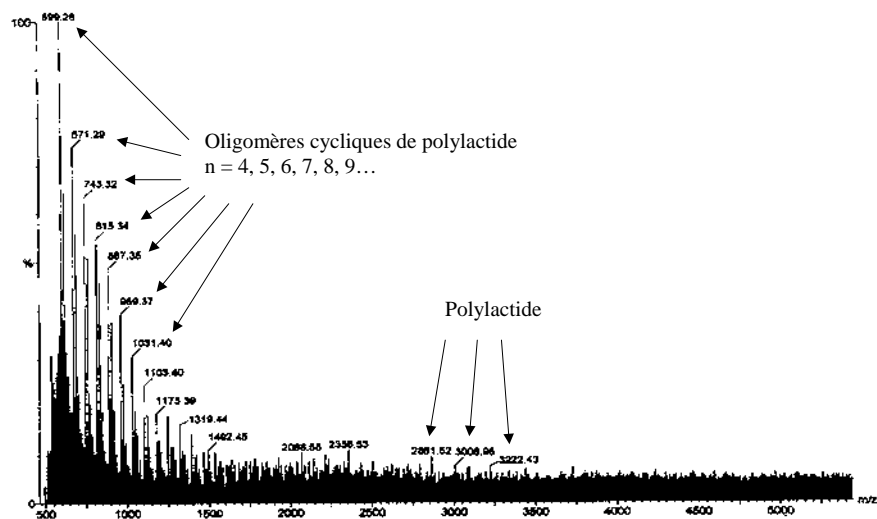


Figure 5
Spectre de masse de type MALDI-TOF du PLLA brut

Les polylactides préparés ont également été analysés par RMN ^1H et ^{13}C ainsi que par spectrométrie de masse MALDI. Ces analyses confirment la structure attendue des polymères, à savoir des enchaînements résultant de l'ouverture de la liaison [OCO] du monomère et la présence aux extrémités de chaîne d'une fonction hydroxy (après désactivation) et d'une fonction tertbutoxy-N-carbamate (Figure 6, Figure 7 et Figure 8).

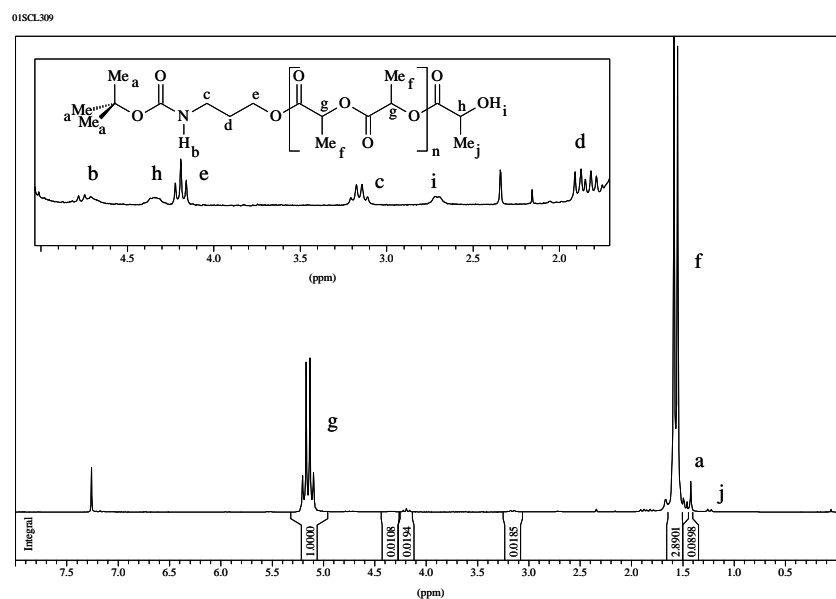


Figure 6
Spectre RMN ^1H du PLLA dans le CDCl_3

Deuxième Chapitre : Synthèse du Bloc Polylactide

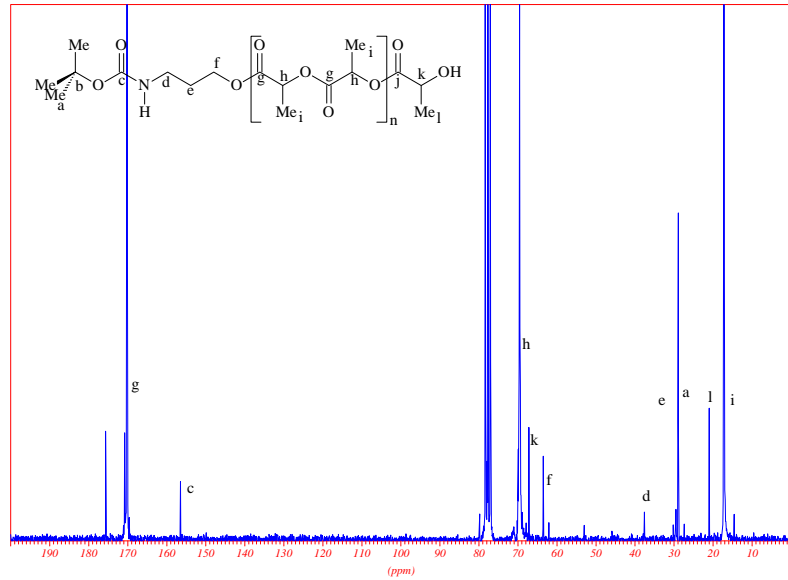


Figure 7
Spectre RMN ^{13}C du PLLA dans le CDCl_3

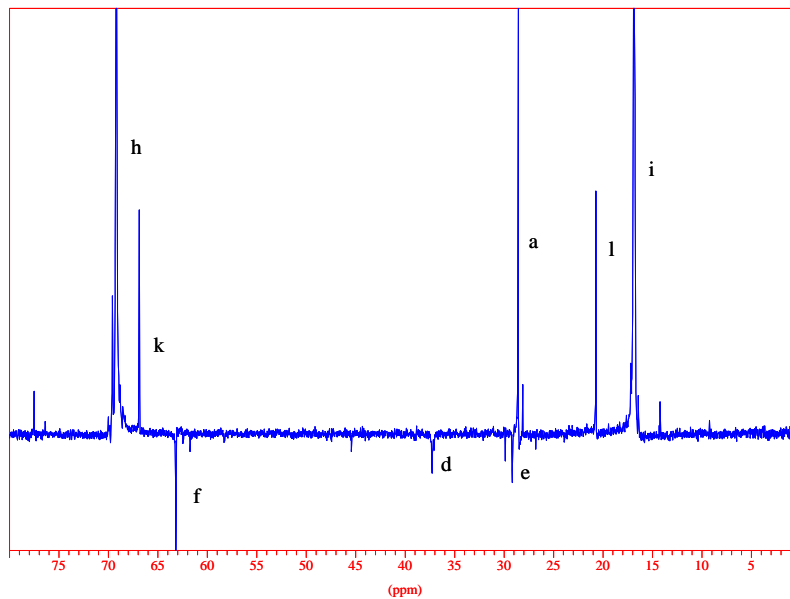


Figure 8
Spectre RMN ^{13}C séquence DEPT du PLLA dans le CDCl_3

Ces analyses ont également permis de déterminer la fonctionnalité des polylactides préparés qui dans tous les cas est proche de 1 (Tableau 1).

Etant donnée la faible réponse en RMN ^1H du groupe hydroxy présent à l'extrémité des chaînes, nous avons également vérifié la structure réelle des extrémités en terminant quelques polymérisations par du chlorophosphate de diphenyle (Schéma 6).

Deuxième Chapitre : Synthèse du Bloc Polylactide

En effet, le produit de cette réaction est différent selon que l'extrémité est un alcoolate (Figure 9a) ou un carboxylate (Figure 9b). L'analyse par RMN ^{31}P des polymères correspondants démontre l'absence d'extrémité carboxylate (Figure 10).

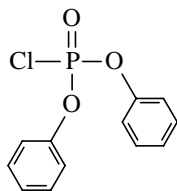


Schéma 6
chlorophosphate de diphenyle

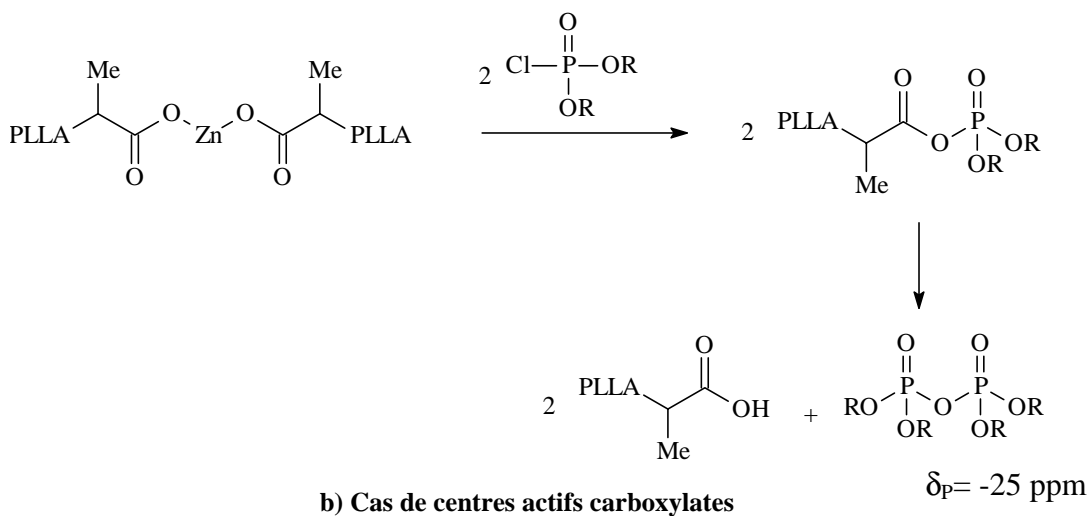
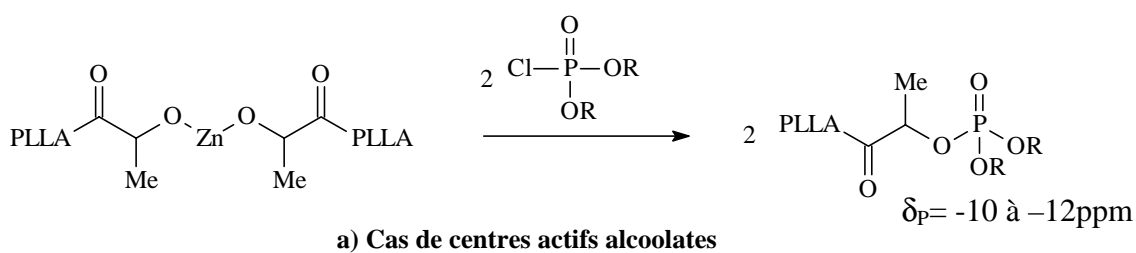


Figure 9
Réaction du chlorophosphate de diphenyle sur le polylactide non désactivé

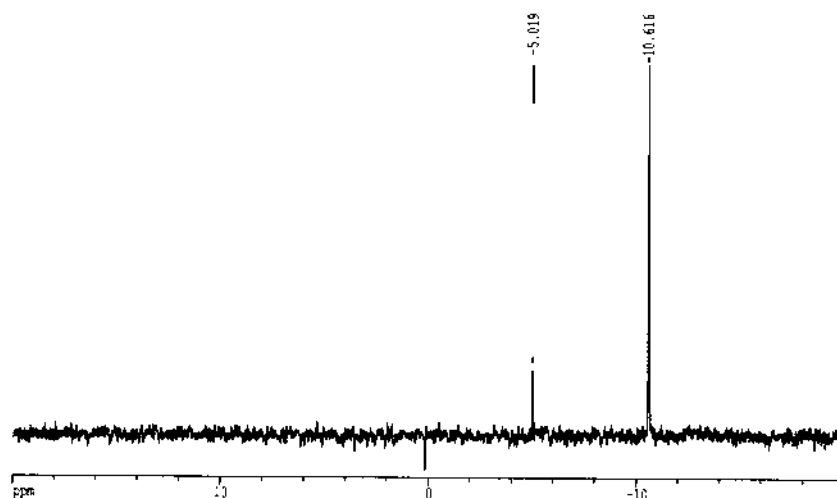


Figure 10
Spectre RMN ^{31}P du PLLA dans le CDCl_3

2°) Déprotection des extrémités de chaîne et dosage du Zn résiduel

La réaction de déprotection de la fonction amine primaire du polylactide a été réalisée par clivage du groupement tertbutylcarbamate par l'acide trifluoroacétique (TFA).

Cette réaction (Schéma 7) nous a permis de déprotéger la totalité des fonctions amine primaire présentes en bout de chaîne des polylactides et d'obtenir ainsi les polymères fonctionnels attendus, sans diminution notable de la masse molaire ni accroissement de l'indice de polymolécularité. Les polymères déprotégés ont été caractérisés par RMN ^1H et ^{13}C et les résultats confirment la fonctionnalisation correcte des extrémités (Figure 11, Figure 12).

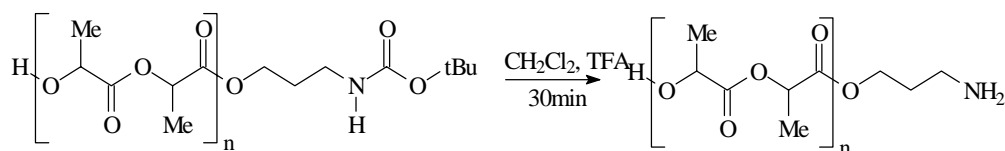


Schéma 7
Déprotection des fonctions amine primaire du PLLA

Deuxième Chapitre : Synthèse du Bloc Polylactide

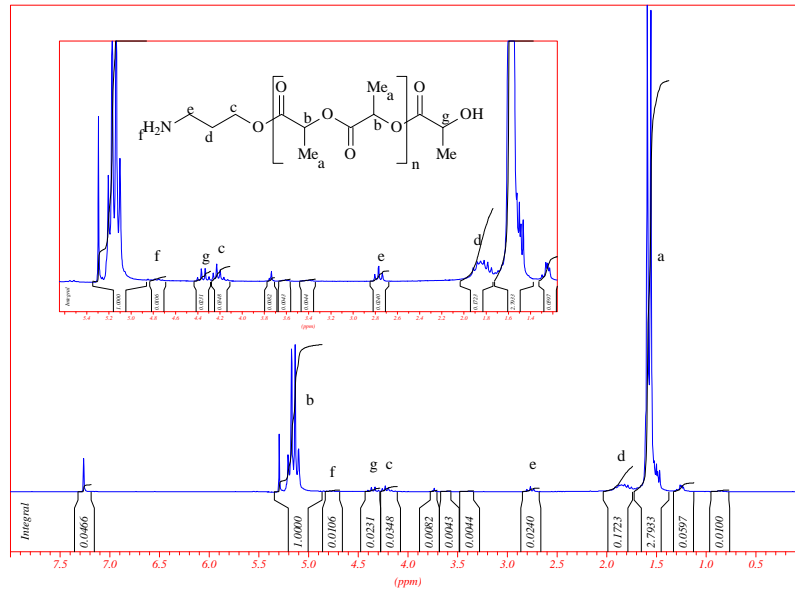


Figure 11
Spectre RMN ^1H du PLLA-NH₂ (PLLA024 après déprotection) dans le CDCl₃

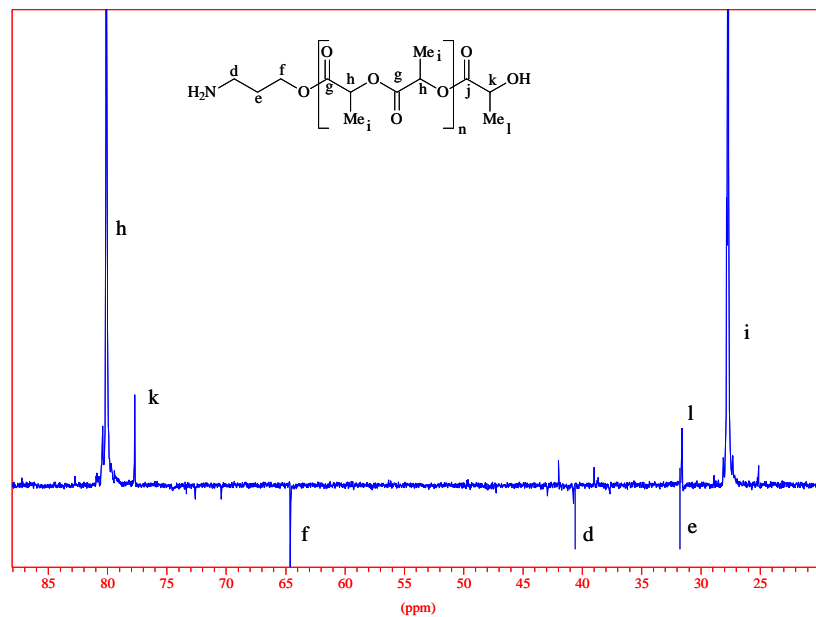


Figure 12
Spectre RMN ^{13}C séquence DEPT du PLLA-NH₂ dans le CDCl₃

Etant donnée l'application envisagée dans le domaine biomédical, la connaissance des taux résiduels de zinc était importante. Dans cet objectif, des dosages du Zn présent dans les polymères après précipitation ont été réalisés. La valeur moyenne obtenue est de **600ppm**, alors que le taux de zinc introduit est de l'ordre de **1%**.

Ce taux est inférieur à ceux mesurés pour des polylactides synthétisés³ qui sont de 5200ppm et 9200ppm.

III- Polymérisation du L-lactide amorcée par un alcoolate de lanthane

Nous montrerons ultérieurement que lors de la synthèse de copolymères greffés (quatrième chapitre), le polylactide utilisé lors de la réaction d'estérification doit être un polymère monohydroxyfonctionnel (Schéma 8).

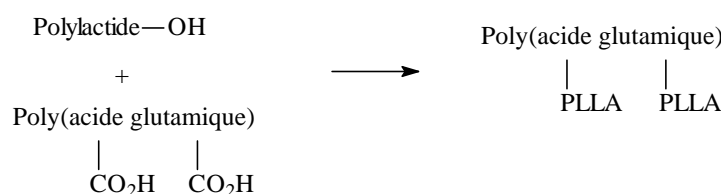


Schéma 8

Schéma de la réaction de couplage conduisant à la synthèse de copolymères PLLA-PGA greffés

La fonction amine n'étant plus nécessaire, nous avons choisi pour la synthèse des polylactides monohydroxytéléchéliques, un autre type d'amorceur qui donne lieu à un très bon contrôle des architectures et à très peu de réactions parasites⁴. Il s'agit du triisopropanolate de lanthane ($\text{La}(\text{OiPr})_3$) (Schéma 9).

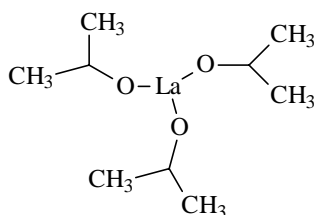


Schéma 9

Triisopropanolate de lanthane

La polymérisation du L-lactide amorcée par $\text{La}(\text{OiPr})_3$ a été réalisée en solution dans le dichlorométhane à température ambiante en une heure (Schéma 10). Pour cette durée, les conversions en monomère sont de l'ordre de 95% et les conversions en polymères de 80 à 90%.

Deuxième Chapitre : Synthèse du Bloc Polylactide

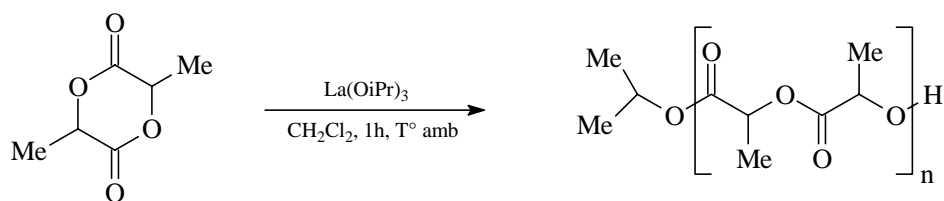


Schéma 10
Polymérisation du L-lactide amorcée par le triisopropanolate de lanthane

Comme l'indiquent les résultats des différentes polymérisations réalisées (Tableau 2) :

- Les valeurs expérimentales et théoriques des masses molaires sont en bon accord (compte tenu de la précision expérimentale)
- Les indices de polymolécularité sont faibles et, en particulier plus faibles que dans le cas des polymérisations amorcées par les dérivés du Zn.
- La fonctionnalité en groupe hydroxy mesurée par RMN est proche de 1 (aux erreurs expérimentales près)

Tableau 2

Valeurs des masses molaires des échantillons de PLLAOH

Echantillons	\bar{M}_n exp RMN ^{a)}	\bar{M}_n exp CES ^{b)}	\bar{M}_n exp ^{c)}	\bar{M}_n théo ^{d)}	I = \bar{M}_w / \bar{M}_n
PLLA 101	2200	2400		3000	1,1
PLLA 108	2400	2400		3000	1,1
PLLA 130	2400	2340		2500	1,1
PLLA 133	3400	3900	3700	3600	1,1
PLLA 155	4900	5100	4300	4600	1,1
PLLA 188	3500	4000		3600	1,1

- a) Valeur déterminée par RMN ¹H : $\bar{M}_n = \text{intensité d'un H du groupement méthyle porté par le motif de répétition} / \text{intensité d'un H du groupement méthyle du bout de chaîne}$
- b) Valeur déterminée par l'étalonnage avec des échantillons standards de polystyrène, corrigée par le coefficient correcteur proposé par Duda et Penczek² $\bar{M}_n \text{ exp CES} = \bar{M}_n \text{ CES/PS} \cdot 0,58$
- c) Valeur déterminée par viscosimétrie (cf annexe)
- d) Valeur théorique : $\bar{M}_n = (2 \cdot [\text{L-lactide}]_0 / (3 \cdot [\text{La(OiPr)}_3]_0)) \cdot \text{conversion} \cdot 72$

Conditions expérimentales : $[M]_0 = 0,7 \text{ mol/L}$, $T = 25^\circ\text{C}$, solvant : dichlorométhane/toluène 50/50 vol/vol, durée 1heure

Deuxième Chapitre : Synthèse du Bloc Polylactide

La structure des polymères préparés analysée par RMN ^1H et ^{13}C est celle attendue compte tenu du mécanisme de ce type de polymérisation qui est connu pour donner lieu (comme pour les dérivés du zinc) à une ouverture de la liaison [O-CO] (Figure 13, Figure 14).

Dans ce cas également, nous avons déterminé le taux résiduel de lanthane qui est égal en moyenne à 420ppm pour un taux initial de 1%.

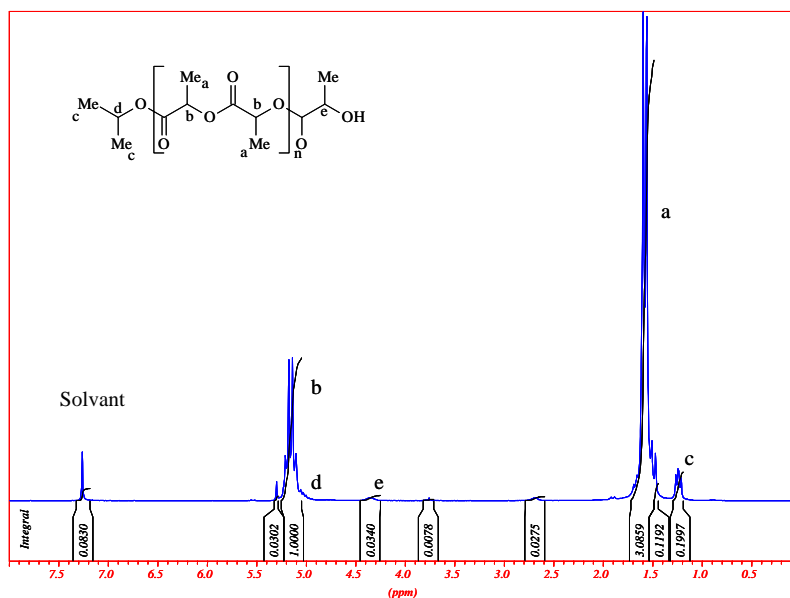


Figure 13
Spectre RMN ^1H dans le CDCl_3 du PLLA synthétisé par polymérisation amorcée par $\text{La}(\text{OiPr})_3$

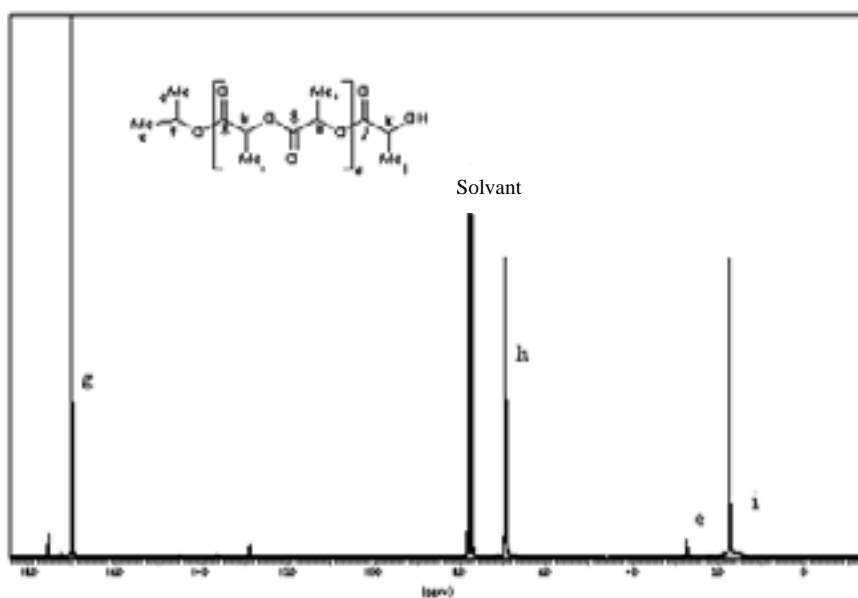


Figure 14
Spectre RMN ^{13}C du L-lactide amorcé par $\text{La}(\text{OiPr})_3$ dans le CDCl_3

TROISIEME PARTIE : ETUDE CINETIQUE

I- Rappels bibliographiques

Comme nous l'avons indiqué dans la première partie de ce document, nous avons choisi d'utiliser un amorceur à base de zinc en raison de la très faible toxicité de cet atome qui est présent sous forme d'ions dans de nombreux métabolismes humains⁵. La littérature n'est cependant pas très riche en articles décrivant l'utilisation du zinc comme amorceur ou les mécanismes et la cinétique des polymérisations correspondantes. La connaissance du mécanisme et de la cinétique d'une réaction est pourtant essentielle pour la maîtrise des structures. C'est pour cette raison que nous avons entrepris une telle étude que nous décrivons dans les paragraphes suivants. Auparavant nous présentons dans ce premier paragraphe, les résultats principaux publiés dans la littérature sur ce sujet.

Les études cinétiques de polymérisations par ouverture de cycle du L-lactide amorcées par un composé à base de zinc sont peu nombreuses. Nous avons retenu quatre de ces études qui utilisent différents amorceurs à base de zinc et nous les avons réunies ci-dessous.

1°) Le lactate de Zn / Zn métal

L'équipe de Vert s'est attachée à étudier la polymérisation en masse du D,L-lactide, à 140°C, amorcée par le zinc métal³. Bien que les rapports initiaux [Monomère]/[Amorceur] soient faibles, les polylactides obtenus présentent des degrés de polymérisation (\overline{DP}_n) élevés. Pour expliquer ces résultats les auteurs introduisent un facteur d'efficacité de l'amorçage : seul un faible pourcentage du zinc métal introduit forme des espèces actives. Ils prouvent que l'espèce active formée est le lactate de zinc (Schéma 11) formé en effet lorsqu'on mélange du lactide, du zinc et des traces d'eau.

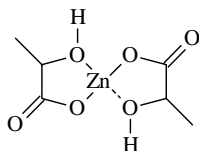


Schéma 11
Lactate de zinc

Une étude comparative des résultats obtenus en utilisant le zinc métal et le lactate de zinc (Tableau 3), conduit les mêmes auteurs à démontrer que le lactate de zinc est un bien meilleur amorceur que le zinc métal, car pour des temps de polymérisation équivalents, le taux de conversion final pour les polymérisations amorcées par le lactate de zinc est bien supérieur à celui atteint pour le zinc métal.

Tableau 3

Caractéristiques des polymérisations amorcées par le lactate de zinc et le zinc métal Erreur ! Signet non défini.

Amorceur	Temps (h)	Conversion % ^a	\overline{M}_n ^b	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$
Zinc métal	2,20	1,3		
	5,05	2,2		
	10,08	3,7		
	21,30	7,7	9500	1,4
Lactate de zinc	1,10	3,8		
	4,20	5,1	2600	1,5
	8,30	24,6	78000	1,6
	11,90	39,2	105000	1,7

^a Déterminé par RMN ¹H

^b Déterminé par CES

Cette hypothèse est confirmée par l'évaluation des constantes de vitesse de polymérisation apparentes (calculées pour des ordres 1 en monomère) qui conduit à $k_{Znlac} = 0,045 \text{ h}^{-1}$ et $k_{Zn} = 0,004 \text{ h}^{-1}$ (Figure 15).

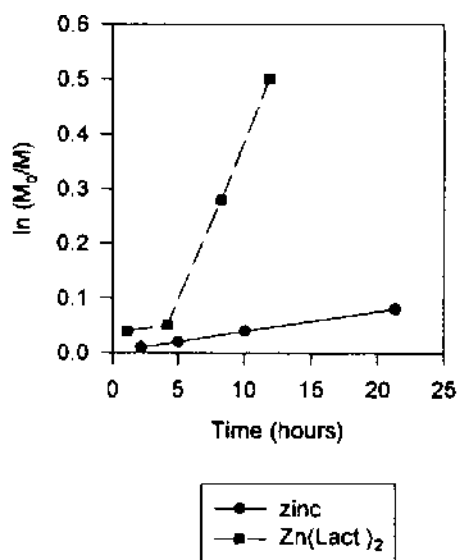


Figure 15
Cinétique de la polymérisation du L-lactide amorcée par le zinc métal ou le lactate de zinc

2°) Le zinc tétra-coordiné

Une autre étude publiée⁶ concerne l'amorçage de la polymérisation par ouverture de cycle du L-lactide par le zinc bis(2,2-diméthyl-3,5-heptanedionato-O,O'), le Zn(DMH)₂ (Schéma 12). Les auteurs réalisent également les polymérisations, en masse, à 110°C avec des rapports initiaux $[M]/[A]=11250$.

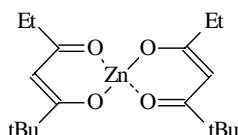


Schéma 12
Zn(DMH)₂

Les résultats cinétiques obtenus avec cet amorceur sont comparés à ceux enregistrés pour un amorceur à base d'octoate d'étain. Ainsi, alors que l'amorçage par le dérivé de l'étain conduit à une polymérisation initialement plus rapide, l'amorçage à base de dérivé du zinc permet d'atteindre des conversions finalement plus élevées (Figure 16). En ce qui concerne l'aspect cinétique, les courbes de variation de $\log [M]_0/[M]$ en fonction du temps ne sont pas linéaires, ce qui laisse supposer que le mécanisme est complexe.

En effet, la pente de la courbe diminue quand la polymérisation devient contrôlée par la diffusion. Or le taux de diffusion dans le cas du zinc est supérieur car le polymère formé est plus cristallin.

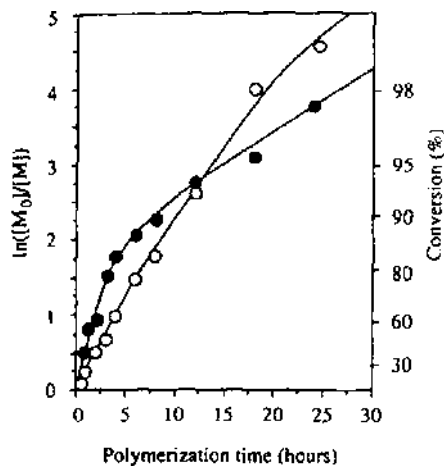


Figure 16
Variations de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps pour la polymérisation du L-lactide amorcée par $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (●) et $\text{Zn}(\text{DMH})_2$ (○)

Ce phénomène semble confirmé par les valeurs des masses molaires des polymères préparés qui sont pratiquement indépendantes de la conversion (Figure 17). Grijpma et coll. expliquent ces observations par l'existence d'une réaction de re-amorçage (transfert), suivi d'une nouvelle phase de propagation.

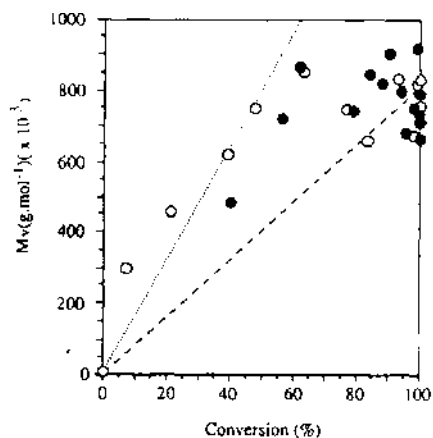


Figure 17
Masse molaire viscosimétrique du PLLA en fonction de la conversion pour $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (●) et $\text{Zn}(\text{DMH})_2$ (○)
3°) Le diéthylzinc

Deuxième Chapitre : Synthèse du Bloc Polylactide

Ce dérivé du zinc a été utilisé par Dittrich et Schultz⁷ comme amorceur pour une étude cinétique de la polymérisation du L-lactide. Les polymérisations ont été réalisées en solution ($[M]_0 = 0,41 \text{ mol/L}$) dans le dioxane entre 25 et 30°C, pendant 12 à 29 heures. Les conversions atteintes sont de l'ordre de 60 - 70%.

Les variations de la courbe $\ln([M]_0/[M])$ avec le temps sont linéaires à faible conversion, et les auteurs en déduisent que l'ordre en monomère est unitaire (Figure 18a)).

En ce qui concerne la constante de vitesse apparente de polymérisation (k_{app}), elle varie en fonction de la concentration en amorceur $[A]_0$, mais le rapport $k_{app}/[A]_0$, calculé à partir des résultats de la Figure 18b), est toujours constant. Ce qui permet de supposer que l'ordre en amorceur est également unitaire. A partir des résultats publiés, la valeur de k_p estimée est $7 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

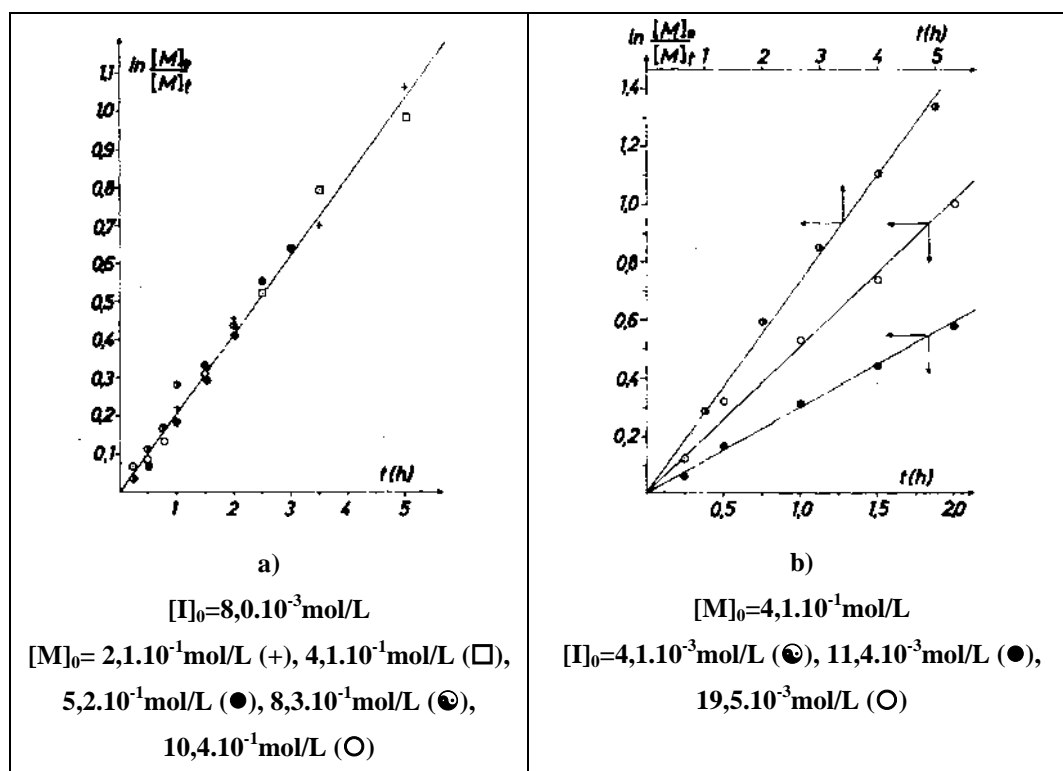


Figure 18

Variations de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps pour la polymérisation du L-lactide amorcée par $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (●) et $\text{Zn}(\text{DMH})_2$ (○)

Néanmoins, malgré la simplicité de la cinétique de polymérisation, les valeurs des masses molaires expérimentales ne correspondent pas aux valeurs théoriques calculées (Tableau 4).

Tableau 4
Comparaison entre les valeurs théoriques et expérimentales des masses molaires des polymères préparés à partir du diéthylzinc⁷

$[A]_0$ (mol/L).10 ³	$[A]_0$ mol %	\overline{M}_w visco	\overline{M}_n théo
19,50	4,7	53090	1500
11,36	2,73	58210	2600
8,76	2,10	62370	3400

4°) Conclusion

Alors que de nombreuses études cinétiques et mécanistiques approfondies ont été publiées sur la polymérisation du lactide amorcée par des dérivés de l'aluminium, de l'étain ou des lanthanides, peu de travaux ont été conduits avec des amorceurs à base de zinc (Tableau 5). En outre, ces quelques études publiées laissent de nombreuses questions sans réponse en ce qui concerne les phénomènes observés. Cette constatation nous a conduit à approfondir l'étude de la polymérisation du L-lactide amorcée par un alcoolate de zinc, en particulier d'un point de vue cinétique.

Tableau 5

Amorceur	Conditions de polymérisation	Température	Constante de vitesse de polymérisation L.mol ⁻¹ .s ⁻¹
Sn(Oct) ₂	Masse	120-150°C	0,25
Zn(DMH) ₂	Masse	110°C	0,1
Al(OiPr) ₃	Solution	70°C	0,01
Et ₂ Zn	Solution	30°C	6,9.10 ⁻³
Zn(lact)	Masse	140°C	8,9.10 ⁻³
Zn métal	Masse	140°C	7,9.10 ⁻⁴
La(OiPr) ₃	Solution	21°C	0,35
Y ₅ O(OiPr) ₁₃	Solution	21°C	28.10 ⁻²

II- Etude cinétique expérimentale de la polymérisation du L-lactide

Deuxième Chapitre : Synthèse du Bloc Polylactide

Pour réaliser cette étude nous avons choisi d'effectuer les polymérisations en solution dans le toluène, à 80°C, mais en utilisant un réacteur permettant l'analyse de la composition du milieu réactionnel au cours du temps, à l'aide d'une sonde infra-rouge immergée dans le mélange.

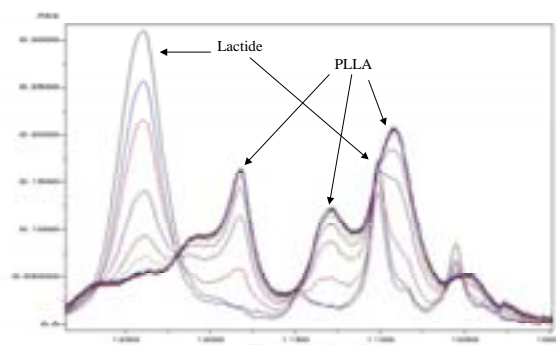


Figure 19
Spectre IR de la polymérisation du L-lactide

Nous avons choisi de suivre la disparition de la bande de vibration de la **liaison C-O** du lactide à **1230cm⁻¹** (Figure 19). A partir de la variation d'absorbance mesurée au cours du temps, nous avons calculé la conversion, en tenant compte de la concentration en monomère à l'équilibre et de l'absorbance résiduelle à l'équilibre (voir § 1°)).

1°) Détermination de la concentration en monomère à l'équilibre

En effet, il est bien connu que comme pour de nombreux monomères cycliques, la polymérisation du lactide est une polymérisation équilibrée. Ceci est effectivement vérifié expérimentalement puisque nous avons indiqué précédemment que dans toutes nos polymérisations la conversion en monomère n'est jamais totale. Afin de pouvoir utiliser la valeur de $[M]_{\text{éq}}$ dans le traitement cinétique, nous avons mesuré la concentration en monomère à l'équilibre dans le milieu réactionnel à partir de la conversion mesurée expérimentalement par RMN ¹H. Les résultats obtenus donnent une valeur de $[M]_{\text{éq}}$ à 80°C égale à 0,014 mol/L. La valeur théorique de cette concentration, calculée à partir des équations de l'annexe 3 et des valeurs de ΔH_p^0 et ΔG_p^0 de la littérature⁸ est de $[M]_{\text{éq}} = \mathbf{0,057 \text{ mol/L}}$. C'est cette valeur que nous utiliserons pour la suite de nos calculs. En fait cette différence semble due à un problème de précision du spectre RMN (Figure 20).

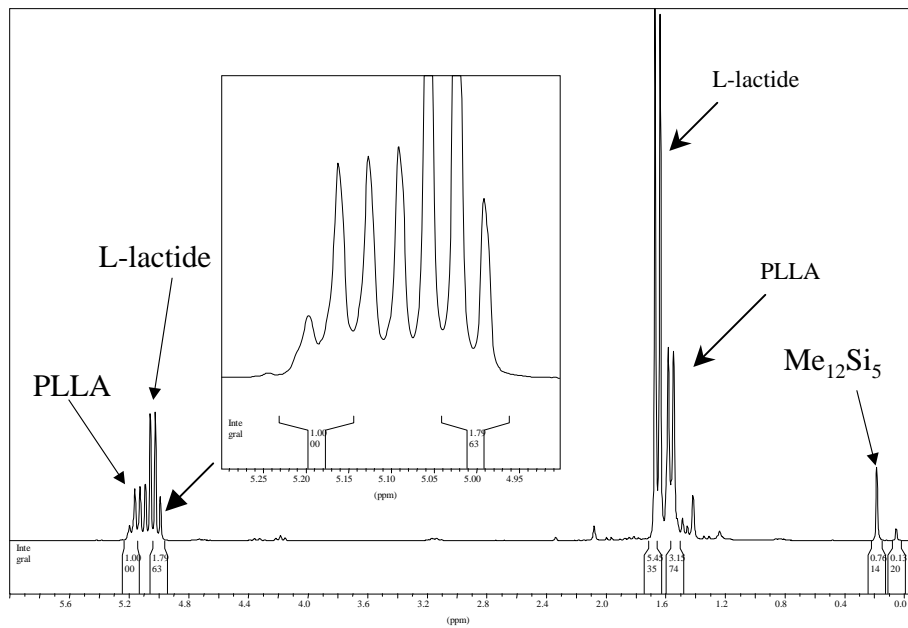


Figure 20
spectre RMN ¹H de l'échantillon du milieu réactionnel après 20minutes de polymérisation

2°) Détermination de l'ordre partiel en monomère

La vitesse de polymérisation initiale s'écrit dans le cas général (équation 1) :

$$V_{p0} = -\frac{d[M]}{dt} = k_p [M]_0^\alpha [A]_0^\beta \quad \text{équation 1}$$

k_p est la constante de vitesse de propagation, α et β sont les ordres partiels en monomère (M) et en amorceur (A). Pour déterminer l'ordre partiel en monomère (α), il suffit d'utiliser la relation logarithmique :

$$\ln(V_{p0}) = \ln k_p + \alpha \ln([M]_0) + \beta \ln([A]_0) \quad \text{équation 2}$$

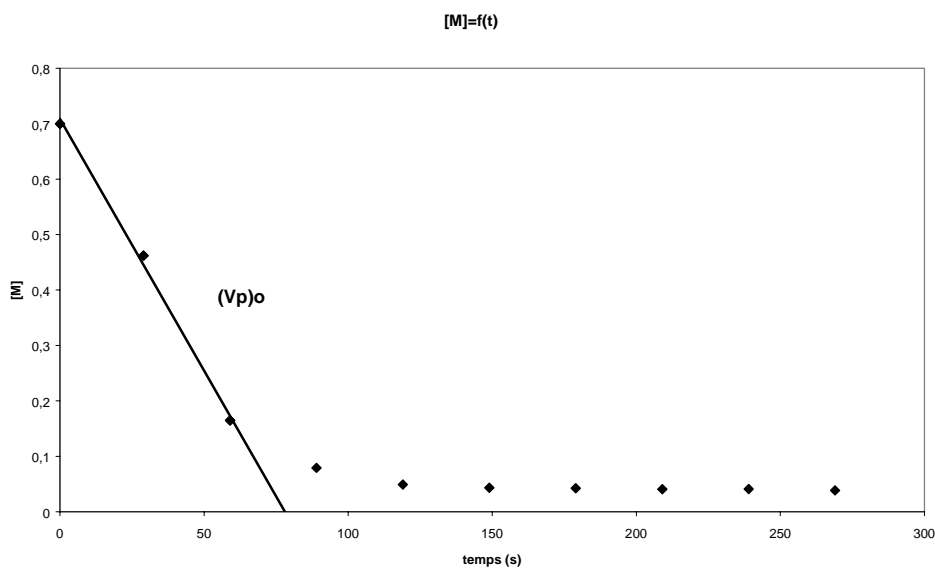


Figure 21
Variation de la concentration en monomère au cours du temps

A partir de la mesure de V_{p0} sur les courbes de variation en fonction du temps de la concentration en monomère (Figure 21, Tableau 6), nous avons déterminé **un ordre en monomère proche de l'unité** aux erreurs expérimentales près (Figure 22).

Tableau 6
Variation de V_{p0} en fonction de $[M]_0$ pour des polymérisations du lactide

$[A]_0$ (mmol/L)	$[M]_0$ (mol/L)	V_{p0} (mmol/L/s)	$\ln([M]_0)$	$\ln(V_{p0})$
15,6	0,7	9,1	-0,356	-4,7
15,6	0,5	5,8	-0,693	-5,15
15,6	1,0	11,8	0	-4,4

Conditions expérimentales : $T=80^\circ\text{C}$, solvant = toluène, durée 1 heure,
amorceur : N-(terbutylcarbamate)propanolate de zinc

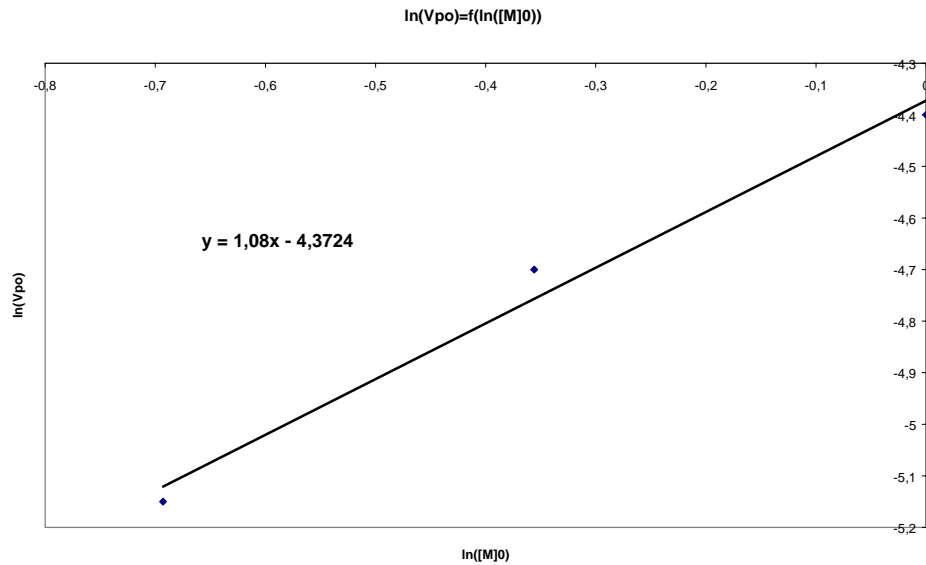


Figure 22
Variation logarithmique de la vitesse initiale de polymérisation V_{P0} avec la concentration en monomère $[M]_0$

3°) Ordre partiel en amorceur

La polymérisation du lactide est une polymérisation équilibrée. La vitesse de polymérisation V_p s'écrit donc :

$$V_p = k_p [P_n^*]^\beta [M] - k_{-p} [P_{n+1}^*]^\beta \quad \text{équation 3}$$

Si les chaînes sont suffisamment longues, on peut considérer que $[P_n^*] \approx [P_{n+1}^*]$ et comme

$$K_{\text{éq}} = \frac{k_p}{k_{-p}} = \frac{[P_{n+1}^*]}{[P_n^*][M_{\text{éq}}]} \approx \frac{1}{[M_{\text{éq}}]}, \quad V_p \text{ s'écrit également :}$$

$$V_p = k_p [P_n^*]^\beta [M] - k_p [M]_{\text{éq}} [P_n^*]^\beta = k_p [P_n^*]^\beta ([M] - [M]_{\text{éq}}) \quad \text{équation 4}$$

Si nous considérons que la concentration en centres actifs est constante pendant la polymérisation et est égale à la concentration initiale en amorceur, cette hypothèse semble raisonnable compte tenu de la linéarité de la courbe $\log([M]_0 - [M]_{\text{éq}}) / ([M] - [M]_{\text{éq}})$ et des relativement faibles polymolécularités des polylactides obtenus, l'équation 4 s'écrit alors :

$$V_p = k_p [A]^\beta ([M] - [M]_{\text{éq}}) \quad \text{équation 5}$$

d'où :

$$V_{p0} = k_p [A]_0^\beta ([M] - [M]_{\text{éq}}) \quad \text{équation 6}$$

L'équation 6 conduit à :

$$\ln \frac{V_{p0}}{[M]_0 - [M]_{\text{éq}}} = \ln k_p + \beta \ln [A]_0 \quad \text{équation 7}$$

expression qui nous permet de calculer l'ordre partiel en amorceur β selon la même méthode que pour l'ordre en monomère (Tableau 7).

Tableau 7
Variation de V_{p0} en fonction de $[A]_0$

$[A]_0$ (mmol/L)	$\ln[A]_0$	$[M]_0 - [M]_{\text{éq}}$ (mol/L)	V_{p0} (mmol/L/s)	$\ln \frac{V_{p0}}{[M]_0 - [M]_{\text{éq}}}$
30	-3,5	0,643	5,5	-4,76
50	-3,0	0,643	10,0	-4,16

Conditions expérimentales : $T=80^\circ\text{C}$, solvant = toluène, durée 1 heure, $[M]_0 = 0,7 \text{ mol/L}$,

amorceur : N-(terbutylcarbamate)propanolate de zinc

Malgré la faible précision de nos mesures, on peut raisonnablement supposer que **l'ordre en amorceur est proche de 1.**

4°) Vitesse de polymérisation

A partir des résultats précédents nous avons évalué la constante de vitesse de polymérisation du L-lactide à 80°C qui est de : $k_p = 1,27 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

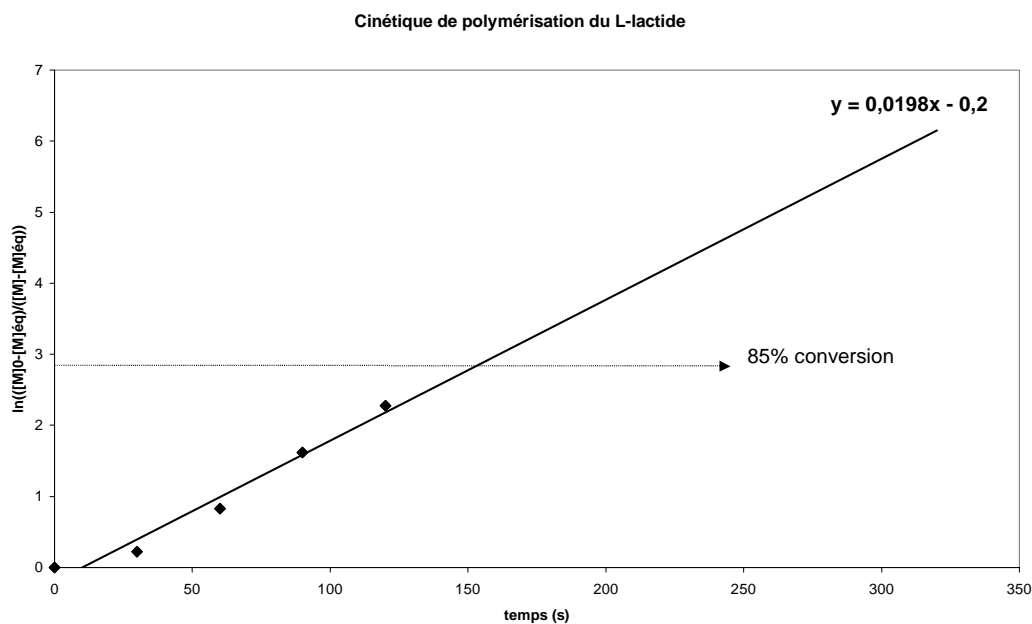


Figure 23

Nous possédons peu de points de mesure pour cette étude cinétique et pour la détermination des ordres partiels en amorceur et monomère. Cette étude n'est pas une étude cinétique complète mais nous avons fait au mieux en tenant compte de la faible disponibilité de l'appareillage et des conditions expérimentales. En ce qui concerne la Figure 23, la courbe ne passe pas par l'origine. Nous ne possédons pas assez d'éléments pour déterminer si cela relève de la présence d'une période d'induction ou d'un artéfact dû à la procédure expérimentale.

III- Conclusion

Ainsi nous avons réussi, comme le montrent les résultats présentés, à synthétiser avec un bon contrôle de la structure, le bloc hydrophobe polylactide qui entre dans la composition des copolymères amphiphiles. Les valeurs expérimentales des masses molaires des polymères synthétisés sont de l'ordre des valeurs théoriques prévues et la fonctionnalité en groupe NH_2 semble très satisfaisante. L'étude cinétique de la méthode de polymérisation utilisée nous a permis d'évaluer les ordres partiels en monomère et en amorceur ainsi que la constante de vitesse de polymérisation. Ces ordres partiels sont unitaires et la constante de vitesse de

Deuxième Chapitre : Synthèse du Bloc Polylactide

polymérisation est supérieure à celles mesurées pour d'autres systèmes (Tableau 5). Dans la suite de ce document nous décrivons maintenant la synthèse du bloc hydrophile, le poly(acide glutamique) et celle des copolymères but ultime de nos travaux.

¹ M. Gotsche, H. Keul, H. Höcker, *Macromol. Chem. Phys.*, **1995**, *196*, 3891

² A. Kowalski, A. Duda, S. Penczek, *Macromolecules* **1998**, *31*, 2114-2122

³ G. Schwach, J. Coudane, R. Engel, M. Vert, *Polym. Int.*, **1998**, *46*, 177-182

⁴ M. Save, A. Soum, *Polymer Preprints*, **2001**, *42*, 655

⁵ M. Vert, F. Chabot, J. Leray, P. Christel, *Makromol. Chem. Suppl.*, **1981**, *5*, 30

⁶ A. Nijenhuis, D.W. Grijpma, A.J. Pennigs, *Macromolecules*, **1992**, *25*, 6419-6424

⁷ W. Dittrich, R.C. Schulz, *Angew. Makrom. Chem.*, **1971**, *15*, 109-126

⁸ M. Save, Polymérisation d'esters cycliques amorcée par un dérivé de terre rare, thèse de l'Université de Bordeaux 1, **2000**, n° d'ordre : 2285

Synthèse du Poly(glutamate de benzyle)

<i>PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION</i>	75
<i>DEUXIEME PARTIE : SYNTHESE ET CARACTERISATION DU POLYGLUTAMATE DE BENZYLE</i>	76
<i>TROISIEME PARTIE : SYNTHESE DU POLY(ACIDE GLUTAMIQUE)</i>	80

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION

L'objectif des travaux présentés dans cette partie était la synthèse et la caractérisation d'homopoly(glutamate de benzyle) (PBLG) qui est un précurseur du poly(acide glutamique) (PGA) utilisé comme bloc hydrophile dans les copolymères (Schéma 1).

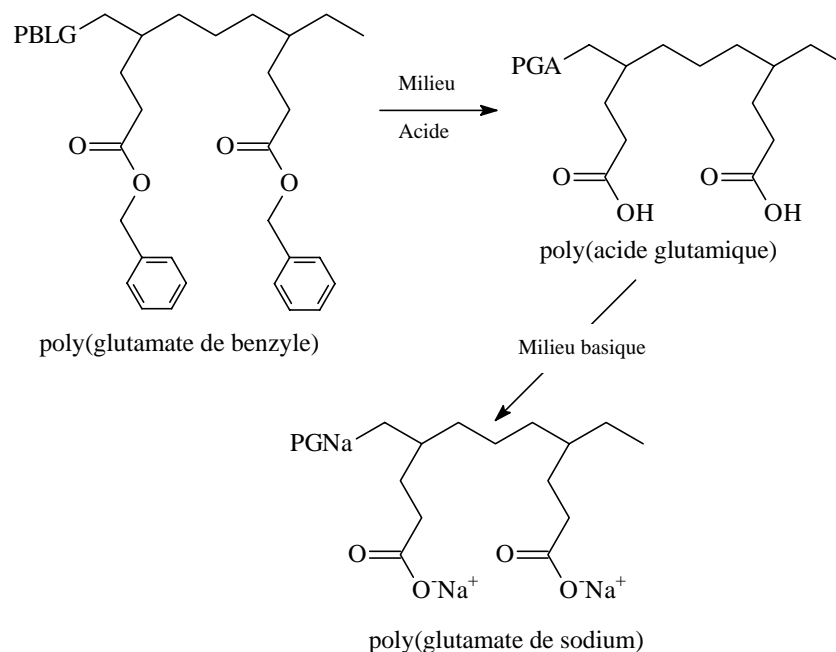


Schéma 1
Transformation du poly(glutamate de benzyle) en polypeptide hydrophile

Nous avons conduit ces travaux afin de mieux connaître et donc de mieux maîtriser le comportement en polymérisation du NCA de glutamate de benzyle (choisi comme monomère) avant son utilisation en polymérisation. Nous avons donc réalisé une série d'homopolymérisations modèles de cet anhydride en utilisant la n-propylamine comme amorceur. Comme nous l'avons détaillé dans le premier chapitre de ce document, l'utilisation de cette amine primaire donne lieu à une polymérisation relativement bien contrôlée selon un mécanisme type « amine ».

DEUXIEME PARTIE : SYNTHESE ET CARACTERISATION DU POLYGLUTAMATE DE BENZYLE

Les polymérisations du NCA de glutamate de benzyle amorcée par PrNH_2 ont été conduites pendant trois heures, à température ambiante, dans du dichlorométhane.

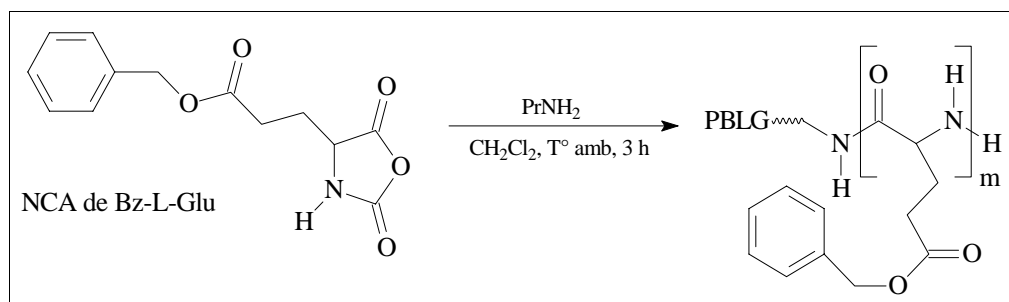


Figure 1
Schéma de polymérisation du NCA de Bz-L-Glu dans le CH_2Cl_2 à température ambiante

Cette durée est inférieure à celle habituellement utilisée¹, qui est de l'ordre de 12 heures. En effet, afin de limiter au maximum les réactions secondaires et, en particulier, la cyclisation spontanée des extrémités de chaîne (Schéma 2), nous avons optimisé la durée des polymérisations en suivant celles-ci par analyse par spectroscopie IR (Figure 3). Cette analyse montre que la conversion est complète après environ 3 heures de polymérisation. Malgré cette durée optimisée, cette réaction n'a pu être totalement évitée et comme l'indique l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 2), une partie des chaînes polymères présentent des extrémités cycliques

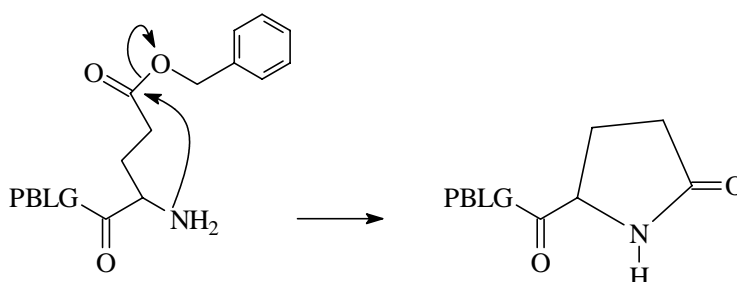


Schéma 2
Réaction secondaire de cyclisation du bout de chaîne du PBLG

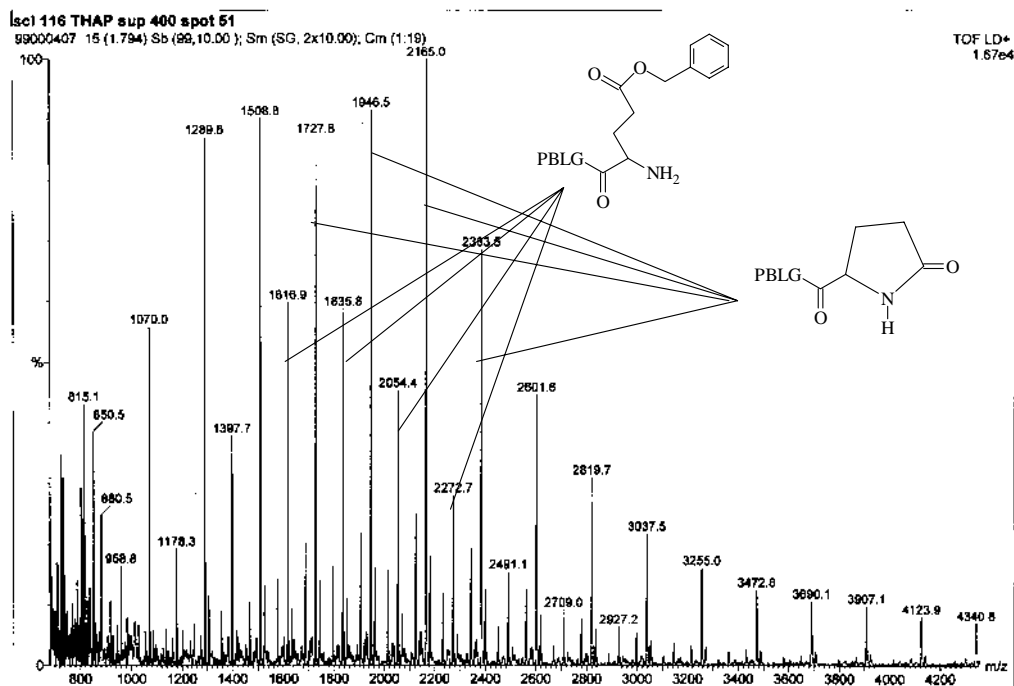


Figure 2
Spectre de masse de type MALDI-TOF du PBLG avec deux bouts de chaîne différents

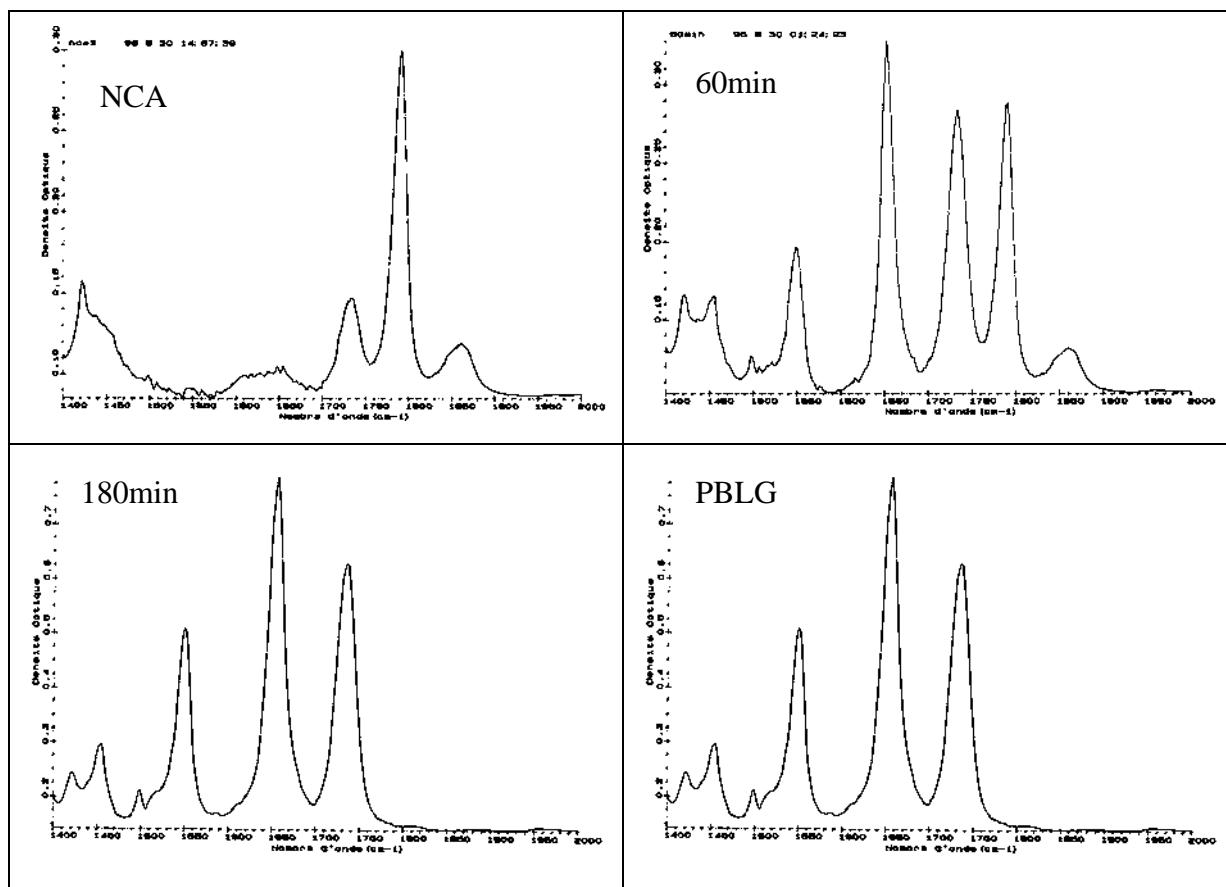


Figure 3
Analyse par spectroscopie IR du milieu de réaction au bout de 60 et 180minutes de polymérisation du
NCA - $[NCA]_0 = 0,7 \text{ mol/L}$, $T = 25^\circ\text{C}$, $[\text{amorceur}]_0 = 0,02 \text{ mol/L}$

Troisième Chapitre : Synthèse du Poly(glutamate de benzyle)

Les différents échantillons de poly(glutamate de benzyle) ont été caractérisés par RMN ^1H et ^{13}C dans le DMSO d_6 et dans le TFA d (le TFA d permet d'obtenir une meilleure définition du spectre RMN car son pouvoir de solvation bien supérieur à celui du DMSO entraîne une rupture pratiquement totale des liaisons hydrogène du PBLG). Ces analyses montrent que la structure du PBLG (Figure 4, Figure 5) est celle attendue, elles permettent également le calcul de la masse molaire expérimentale des échantillons de PBLG (Tableau 1).

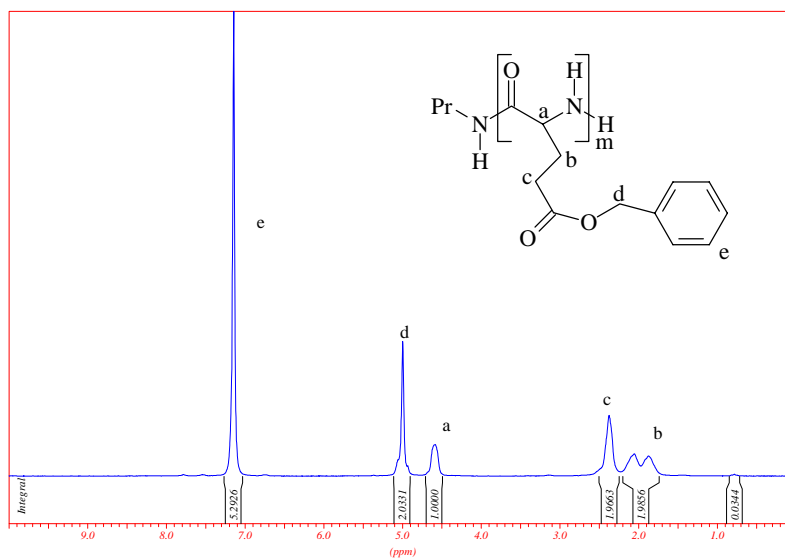


Figure 4
Spectre RMN ^1H du PBLG dans le TFA d

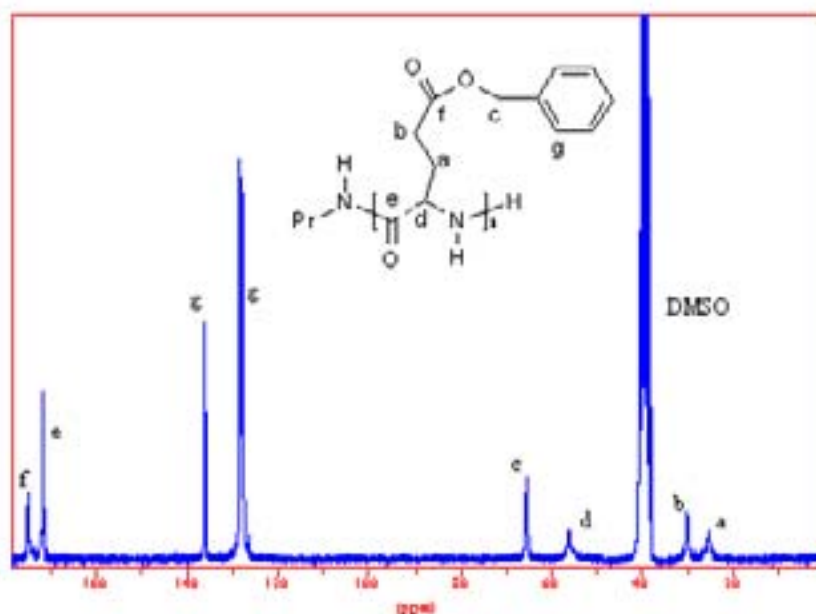


Figure 5
Spectre RMN ^{13}C du PBLG dans le CDCl_3 avec du TFA

Troisième Chapitre : Synthèse du Poly(glutamate de benzyle)

Malgré la difficulté de trouver un bon solvant du PBLG, nous avons tenté de confirmer les valeurs expérimentales déterminées à partir de la RMN ^1H par analyse CES dans le DMF (Tableau 1). La précision des résultats est assez variable et ceux-ci sont peu exploitables.

Tableau 1

Analyse des valeurs expérimentales et théoriques des masses molaires des échantillons de PBLG

Echantillons	\overline{M}_n exp RMN ^{a)}	\overline{M}_n exp CES ^{b)}	\overline{M}_n théo ^{c)}	I = $\overline{M}_w / \overline{M}_n$
PBLG 086	4700		8000	1,6
PBLG 115	3500		3500	1,6
PBLG 116	7700		8500	1,3
PBLG 117	3600		3900	1,5
PBLG 154	9000	3400	8900	1,5
PBLG 159	5300	5200	5000	1,6
PBLG 176	1000		1100	1,5
PBLG 181	1700		1700	1,2

a) Valeur déterminée par RMN ^1H : $\overline{M}_n = \text{intensité un H monomère} / \text{intensité un H bout de chaîne}$

b) Valeur déterminée par l'étalonnage avec des échantillons standards de polystyrène, éluant DMF

c) Valeur théorique : $\overline{M}_n = ([\text{NCA}]_0 / [\text{propylamine}]_0) \cdot \text{conversion} \cdot 219$

Conditions expérimentales : $[\text{M}]_0 = 0,76 \text{ mol/L}$, $T = 25^\circ\text{C}$, solvant : dichlorométhane, durée 3 heures

TROISIEME PARTIE : SYNTHESE DU POLY(ACIDE GLUTAMIQUE)

Dans cette dernière partie, nous présentons les résultats que nous avons obtenus lors de la déprotection des fonctions acide du poly(acide glutamique) ainsi que ceux relatifs à la transformation de ces fonctions en groupes carboxylate de sodium qui permettent une bonne solubilité en milieu aqueux des polyamides.

Ce type de réaction a été déjà étudié dans la littérature mais principalement dans le cas des homopolymères poly(glutamate de benzyle). Dans le cadre de cette étude, compte tenu que les modifications chimiques réalisées sur l'homopoly(glutamate de benzyle) devront être ensuite employées sur des copolymères poly(lactide-co-glutamate de benzyle) nous devons mettre au point un procédé de déprotection dans des conditions suffisamment douces pour ne pas affecter le polylactide. La plupart des réactions décrites dans la littérature font intervenir des acides très forts tels que HBr et utilisent des procédés pour la déprotection de fonctions acide de molécules organiques, procédés qui ne sont pas toujours extrapolables à des macromolécules. Nous avons donc testé et optimisé dans nos conditions, plusieurs types de réactions de déprotection, en particulier l'hydrogénation de l'ester benzylique ou le clivage par un acide.

L'hydrogénation du groupe ester par H₂ n'a pas donné les résultats décrits dans la littérature qu'elle soit catalysée par le palladium supporté sur charbon actif (Pd/C 10%)^{2, 3, 4, 5, 6} ou par l'acétate de palladium⁷. L'hydrogénation par transfert (utilisant le cyclohexadiène 1,3 et catalysée par le Pd/C 10%), n'a permis de réaliser que 30% de déprotection^{8,9}.

L'action de AlCl₃ s'est révélé inefficace¹⁰ alors que la réaction avec HBr a donné 100% de déprotection^{11, 12, 13} de même que celle réalisée avec l'acide (méthane)sulfonique et l'anisole. La réaction utilisant HBr n'a pas été retenue car le polylactide ne résiste pas aux conditions réactionnelles et subit une dépolymérisation totale (on ne retrouve en fin de réaction que de l'acide lactique dans le milieu réactionnel). Par contre, le polylactide ne semble pas affecté par l'acide (méthane)sulfonique et c'est donc cette voie qui a été retenue (nous avons en effet réalisé une réaction témoin pour laquelle seul le polylactide est mis en présence des réactifs de déprotection, et ce dans les mêmes conditions que la réaction de déprotection nominale ; la masse molaire du polylactide est inchangée, de même que son indice de polymolécularité).

Troisième Chapitre : Synthèse du Poly(glutamate de benzyle)

Cette synthèse a été réalisée à 10°C par réaction du PBLG avec de l'acide trifluoroacétique et de l'acide (méthane)sulfonique en présence d'anisole^{14, 15, 16}. Il est vraisemblable que l'acide trifluoroacétique solubilise le polypeptide en rompant ses liaisons hydrogène et que l'acide (méthane)sulfonique protone la fonction ester. Le groupement « partant » benzylique vient alors se fixer sur le cycle aromatique de l'anisole, selon un mécanisme de substitution électrophile (Schéma 3).

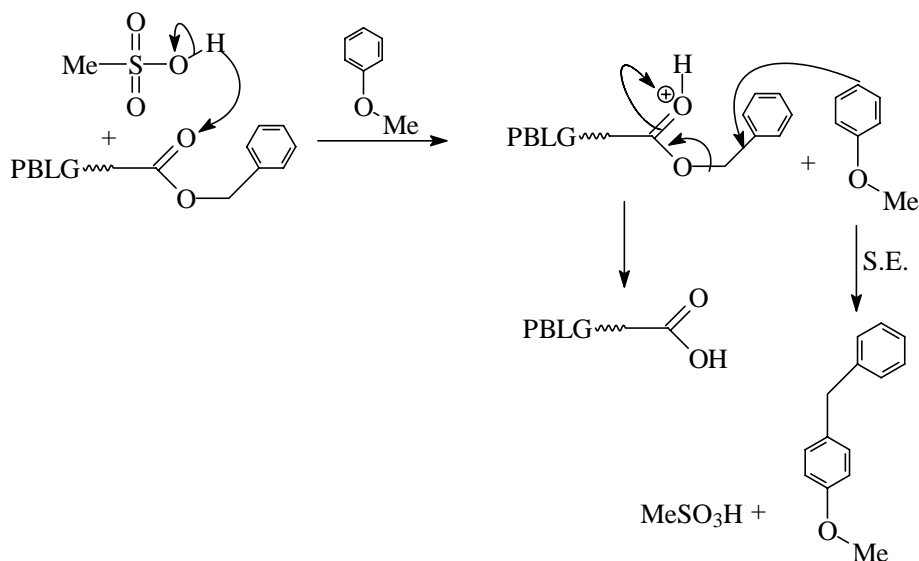


Schéma 3
Mécanisme de déprotection des fonctions acide du PBLG par l'acide méthane sulfonique

La réaction de déprotection suivie par analyse RMN ¹H (Figure 6) est totale dans les conditions utilisées. Le PGA déprotégé est ensuite purifié par précipitation dans de l'éther diéthylique (celui-ci est miscible aux solvants de réaction et solvant du phényl-méthoxyphényl-méthane synthétisé).

Le PGA déprotégé a été caractérisé par RMN ¹H et ¹³C. En ce qui concerne l'analyse par CES, compte tenu de la mauvaise solubilité du PGA dans le DMF les résultats sont inexploitable (l'analyse indique la présence de particules de valeur de masse molaire supérieure à 10⁶g/mol qui correspond vraisemblablement à des chaînes de PGA agrégées).

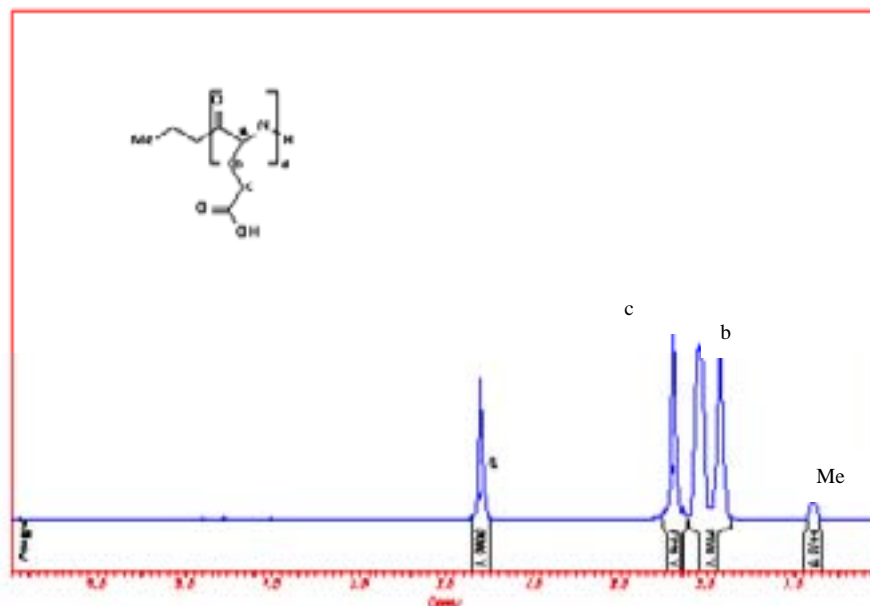


Figure 6
Spectre RMN ^1H du PGA dans le TFA d

Les échantillons de PGA ont ensuite été solubilisés en milieu aqueux par neutralisation par la soude. Cette réaction (Schéma 4) entraîne la dissolution progressive du polymère qui est stable en milieu aqueux pour un pH de l'ordre de 8.

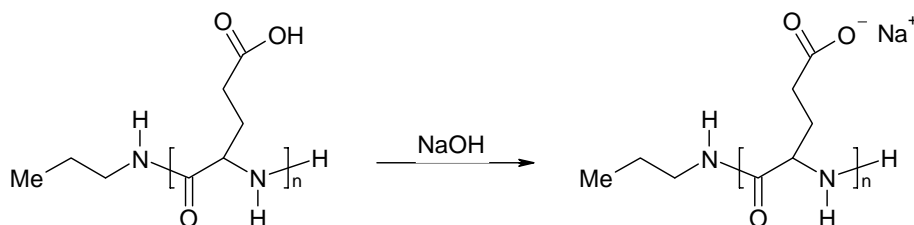


Schéma 4
Déprotonation du poly(acide glutamique) et solubilisation

¹ R.J. Block, Poly(γ -benzyl-L-glutamate) and Other Glutamic Acid Containing Polymers, Gordon Eds, **1983**

² H. Ihre, A. Hult, E. Söderlind, J. Am. Chem. Soc., **1996**, *118*, 6388

³ G.M. Anantharamaiah, K.M. Sivanandaiah, J. C. S. Perkin I, **1976**, 490

⁴ L.J. Mathias, W.D. Fuller, D. Nissen, M. Goodman, Macromolecules, **1978**, *11*, 534

⁵ B. Huang, M.E. Hermes, J. Pol. Sci. Part A : Polymer Chemistry, **1995**, *33*, 1419

⁶ M. Trollsas, J. Hedrick, D. Mecerreyen, R. Jerome, Ph. Dubois, J. Pol. Sci. Part A : Polymer Chemistry, **1998**, *36*, 3187

⁷ J. Schlatter, R.H. Mazur, Tetrahedron Letters, **1977**, *33*, 2851

⁸ V. Sansanwal, H.G. Krishnamurty, Synthetic. Com. **1995**, *25*, 1901

- ⁹ A.M. Felix, E.P. Heimer, T.J. Lambros, C. Tzougaki, *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 4194
- ¹⁰ T. Tsuji, T. Kataoka, M. Yoshioka, Y. Sando, Y. Nishitami, S. Hirai, T. Maeda, W. Nagata, *Tetrahedron Letters*, **1979**, *30*, 2793
- ¹¹ M. Idelson, E.R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*, 1259
- ¹² A. Nakajima, T. Yasuda, *Polymer Journal*, **1976**, *8*, 541
- ¹³ N. Sato, *Tetrahedron Letters*, **1996**, *37*, 8519
- ¹⁴ Y. Kato, N. Umemoto, Y. Kayama, H. Fukushima, Y. Takeda, T. Hara, Y. Tsukada, *J. Med. Chem.*, **1984**, *27*, 1602
- ¹⁵ S. Bechaouch, B. Coutin, H. Sekiguchi, *Macromol. Chem. Phys.*, **1996**, *197*, 1661
- ¹⁶ I. Gachard, B. Coutin, H. Sekiguchi, *Polymer Bulletin*, **1997**, *38*, 643

Synthèse de Copolymères Poly(lactide-co-glutamate de benzyle)

<i>PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION</i>	85
<i>DEUXIEME PARTIE : SYNTHESE DE COPOLYMERES A BLOCS</i>	86
I- Synthèse du copolymère poly(lactide-b-glutamate de benzyle)	86
II- Caractérisation des copolymères poly(lactide-b-glutamate de benzyle)	88
III- Déprotection et caractérisation du copolymère	90
IV- Conclusion	92

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION

Ce chapitre est dédié à la présentation des travaux réalisés pour la synthèse de copolymères composés de polylactide et de poly(acide glutamique), selon des architectures à blocs. Ces travaux ont été conduits en prenant en compte les résultats présentés dans les deux chapitres précédents et relatifs à la synthèse et à la caractérisation des deux homopolymères constitutifs des copolymères visés.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, deux voies de synthèse permettent d'atteindre les architectures amphiphiles nécessaires pour l'application envisagée : la voie des copolymères à blocs (Schéma 1) et une autre voie, confidentielle, qui est décrite dans un document annexe réservé à l'usage de la société Flamel Technologie et du LCPO.

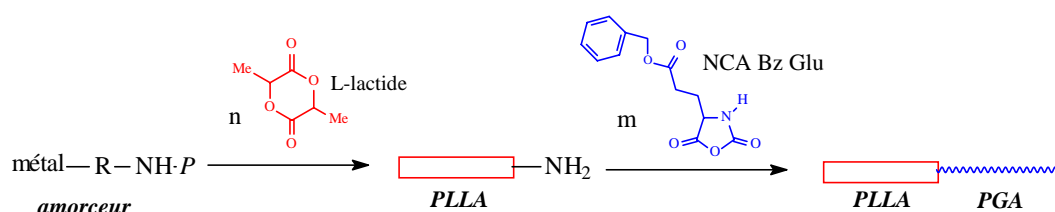


Schéma 1
Voie de synthèse de copolymères à blocs amphiphiles

La voie de synthèse des copolymères à blocs consiste à amorcer la polymérisation du premier bloc (le bloc hydrophobe polylactide) par un amorceur difonctionnel possédant une fonction amine primaire protégée par un groupement *P*. Le premier bloc polylactide est ensuite déprotégé et la fonction amine primaire téléchélique est utilisée comme amorceur du NCA de L-glutamate de benzyle. Après copolymérisation du NCA, on obtient un copolymère à blocs. Les fonctions acide portées par les unités glutamate sont ensuite déprotégées pour lui conférer un caractère amphiphile.

DEUXIEME PARTIE : SYNTHESE DE COPOLYMERES A BLOCS

I- Synthèse du copolymère poly(lactide-b-glutamate de benzyle)

Le bloc polylactide constitue le premier bloc du copolymère. Il a été synthétisé par polymérisation par ouverture de cycle du L-lactide amorcée par le N-terbutyl(carbamate) propanolate de zinc en solution dans le toluène. Ce polymère a subi ensuite une déprotection de la fonction amine primaire par clivage de la fonction protectrice terbutylcarbamate. Le polylactide fonctionnalisé par l'amine primaire est alors prêt à amorcer la copolymérisation du NCA de L-glutamate de benzyle. Comme nous l'avons montré précédemment (voir Premier Chapitre) la fonctionnalisation du polylactide par l'amine primaire est pratiquement totale. Compte tenu des résultats que nous avons obtenus en homopolymérisation du NCA de glutamate de benzyle (amorçage par la propylamine), nous pouvons espérer ne pas retrouver de l'homopolylactide dans le milieu réactionnel de copolymérisation.

Le deuxième bloc, le poly(glutamate de benzyle), a été synthétisé par polymérisation par ouverture de l'hétérocycle N-carboxyanhydride de L-glutamate de benzyle amorcée par le polylactide-NH₂ (Schéma 2). La réaction a été conduite pendant trois heures, à température ambiante, en solution dans le dichlorométhane. En effet, nous avons vérifié que cette durée optimale, déterminée dans le cas d'un amorçage par la propylamine (voir Troisième Chapitre), permettait également une conversion totale dans le cas d'un amorçage par le polylactide fonctionnalisé (Figure 1).

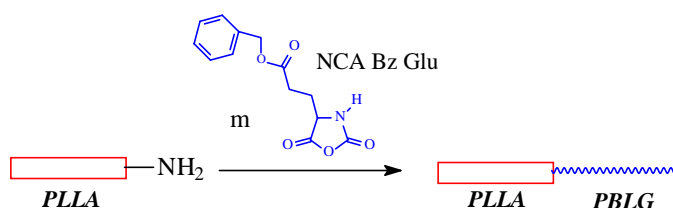


Schéma 2
Synthèse d'un copolymère à bloc PLLA-PBLG

Nous avons préparé des copolymères avec des longueurs de blocs et des compositions variables. Afin d'obtenir des particules de tailles suffisamment faibles nous avons choisi des valeurs de masses molaires relativement faibles et nous avons ainsi fait varier le degré de polymérisation théorique de chacun des blocs entre 20 et 100 (Tableau 1).

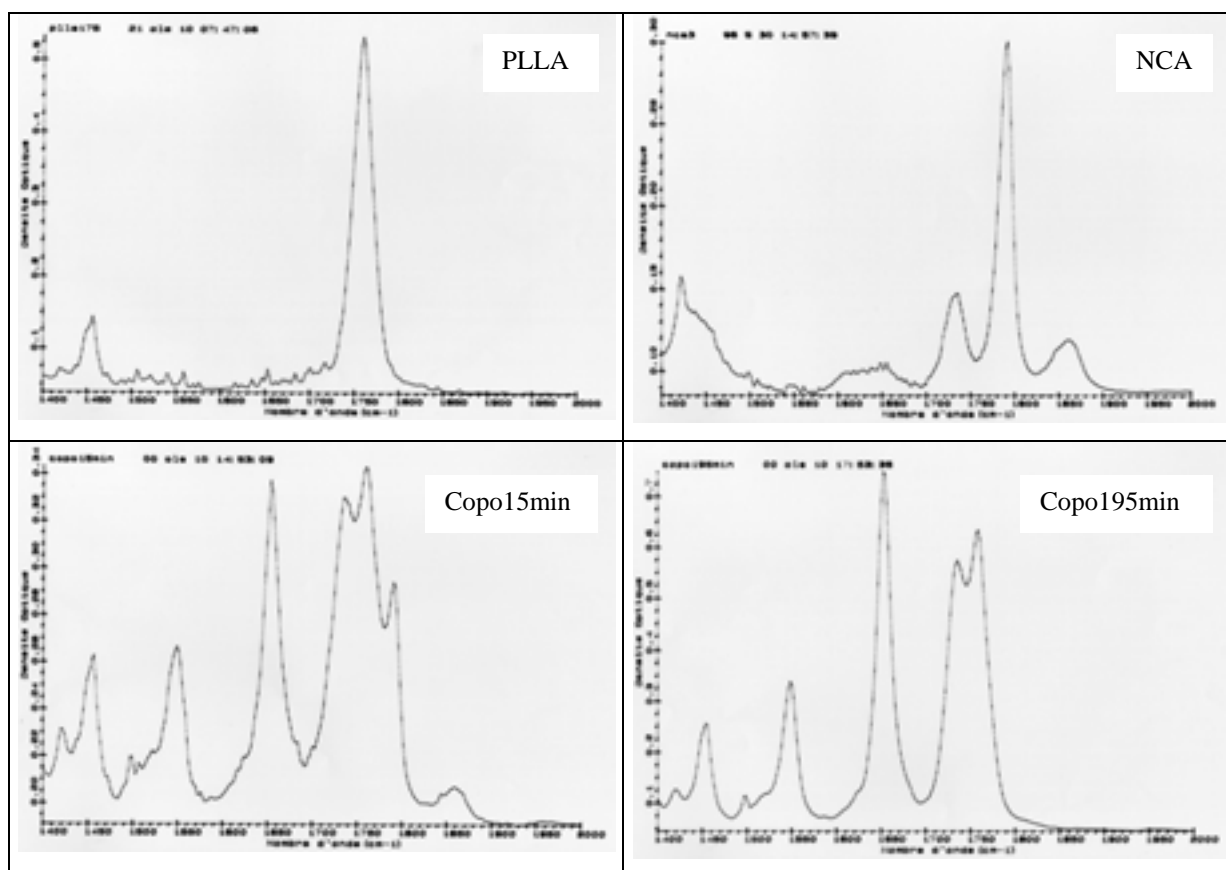


Figure 1

Spectres IR du polylactide, du NCA de Bz-Glu et d'un copolymère PLLA-b-PBLG après 15 et 195 min

Tableau 1

Caractéristiques des échantillons de copolymères à blocs PLLA-PBLG

Echantillons	\overline{DP}_n exp du PLLA ^{a)}	\overline{DP}_n exp du PBLG ^{b)}	Masse molaire exp totale (g/mol) ^{c)}
SCL150	40	50	17000
SCL195	40	80	20000
SCL207	30	80	17500
SCL220	30	30	9000
SCL228	40	40	11500
SCL235	80	20	10000
SCL270	50	50	14500
SCL302	30	100	24000
SCL328	20	80	19000

a) Degré de polymérisation déterminé par RMN ¹H de l'homopolylactide

b) Degré de polymérisation déterminé par RMN ¹H du deuxième bloc

c) Masse molaire expérimentale calculée par RMN ¹H du copolymère

Conditions expérimentales : T=25°C, durée : 3 heures, [NCA]₀ = 0,7 mol/L, solvant : dichlorométhane.

II- Caractérisation des copolymères poly(lactide-b-glutamate de benzyle)

Les différents copolymères à blocs poly(lactide-b-glutamate de benzyle) ont été analysés par spectrométrie RMN ^1H et ^{13}C (Figure 2, Figure 3).

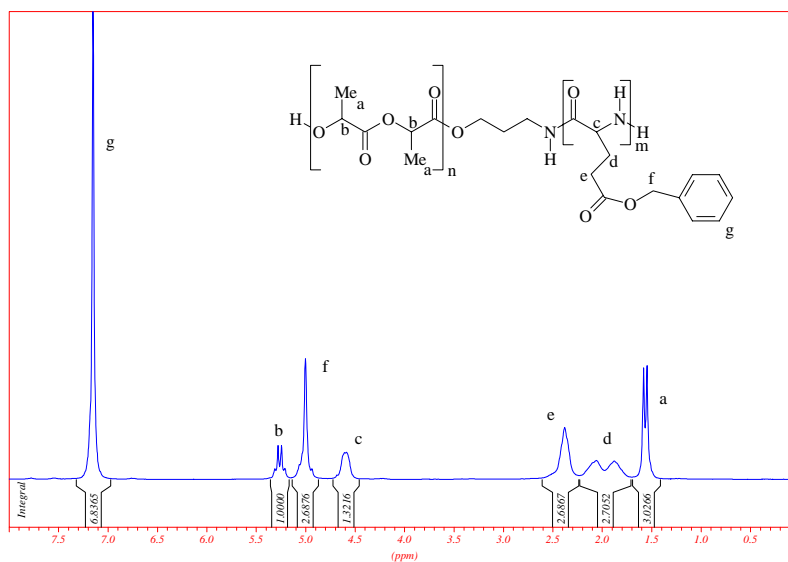


Figure 2
Spectre RMN ^1H du copolymère PLLA-b-PBLG dans le TFA d

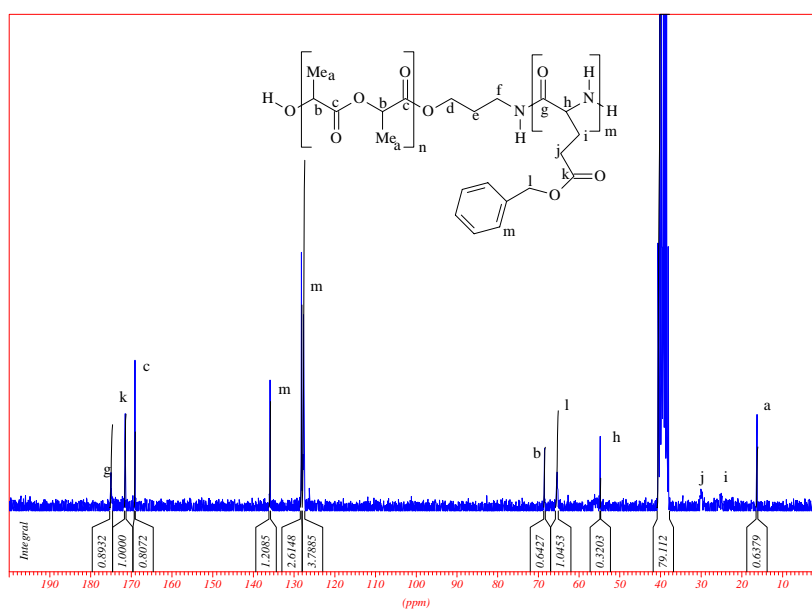


Figure 3
Spectre RMN ^{13}C du copolymère PLLA-b-PBLG dans le TFA d

L'attribution des différents signaux ne permet pas d'identifier les atomes de la liaison entre les deux blocs mais elle confirme la présence des deux types de motifs unitaires (PBLG et PLLA). Afin d'être certains que nous sommes en présence d'un copolymère et non d'un mélange de deux homopolymères, nous avons utilisé la chromatographie d'exclusion stérique. En effet, le chromatogramme des copolymères à blocs (Figure 4) montre l'absence de polylactide et de poly(glutamate de benzyle) résiduels. Nous avons confirmé ce résultat en traitant les copolymères par des solvants ou non-solvants respectifs du PLLA et du PBLG. Ce traitement a révélé l'absence d'homopolymères résiduels en quantité notable (*solvant du PLLA et non solvant du PBLG et du copolymère : acétone*).

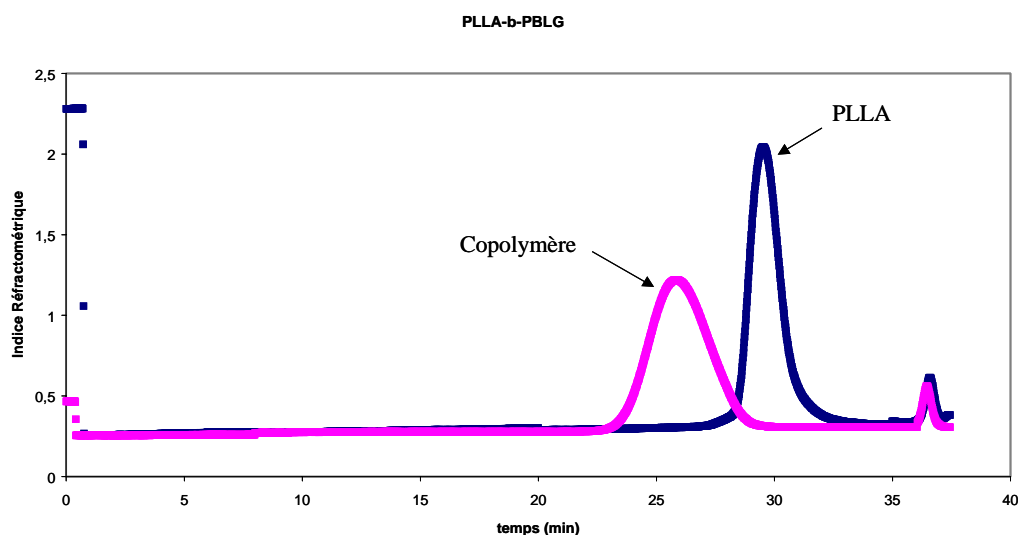


Figure 4
Superposition des chromatogrammes d'exclusion stérique du PLLAtBoc et du copolymère à blocs dans le DMF

Les valeurs expérimentales des masses molaires des copolymères à blocs PLLA-b-PBLG ont été évaluées par analyse par RMN ^1H (Tableau 1). En effet, le degré de polymérisation du deuxième bloc (le bloc PBLG) a été calculé à partir du rapport des intégrations des protons de chacun des deux blocs et de la valeur de la masse molaire du bloc initial PLLA-NH₂. Etant donné que nous avons montré que l'efficacité de l'amorçage par PLLA-NH₂ est proche de 100%, l'évaluation de ces valeurs peut-être considérée comme correcte. Ces valeurs sont certainement plus proches de la réalité que celles issues de la CES compte tenu de la « mauvaise solubilité » des copolymères dans le DMF.

III- Déprotection et caractérisation du copolymère

Les copolymères préparés ont ensuite été déprotégés selon le processus réactionnel mis au point sur l'homopolybenzylglutamate (voir troisième chapitre). Comme le montre l'analyse par RMN ^1H et ^{13}C , cette déprotection est totale (Figure 5, Figure 6) (aux erreurs expérimentales près) et ne modifie pas la structure du bloc PLLA. La masse molaire du PLLA n'est en effet pas modifiée : nous avons prouvé cela en recalculant la masse molaire du PLLA à partir de celle du bloc PGA. Les échantillons de copolymères à blocs amphiphiles PLLA-PBLG ainsi obtenus ont ensuite été utilisés pour la préparation de nanoparticules.

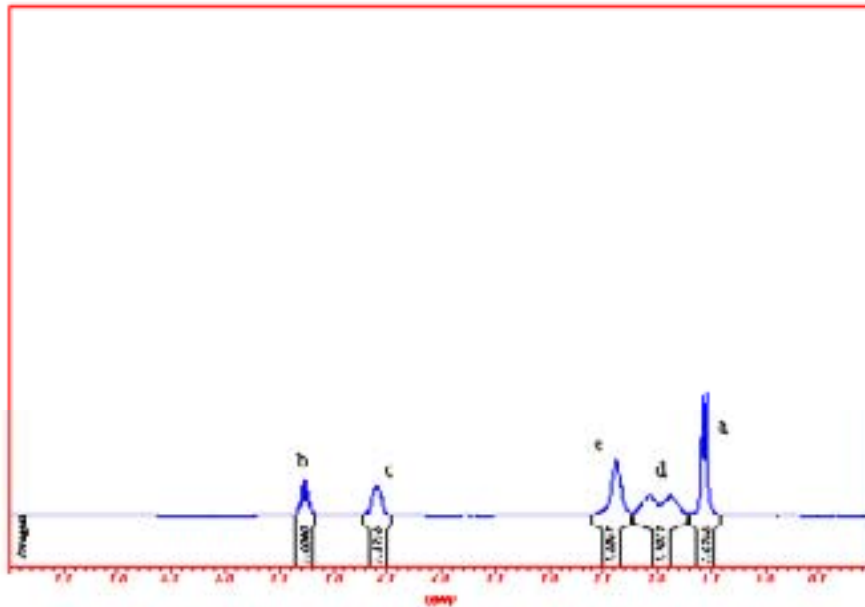


Figure 5
Spectre RMN ^1H du copolymère à blocs PLLA-b-PGA dans le TFA d

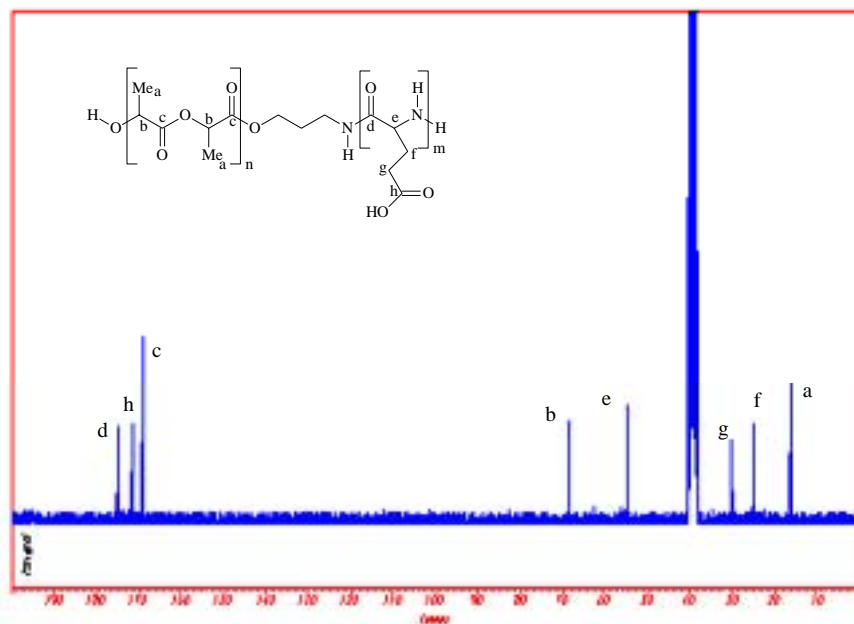


Figure 6
Spectre RMN ^{13}C du copolymère à blocs PLLA-b-PGA dans le DMSO d₆

IV- Conclusion

Dans cette partie, nous avons d'abord rappelé les synthèses d'homopolymères polylactide et poly(acide glutamique) que nous avons appliquées aux synthèses de copolymères. Nous avons ainsi réussi à synthétiser des copolymères à blocs amphiphiles en synthétisant d'abord un polylactide terminé par une amine primaire en bout de chaîne, fonction amine qui nous a permis d'amorcer la copolymérisation du NCA de L-glutamate de benzyle. Ce copolymère, une fois les fonctions acide du PBLG déprotégées, a été caractérisé par RMN ^1H et ^{13}C , chromatographie d'exclusion stérique, spectrométrie infra rouge, spectrométrie de masse de type MALDI-TOF afin de nous assurer de sa structure.

Partie Expérimentale

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION	94
DEUXIEME PARTIE : CONDITIONS EXPERIMENTALES	94
I- Purification des réactifs	94
1°) Diéthylzinc	94
2°) L-lactide	96
3°) NCA de L-glutamate de benzyle	101
II- Modes opératoires de synthèse	101
1°) Le terbutyl-N-(3-hydroxypropyl)carbamate	101
2°) Le N-(terbutylcarbamate)propanolate de zinc	102
3°) Le N-carboxyanhydride de L-glutamate de benzyle	103
4°) Synthèse du polylactide amorcée par le N-(terbutylcarbamate)propanolate de zinc	105
5°) Synthèse du poly(glutamate de benzyle)	106
6°) Synthèse du poly(lactide-b-glutamate de benzyle)	106
7°) Déprotection de la fonction amine primaire du polylactide	107
8°) Clivage des fonctions ester de benzyle sur le PBLG	107
9°) Clivage des fonctions ester de benzyle sur le copolymère à blocs	108
III- Caractérisation des composés synthétisés	109
1°) Le polylactide amorcé par le N-(terbutylcarbamate)propanolate de zinc	109
2°) Le polylactide amorcé par La(OiPr) ₃	110
3°) Le L-glutamate de benzyle	111
4°) Le poly(L-glutamate de benzyle)	112
5°) Le poly(acide glutamique)	112
6°) Le copolymère à blocs poly(lactide-b-glutamate de benzyle)	113
7°) Le copolymère à blocs poly(lactide-b-acide glutamique)	113
TROISIEME PARTIE : TECHNIQUES EXPERIMENTALES ET CARACTERISATION	115
I- Détermination des masses molaires	115
1°) Viscosimétrie	115
2°) Chromatographie d'exclusion stérique	117
3°) Tonométrie	117
4°) Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire	118
II- Etude cinétique	118

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION

L'objectif de cette partie est de répertorier les modes opératoires qui nous ont permis de synthétiser et de purifier les réactifs que nous avons utilisés. Cette partie comprend également les procédés de synthèse des homopolymères, des modifications chimiques de ces polymères ainsi que les voies de synthèse conduisant aux copolymères à blocs. Elle comporte enfin les techniques expérimentales de caractérisation.

DEUXIEME PARTIE : CONDITIONS EXPERIMENTALES

I- Purification des réactifs

1°) Diéthylzinc

Le diéthylzinc est un composé très sensible à l'eau qui peut très facilement subir une réaction d'hydrolyse substituant des groupements hydroxyle aux groupements éthyle (Schéma 1). Dans ce cas, la réactivité du diéthylzinc est beaucoup plus faible car la présence de ces composés introduit une erreur sur la stœchiométrie des groupements réactifs et ne permet pas le contrôle de la réaction de polymérisation.

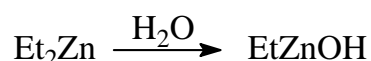


Schéma 1
Réaction d'hydrolyse du diéthylzinc

Cette réaction d'hydrolyse qui est immédiate et s'accompagne d'un dégagement d'éthane peut se poursuivre et mener à des composés polymères de zinc d'aspect blanchâtre (Schéma 2). Ce type de réaction a été décrit par Ishimori¹, et nous l'avons mis en évidence pour tester la pureté du diéthylzinc par dosage volumétrique de l'éthane libéré.



Schéma 2
Hydrolyse poussée du diéthylzinc

Cinquième Chapitre : Partie Expérimentale

La pureté du diéthylzinc peut être contrôlée par spectrométrie RMN ^1H ou par dosage volumétrique de l'éthane dégagé lors d'une hydrolyse provoquée à cette intention. Le volume d'éthane dégagé lors de l'hydrolyse d'une quantité connue de solution de diéthylzinc permet ainsi de déterminer la concentration réelle en groupement éthyle - on assimile pour cela l'éthane à un gaz parfait suivant la relation $PV=nRT$. On ne cherche pas à purifier ce composé si réactif, on tient seulement à s'assurer de sa pureté.

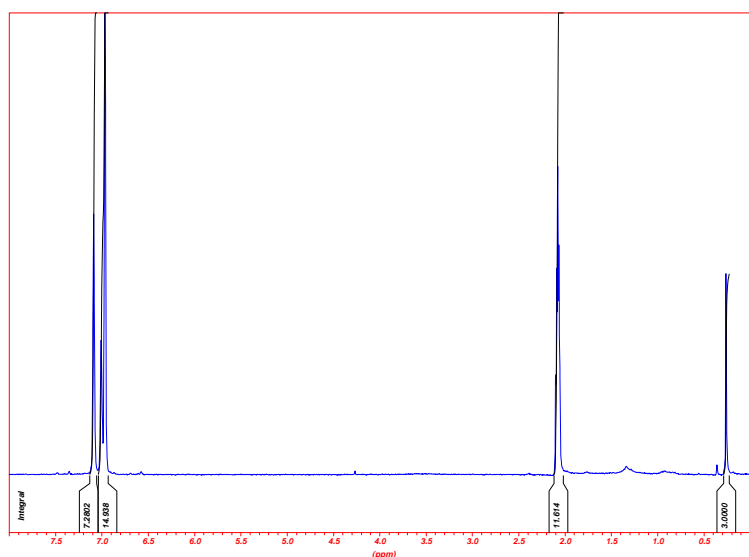


Figure 1
Spectre RMN ^1H du diéthylzinc non conforme dans le toluène d8

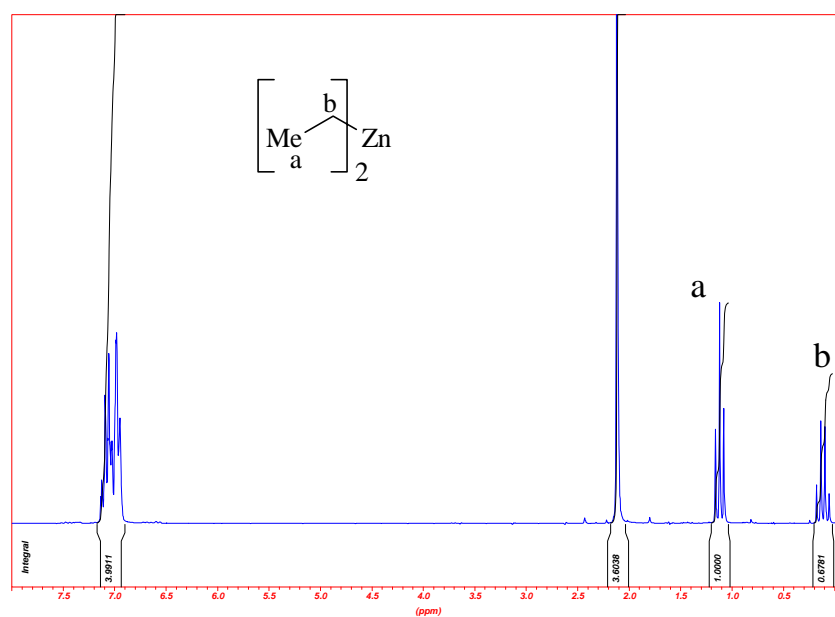


Figure 2
Spectre RMN ^1H du diéthylzinc dans le toluène d8

Analyse du spectre RMN ^1H du diéthylzinc :

Solvant toluène d_8 - (Figure 2)

Déplacements chimiques	Attribution
1,10 ppm	3 protons a
0,20 ppm	2 protons b
2,10 et 7,90 ppm	Solvant résiduel

Sur le spectre du diéthylzinc non conforme (Figure 1), on n'observe aucun des déplacements chimiques des protons correspondants. Pratiquement tout ce diéthylzinc a donc été hydrolysé. Par contre, sur le spectre du diéthylzinc conforme (Figure 2), on observe bien les déplacements chimiques des protons correspondants.

2°) L-lactide

Le monomère est la 3,6-diméthyl-1,4-dioxane-2,5-dione, trivialement appelé L-lactide. Le monomère commercial doit être purifié avant toute utilisation pour éliminer l'acide lactique qu'il contient – c'est en effet la principale impureté du lactide. Il est d'ailleurs à noter qu'il existe des différences notables dans la concentration d'acide lactique selon les lots de L-lactide utilisés. Un dosage enzymatique de l'acide lactique a en effet montré qu'un lot de **monomère commercial** contenait **0,20%** d'acide lactique, et qu'**après sublimation**, on n'en retrouvait que **0,01%**. Une analyse par chromatographie en phase vapeur couplée à une spectrométrie de masse a permis par ailleurs de confirmer la présence d'acide lactique dans le L-lactide, et de la doser à plus de **5%** (Figure 3, Figure 4 et Figure 5).

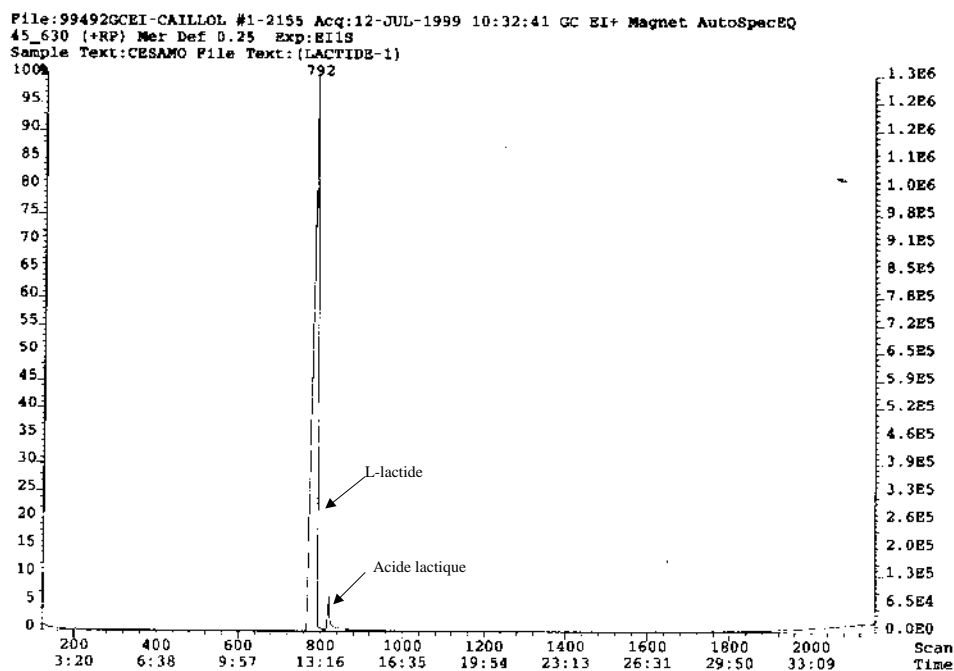


Figure 3
Chromatogramme CPV du L-lactide commercial

L'attribution de ces deux pics a été confirmée par une analyse de spectrométrie de masse. Les analyses spectrométriques des pics de la Figure 3 correspondent respectivement aux spectres de masse **a** de la Figure 4 et de la Figure 5. Les spectres **b** de la Figure 4 et de la Figure 5 correspondent quant à eux aux spectres théoriques issus d'une bibliothèque de molécules.

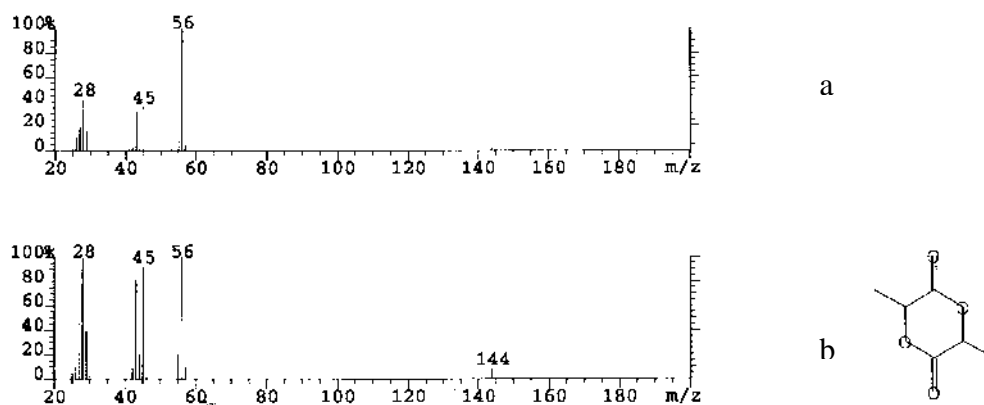


Figure 4
Spectrométrie de masse du 1^{er} pic de la Figure 3

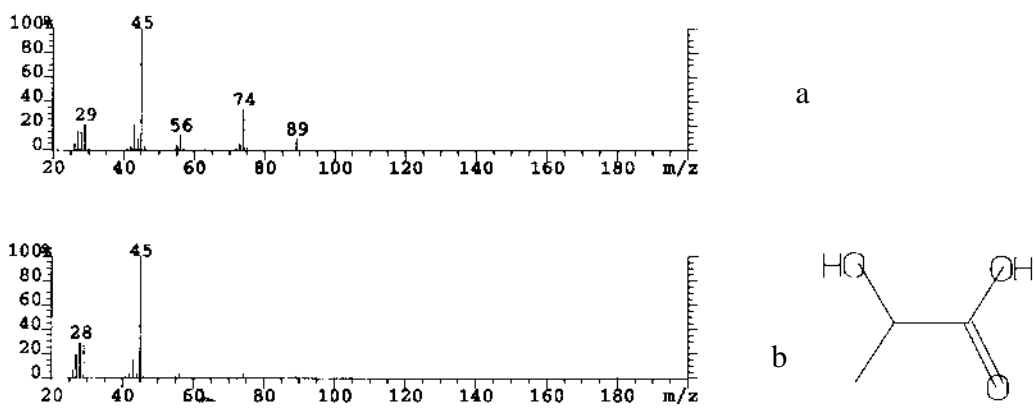


Figure 5
Spectrométrie de masse du 2^{ème} pic de la Figure 3

La sublimation semblait être un moyen efficace de purifier le L-lactide et d'éliminer l'acide lactique présent. Un lavage préalable dans un solvant de l'acide lactique, mais non-solvant du L-lactide, permettait de plus d'éliminer le maximum d'acide lactique avant la sublimation. Néanmoins, le spectre RMN ^1H du L-lactide après sublimation montre la présence d'un épaulement avant le pied du doublet du méthyle (qui n'est pas présent sur le spectre avant sublimation). Comme la probabilité d'ouvrir le cycle lactide lors de la sublimation n'est pas nulle, cette méthode semblait présenter beaucoup de risques, d'autant que les résultats n'étaient pas forcément reproductibles – des impuretés restaient parfois présentes. Nous avons donc essayé de laver à plusieurs reprises le monomère lactide avec un solvant de l'acide lactique, non-solvant du lactide. Nous avons ainsi utilisé l'éther diéthylique anhydre. Cette méthode s'est avérée efficace car elle nous a permis d'éliminer toutes les impuretés présentes sur le spectre RMN ^1H (Figure 6, Figure 7 et Figure 8). Les avis restent cependant partagés dans la littérature, puisque certains auteurs préfèrent sublimer le lactide pour le purifier, d'autres le recristallisent dans le toluène ou l'acétate d'éthyle et d'autres enfin effectuent des lavages avec de l'éther diéthylique.

Il est à noter que nous avons également effectué un test consistant à polymériser trois échantillons de L-lactide, chacun purifié selon une de ces trois techniques différentes, mais provenant d'un même lot de lactide commercial. Les réactions ont été menées dans les mêmes conditions en même temps, et c'est le lactide purifié par lavage qui a donné les meilleurs résultats quant au rendement de polymérisation, à la concordance des valeurs théoriques et expérimentales des masses molaires et à l'indice de polymolécularité du polymère obtenu (Figure 6, Figure 7, Figure 8).

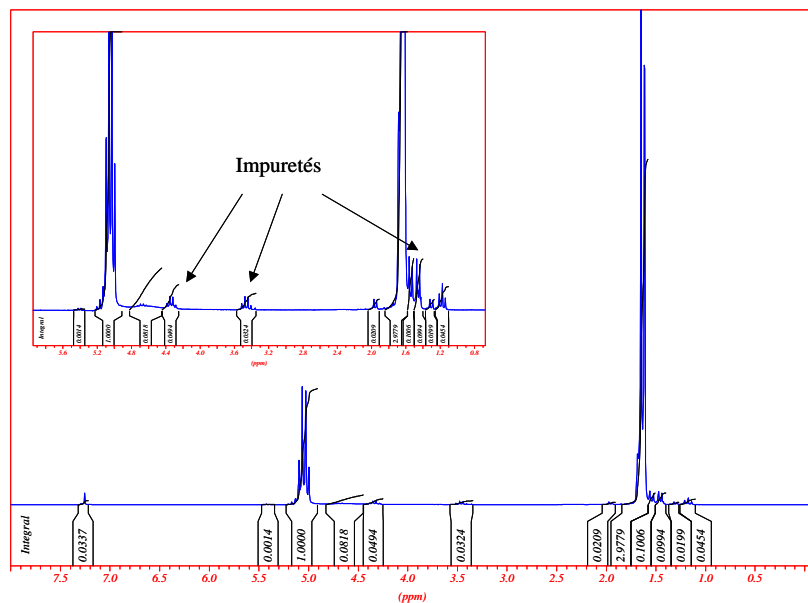


Figure 6
Spectre RMN ^1H du lactide commercial

Analyse du spectre RMN ^1H du lactide commercial :

Solvant : CDCl_3 – Figure 6

Déplacements chimiques	Attribution
1,65 ppm	6 protons a
5,0 ppm	2 protons b
1,5 ppm	Epaulement correspondant à une impureté

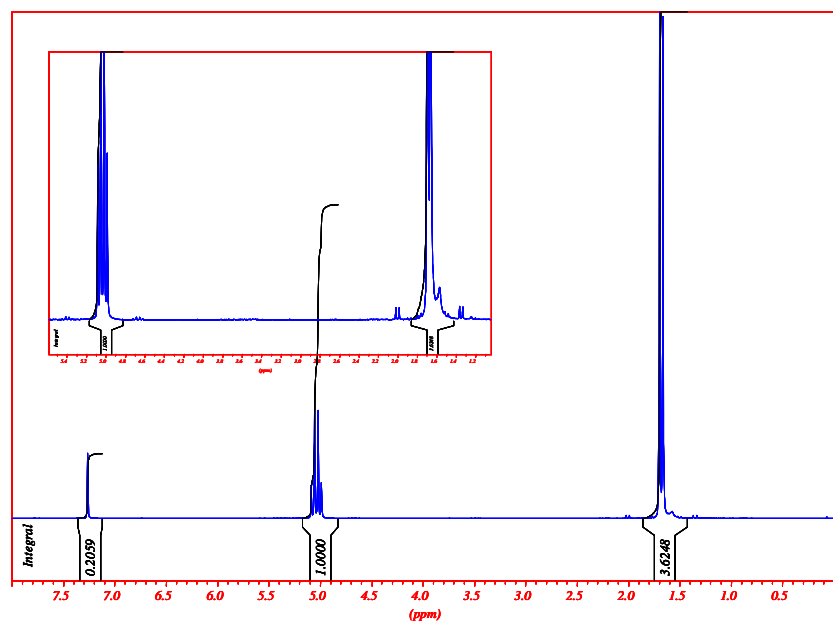


Figure 7
Spectre RMN ^1H du lactide sublimé

Analyse du spectre RMN ^1H du lactide sublimé :

Solvant : CDCl_3 – Figure 7

Déplacements chimiques	Attribution
1,65 ppm	6 protons a
5,0 ppm	2 protons b
1,5 ppm	Epaulement correspondant à une impureté

Analyse du spectre RMN ^1H du lactide purifié par lavage à l'éther diéthylique anhydre :

Solvant : CDCl_3 – Figure 8

Déplacements chimiques	Attribution
1,55 ppm	6 protons a
5,0 ppm	2 protons b

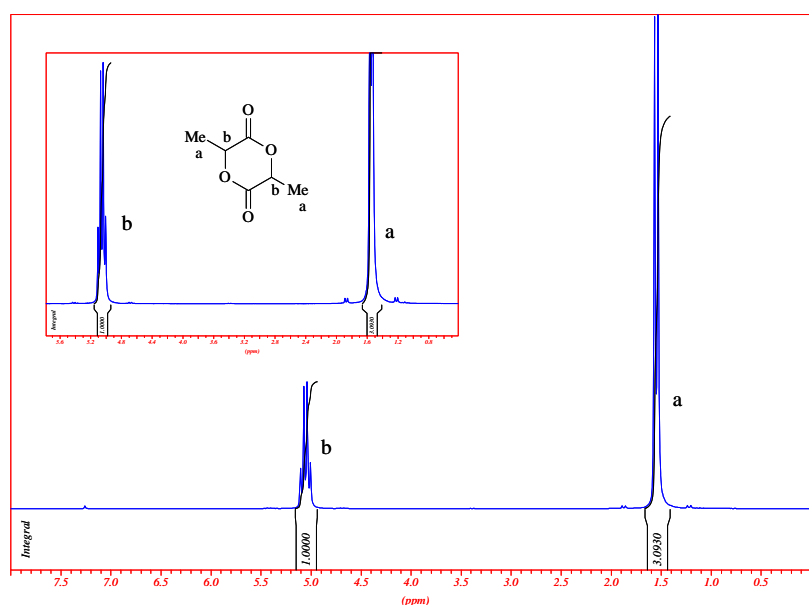


Figure 8
Spectre RMN ^1H du lactide purifié par lavage à l'éther diéthylique anhydre

Lavage :

On place 25g de L-lactide commercial dans 250ml d'éther fraîchement distillé sur CaH_2 sous agitation violente pendant quinze minutes. On filtre sur entonnoir filtrant à fritté n°4. On effectue un deuxième lavage suivi d'une deuxième filtration sur entonnoir filtrant. On sèche ensuite le rétentat final de L-lactide sous vide primaire durant une nuit. Le lactide est stocké à -30°C en boîte à gants.

Sublimation :

Le montage est constitué d'un ballon monocol de départ muni d'un agitateur magnétique et d'un ballon d'arrivée muni d'une sortie d'azote, reliés par un pont. On flamme le montage, puis on introduit le L-lactide dans le premier ballon. On laisse le montage sous vide primaire dynamique, et on chauffe le ballon de départ à 60°C pendant quatre heures. L'acide lactique possède une température de sublimation de 119°C à 12mm Hg², cela revient à 60°C à 0,4mm Hg (vide primaire).

On élève ensuite la température à 120°C, et on place le ballon d'arrivée dans un bain d'azote liquide. On y condense ainsi le L-lactide qui se sublime. On provoque la sublimation du L-lactide qui s'est condensé sur les parois du pont à l'aide d'un pistolet à chaleur. On récupère tout le lactide purifié dans le ballon d'arrivée. Le lactide est stocké à -30°C en boîte à gants.

3°) NCA de L-glutamate de benzyle

Ce monomère est solubilisé dans le dichlorométhane puis précipité dans de l'hexane. On laisse la solution contenant le précipitat au congélateur plusieurs heures puis on filtre. Le rétentat est alors séché sous vide puis stocké en boîte à gants à -30°C.

II- Modes opératoires de synthèse

1°) Le *terbutyl-N-(3-hydroxypropyl)carbamate*

Réactifs :

Nom	Formule	Quantité	Commentaires
aminopropanol	C ₃ H ₉ NO	52,3mmol	stocké sur CaH ₂
triéthylamine	NH ₃	52,3mmol	stockée sur CaH ₂
di-t-butyl dicarbonate	C ₁₀ H ₁₈ O ₅	52,3mmol	pureté 97%
THF	C ₄ H ₈ O	20ml	distillé, stocké sur miroir de Na
dichlorométhane	CH ₂ Cl ₂	15ml	distillé, stocké sur CaH ₂

Mode opératoire :

On utilise un ballon tricol de 100ml, surmonté d'un réfrigérant relié à un bulleur, muni d'une agitation magnétique, d'une ampoule de coulée et d'une arrivée azote/vide. On flamme le montage sous vide primaire, on le place sous azote dans un bain de glace/eau à 0°C. On introduit l'aminopropanol fraîchement cryodistillé et dilué dans 6ml de THF à l'aide d'une

Cinquième Chapitre : Partie Expérimentale

canule. On rince avec du THF. On introduit la triéthylamine fraîchement cryodistillée à l'aide d'une canule et on rince avec le reste de THF. On introduit sous courant d'azote, avec une pipette, le di-t-butyl carbonate, dilué dans 15ml de dichlorométhane fraîchement cryodistillé, dans l'ampoule de coulée. On introduit, sous agitation, goutte-à-goutte, le di-t-butyl carbonate (durée : vingt minutes). On retire alors le bain de glace, et on laisse trois heures trente sous agitation à température ambiante.

Traitement :

On évapore les solvants à l'évaporateur rotatif. On met en solution dans 100ml de dichlorométhane. On lave à deux reprises par 50ml d'acide acétique (0,2M) jusqu'à pH acide. On lave à deux reprises par 50ml d'eau distillée saturée en NaCl jusqu'à pH neutre. On sèche sur Na₂SO₄, on filtre et on évapore le solvant sous vide. On obtient un liquide visqueux jaune pâle. **Rendement : 85%.**

2°) Le N-(terbutylcarbamate)propanolate de zinc

Réactifs :

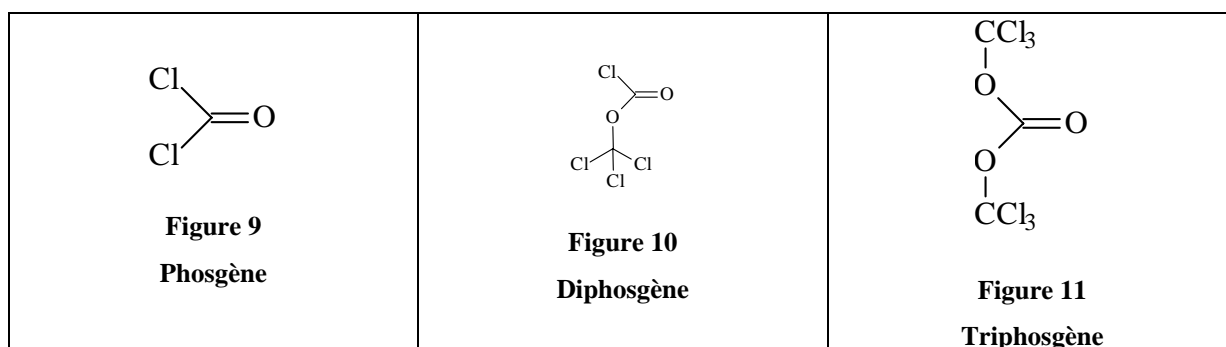
Nom	Formule	Quantité	Commentaires
diéthylzinc	(C ₂ H ₅) ₂ Zn	2,75.10 ⁻⁴ mol	solution 1,1M dans le toluène
terbutyl-N-(3-hydroxypropyl)carbamate	C ₈ H ₁₇ NO ₃	5,5.10 ⁻⁴ mol	
toluène	C ₇ H ₈	7ml	distillé, stocké sur miroir de Na

Mode opératoire :

Le terbutyl-N-(3-hydroxypropyl)carbamate solubilisé dans 7ml de toluène fraîchement cryodistillé est introduit à l'aide d'une seringue dans un schlenk préalablement flammé puis placé sous azote, dans un bain glace/sel à -10°C. Le schlenk est relié à un bulleur. La solution de diéthylzinc est introduite goutte-à-goutte. On retire le bain et on laisse à température ambiante, sous agitation, pendant une heure. On observe un dégagement d'éthane durant toute la réaction. Au bout d'une heure, l'amorceur est prêt à amorcer la polymérisation du L-lactide.

3°) Le N-carboxyanhydride de L-glutamate de benzyle

Le monomère utilisé pour la synthèse du poly(acide aminé) est le N-carboxyanhydride du L-glutamate de benzyle qui est synthétisé à partir du L-glutamate de benzyle et du bis(trichlorométhyl) carbonate. La synthèse de ce composé a été décrite dans la littérature par de nombreux auteurs. En effet, depuis la première synthèse de NCA dérivés des acides aminés par Leuchs³ en 1906, de nombreuses autres procédures ont été explorées. Mais comme les NCA sont essentiellement utilisés comme monomères pour synthétiser des polymères de hautes masses molaires, ils doivent être obtenus par une synthèse permettant d'assurer leur production sans impureté. C'est pourquoi l'addition directe de phosgène a été une voie majoritairement employée ; facile et rapide elle empêche la racémisation des acides aminés⁴.



Une méthode développée par Goodman utilise une solution de phosgène dans du benzène pour s'affranchir de la nécessité d'un large excès de gaz phosgène⁵. En effet, l'addition incontrôlée de phosgène peut entraîner des réactions secondaires dont les produits peuvent inhiber la polymérisation des NCA. Il est de plus très difficile de mesurer précisément ce gaz toxique et de maintenir l'équilibre stœchiométrique dans la réaction. L'équipe de Daly et Poché a donc préféré un substitut du phosgène⁶, plus pratique à utiliser (sous forme de poudre), le chloroformate de trichlorométhyle ou diphosgène (Figure 10) qui requiert cependant la présence de charbon actif pour catalyser la réaction de dissociation et obtenir une cyclisation efficace⁷. Ils se sont tournés ensuite vers l'utilisation de carbonate de bis(trichlorométhyle) ou triphosgène⁸ (Figure 11) dont la contribution de Eckert et Forster⁹ faisait un substitut de choix du phosgène. Ce composé, solide blanc facile à utiliser et stocker, a ainsi la propriété de libérer trois équivalents de phosgène in situ sans catalyseur supplémentaire. Il est de plus soluble dans la plupart des solvants de recristallisation des NCA, comme l'hexane, ce qui permet facilement d'enlever l'excès de ce réactif.

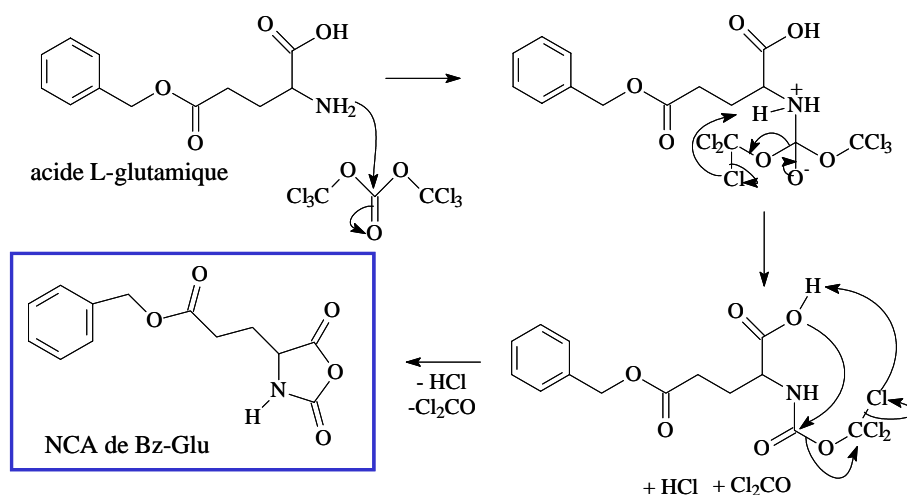


Figure 12

Mécanisme de synthèse du N-carboxyanhydride de L-glutamate de benzyle

Le mécanisme de synthèse du NCA de L-glutamate de benzyle repose sur l'attaque nucléophile de la liaison carbonyle du triphosgène par l'amine de l'acide aminé (Figure 12). La cyclisation se produit lors de l'attaque de la liaison carbonyle de la fonction amide formée par le doublet libre de l'oxygène C-O de la fonction acide de l'acide aminé initial. Cette réaction s'accompagne de la libération de gaz HCl.

Réactifs :

Nom	Formule	Quantité	Commentaires
L-glutamate de benzyle	C ₁₂ H ₁₄ NO ₄	6,3.10 ⁻³ mol	
bis(trichlorométhyle) carbonate	C ₈ H ₁₇ NO ₃	2,3.10 ⁻³ mol	pureté 98%
THF	C ₄ H ₈ O	15ml	distillé, stocké sur miroir de Na
hexane	C ₆ H ₁₂	45ml	stocké sur CaCl ₂

Mode opératoire :

On utilise un ballon tricol surmonté d'un réfrigérant relié à un bulleur, avec arrivée d'azote. Ce montage est flammé. Le L-glutamate de benzyle est introduit sous courant d'azote. Le THF fraîchement distillé est introduit à l'aide d'une canule. On laisse une heure à 65°C sous agitation. La solution est d'un blanc laiteux. On ajoute alors le bis(trichlorométhyle) carbonate sous courant d'azote. On laisse alors une heure trente à 65°C sous agitation magnétique violente et sous léger courant d'azote.

Traitement :

On arrête le chauffage. On précipite le milieu réactionnel à l'aide d'une canule filtrante, dans de l'hexane fraîchement cryodistillé. On laisse décanter une nuit à -20°C. On retire alors le surnageant à l'aide d'une canule filtrante et on sèche le culot sous vide primaire. On obtient une poudre blanche. **Rendement : 70%**. Le NCA de L-glutamate de benzyle est stocké à -30°C en boîte à gants.

4°) Synthèse du polylactide amorcée par le N-(terbutylcarbamate)propanolate de zinc

Réactifs :

Nom	Formule	Quantité	Commentaires
L-lactide	C ₆ H ₈ O ₄	10,4mmol	lavé
N-(terbutylcarbamate)propanolate de zinc	C ₁₆ H ₃₂ N ₂ O ₆	0,52mmol	solution dans le toluène
toluène	C ₇ H ₈	8ml	distillé, stocké sur miroir de Na
acide acétique	C ₂ H ₄ O ₂	1mmol	solution 10% dans le toluène

Mode opératoire :

Le L-lactide est pesé et introduit dans un ballon préalablement flammé en boîte à gants. Le toluène, fraîchement cryodistillé, est introduit par cryodistillation. On place le ballon sous agitation à 80°C. L'amorceur est introduit sitôt sa synthèse terminée. On laisse à 80°C, sous agitation pendant une heure. Le polymère est alors désactivé par 0,6ml d'acide acétique. On évapore alors le toluène par cryodistillation.

Traitement :

On solubilise le polymère dans le minimum de dichlorométhane. On le précipite dans 400ml de méthanol froid, on centrifuge à -5°C, 10000tr/min pendant une heure. On récupère le culot, on le sèche sous vide primaire. On obtient une poudre blanche. **Rendement: 98%**.

5°) Synthèse du poly(glutamate de benzyle)*Réactifs :*

Nom	Formule	Quantité	Commentaires
NCA de L-glutamate de benzyle	$C_{13}H_{13}NO_5$	3,8mmol	synthétisé, précipité
propylamine	$PrNH_2$	$5,3 \cdot 10^{-5}$ mol	Séchée sur CaH_2
dichlorométhane	CH_2Cl_2	5ml	distillé, stocké sur CaH_2

Mode opératoire :

Le NCA de L-glutamate de benzyle est pesé et introduit en boîte à gants dans un ballon préalablement flammé. Le dichlorométhane fraîchement cryodistillé est introduit à l'aide d'une canule. La propylamine fraîchement cryodistillée est introduite par cryodistillation à l'aide d'un tube capillaire. On laisse sous agitation à température ambiante pendant trois heures, avec une garde à $CaCl_2$ reliée à un bulleur. On observe un dégagement de CO_2 .

Traitement :

On évapore le solvant. **Rendement : 92%.**

6°) Synthèse du poly(lactide-b-glutamate de benzyle)*Réactifs :*

Nom	Formule	Quantité	Commentaires
NCA de L-glutamate de benzyle	$C_{13}H_{13}NO_5$	10,6mmol	précipité
PLLA-NH ₂	$[C_3H_4O_2]_n-NH_2$	1g	synthétisé, précipité
dichlorométhane	CH_2Cl_2	15ml	distillé, stocké sur CaH_2

Mode opératoire :

Le NCA de L-glutamate de benzyle est pesé et introduit dans un ballon préalablement flammé en boîte à gants. Le PLLA est solubilisé dans du dichlorométhane fraîchement cryodistillé, puis introduit à l'aide d'une canule. On laisse sous agitation à température ambiante, avec une garde à $CaCl_2$ pendant trois heures. On évapore le solvant. **Rendement : 84%.**

7°) Déprotection de la fonction amine primaire du polylactide*Réactifs:*

Nom	Formule	Quantité	Commentaires
PLLA	$[C_3H_4O_2]_n-(CH_2)_3NH-tboc$	1g	synthétisé, précipité
acide trifluoroacétique	CF_3CO_2H	2ml	anhydre
dichlorométhane	CH_2Cl_2	12ml	distillé, stocké sur CaH_2

Mode opératoire :

Le polylactide est introduit sous courant d'azote dans un ballon préalablement flammé et relié à un bulleur. Le dichlorométhane fraîchement cryodistillé est introduit à l'aide d'une canule. L'acide trifluoroacétique est introduit par une seringue. On laisse une demi-heure sous agitation à température ambiante.

Traitement :

On évapore le solvant. On solubilise le polylactide dans 20ml de dichlorométhane. On lave avec 20ml de $NaHCO_3$ en solution aqueuse (5%). On lave la phase organique avec de l'eau distillée jusqu'à pH neutre. On la sèche sur $MgSO_4$. On filtre et on évapore le solvant. Rendement :95%.

8°) Clivage des fonctions ester de benzyle sur le PBLG*Réactifs :*

Nom	Formule	Quantité	Commentaires
PBLG	$[C(O)CH((CH_2)_2CO_2Bz)NH]_n$	0,5g	synthétisé, précipité
acide trifluoroacétique	CF_3CO_2H	5ml	anhydre
acide méthanesulfonique	CH_3SO_3H	5ml	pureté 99,5%
anisole	C_7H_8O	1,25ml	pureté 99,7%

Mode opératoire :

Le PBLG est introduit sous courant d'azote dans un ballon préalablement flammé. Il est solubilisé dans le TFA introduit par seringue. On place le ballon sous agitation à $10^\circ C$, et on introduit le MSA et l'anisole à la seringue. On laisse trois heures à $10^\circ C$ sous agitation.

Cinquième Chapitre : Partie Expérimentale

Traitement :

On précipite le milieu réactionnel dans de l'éther anhydre. On filtre sur fritté n°4. On lave le rétentat à l'éther. On le sèche sous vide primaire. **Rendement :99%.**

9°) Clivage des fonctions ester de benzyle sur le copolymère à blocs

Réactifs :

Nom	Formule	Quantité	Commentaires
copolymère à blocs	PLLA-b-PBLG	0,5g	synthétisé, précipité
acide trifluoroacétique	CF ₃ CO ₂ H	5ml	anhydre
acide méthanesulfonique	CH ₃ SO ₃ H	5ml	pureté 99,5%
anisole	C ₇ H ₈ O	1,25ml	pureté 99,7%

Mode opératoire :

Le copolymère est introduit sous courant d'azote dans un ballon préalablement flammé. Il est solubilisé dans le TFA introduit par seringue. On place le ballon sous agitation à 10°C, et on introduit le MSA et l'anisole à la seringue. On laisse trois heures à 10°C sous agitation.

Traitement :

On précipite le milieu réactionnel dans de l'éther anhydre. On filtre sur fritté n°4. On lave le rétentat à l'éther. On le sèche sous vide primaire. **Rendement :99%.**

III- Caractérisation des composés synthétisés

1°) Le polylactide amorcé par le N-(terbutylcarbamate)propanolate de zinc

Analyse du spectre RMN ^1H du polylactide :

Solvant : CDCl_3

Déplacements chimiques	Attribution
1,40 ppm	3 protons $\text{Me}_3\text{-CH}$
1,55 ppm	3 protons Me PLLA
1,85 ppm	2 protons $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$
3,15 ppm	2 protons $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$
4,20 ppm	2 protons $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$
4,35 ppm	1 proton Me- CH-OH
4,80 ppm	1 proton NH
5,15 ppm	1 protons CH-Me

Analyse du spectre RMN ^{13}C du polylactide :

Solvant : CDCl_3

Déplacements chimiques	Attribution
17 ppm	1 carbone Me
23 ppm	1 carbone Me-CH-OH
30 ppm	3 carbones $\text{Me}_3\text{-CH}$
30 ppm	1 carbone $\text{HN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$
37,5 ppm	1 carbone $\text{HN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$
63,5 ppm	1 carbone $\text{HN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$
67 ppm	1 carbone Me- CH-OH
69,5 ppm	1 carbone CH-Me
156 ppm	1 carbone O-C(O)-N
170 ppm	1 carbone Me- C(O)-O

Analyse du spectre RMN ^1H du PLLA- NH_2 :

Solvant : CDCl_3

Déplacements chimiques	Attribution
1,55 ppm	3 protons Me
1,85 ppm	2 protons $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$
2,8 ppm	2 protons $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$

Cinquième Chapitre : Partie Expérimentale

4,15 ppm	2 protons H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -O
4,35 ppm	1 proton Me-CH-OH
4,75 ppm	2 proton H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -O
5,15 ppm	1 proton CH-Me

Analyse du spectre RMN ¹³C DEPT du PLLA-NH₂ :

Solvant : CDCl₃

Déplacements chimiques	Attribution
27 ppm	1 carbone Me
31 ppm	1 carbone Me-CH-OH
31 ppm	1 carbone H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -O
41 ppm	1 carbone H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -O
64 ppm	1 carbone H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -O
77 ppm	1 carbone Me-CH-OH
80 ppm	1 carbone CH-Me

2°) Le polylactide amorcé par La(OiPr)₃

Analyse du spectre RMN ¹H du L-lactide amorcé par La(OiPr)₃ :

Solvant : CDCl₃

Déplacements chimiques	Attribution
1,2 ppm	6 protons Me (iOPr)
1,5 ppm	3 protons Me PLLA
4,35 ppm	1 proton Me-CH-OH
5,0 ppm	1 proton Me-CH-Me
5,15 ppm	1 proton CH-Me PLLA

Analyse du spectre RMN ¹³C du polylactide amorcé par La(OiPr)₃ :

Solvant : CDCl₃

Déplacements chimiques	Attribution
18 ppm	1 carbone Me PLLA
28 ppm	2 carbone Me (iOPr)
70 ppm	1 carbone CH-Me
130 ppm	1 carbone C=O

3°) Le L-glutamate de benzyle

Analyse du spectre RMN ^1H du NCA de L-glutamate de benzyle :

Solvant : toluène d_8

Déplacements chimiques	Attribution
1,25 ppm	2 protons $\text{CH}-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2$
1,65 ppm	2 protons $\text{CH}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}_2$
2,95 ppm	1 $\underline{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$
4,50 ppm	1 proton $\text{N}-\underline{\text{H}}$
4,85 ppm	2 protons $\underline{\text{CH}}_2-\text{Bz}$
7,0 ppm	5 proton Bz

Mesure des points de fusion par DSC :

Point de fusion théorique ¹⁰ :	93-94°C
Point de fusion expérimental :	90,5°C

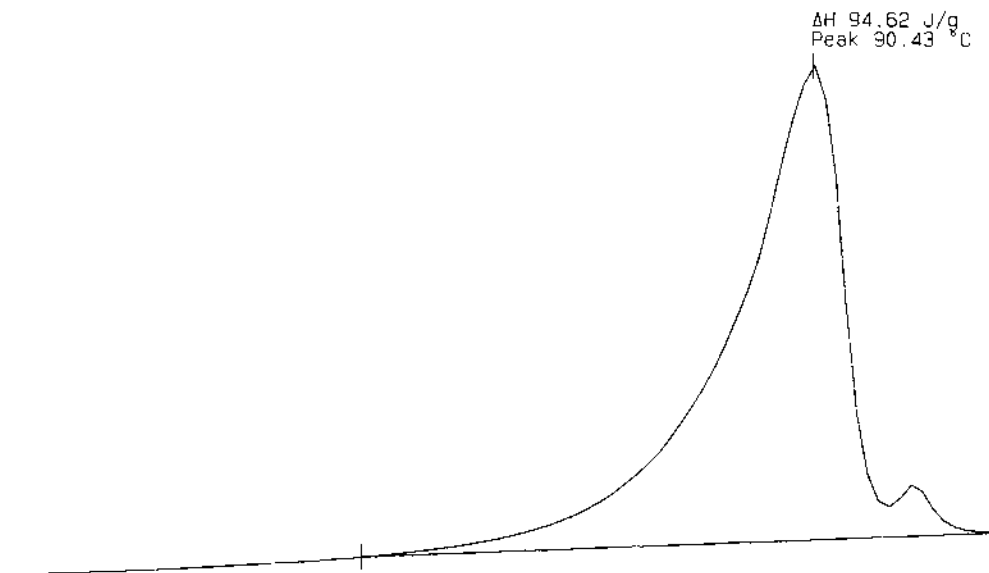


Figure 13
Thermogramme AED du NCA de L-glutamate de benzyle - Conditions: 30°C - 200°C à 10°C/min.

4°) Le poly(L-glutamate de benzyle)

Analyse du spectre RMN ¹H du PBLG :

Solvant TFA d

Déplacements chimiques	Attribution
1,95 ppm	2 protons CH-CH ₂ -CH ₂
2,30 ppm	2 protons CH-CH ₂ -CH ₂
4,60 ppm	1 proton CH
5,00 ppm	2 protons CH ₂ -Bz
7,10 ppm	5 protons Bz

Analyse du spectre RMN ¹³C du PBLG :

Solvant CDCL₃ + TFA

Déplacements chimiques	Attribution
26 ppm	1 carbone CH-CH ₂ -CH ₂
32 ppm	1 carbone CH-CH ₂ -CH ₂
56 ppm	1 carbone CH
65 ppm	1 carbone CH ₂ -Bz
128-136 ppm	6 carbones Bz
172 ppm	1 carbone N-C=O
176 ppm	1 carbone CH ₂ -C=O

5°) Le poly(acide glutamique)

Analyse du spectre RMN ¹H du PGA :

Solvant TFA d

Déplacements chimiques	Attribution
1,95 ppm	2 protons CH-CH ₂ -CH ₂
2,30 ppm	2 protons CH-CH ₂ -CH ₂
4,60 ppm	1 proton CH

6°) Le copolymère à blocs poly(lactide-b-glutamate de benzyle)

Analyse du spectre RMN ¹H du PLLA-b-PBLG :

Solvant TFA d

Déplacements chimiques	Attribution
1,55 ppm	3 protons CH ₃ PLLA
1,95 ppm	2 protons CH-CH ₂ -CH ₂ PBLG
2,35 ppm	2 protons CH-CH ₂ -CH ₂ PBLG
4,60 ppm	1 proton CH PGLB
5,25 ppm	1 proton CH-Me PLLA
5,00 ppm	2 protons CH ₂ -Bz
7,10 ppm	5 protons Bz

Analyse du spectre RMN ¹³C du PLLA-b-PBLG :

Solvant TFA d

Déplacements chimiques	Attribution
17 ppm	1 carbone Me PLLA
25 ppm	1 carbone CH-CH ₂ -CH ₂ PBLG
30 ppm	1 carbone CH-CH ₂ -CH ₂ PBLG
52 ppm	1 carbone CH-CH ₂ -CH ₂ PBLG
65 ppm	1 carbone CH ₂ -Bz
68 ppm	1 carbone CH-Me PLLA
128-136 ppm	6 carbones Bz
168 ppm	1 carbone C=O PLLA
170 ppm	1 carbone O-C=O PGA
175 ppm	1 carbone N-C=O PGA

7°) Le copolymère à blocs poly(lactide-b-acide glutamique)

Analyse du spectre RMN ¹H du PLLA-b-PGA :

Solvant TFA d

Déplacements chimiques	Attribution
1,55 ppm	3 protons CH ₃ PLLA
1,95 ppm	2 protons CH-CH ₂ -CH ₂ PGA

Cinquième Chapitre : Partie Expérimentale

2,35 ppm	2 protons CH-CH ₂ -CH ₂ PGA
4,60 ppm	1 proton CH PGA
5,25 ppm	1 proton CH-Me PLLA

Analyse du spectre RMN ¹³C du PLLA-b-PGA :

Solvant TFA d

Déplacements chimiques	Attribution
17 ppm	1 carbone Me PLLA
25 ppm	1 carbone CH-CH ₂ -CH ₂ PGA
30 ppm	1 carbone CH-CH ₂ -CH ₂ PGA
52 ppm	1 carbone CH-CH ₂ -CH ₂ PGA
68 ppm	1 carbone CH-Me PLLA
168 ppm	1 carbone C=O PLLA
170 ppm	1 carbone O-C=O PGA
175 ppm	1 carbone N-C=O PGA

TROISIEME PARTIE : TECHNIQUES EXPERIMENTALES ET CARACTERISATION

I- Détermination des masses molaires

1°) Viscosimétrie

Nous avons utilisé une méthode d'analyse viscosimétrique pour déterminer la masse molaire du polylactide. On calcule pour cela la viscosité intrinsèque du polymère après plusieurs mesures de la viscosité spécifique¹¹.

En effet, la viscosité d'un polymère en solution varie en fonction de sa concentration et peut être déterminée par la mesure du temps d'écoulement d'une solution de polymère de concentration c dans un tube capillaire. D'après la loi de Poiseuille, le temps d'écoulement t d'une solution dans un capillaire est proportionnel à la viscosité η de cette solution :

On a ainsi la relation :

$$\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{\rho t - \rho_0 t_0}{\rho_0 t_0} \quad \text{équation 1}$$

Avec : ρ : masse volumique de la solution

ρ_0 : masse volumique du solvant

t : temps d'écoulement de la solution

t_0 : temps d'écoulement du solvant

Si on se place en solution diluée, $\rho \approx \rho_0$. L'équation précédente se simplifie alors :

$$\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{t - t_0}{t_0} \quad \text{équation 2}$$

De plus, la viscosité s'exprime également en fonction de la concentration en polymère dans la solution :

$$\eta = \eta_0 (1 + H_1 c + H_2 c^2 + H_3 c^3 + \dots) \quad \text{équation 3}$$

Les équations 2 et 3 conduisent à la relation d'Huggins:

$$\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c} = \frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_1 [\eta]^2 c + k_2 [\eta]^3 c^2 + \dots \quad \text{équation 4}$$

Avec : η_{sp} : viscosité spécifique de la solution

$[\eta]$: viscosité intrinsèque de la solution

c : concentration de la solution

Si la solution est diluée, on simplifie alors l'expression de l'équation 4 :

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_1 [\eta]^2 c \quad \text{équation 5}$$

Dès lors, le tracé des valeurs de η_{sp}/c en fonction de c permet de déterminer la viscosité intrinsèque $[\eta]$: c'est en effet l'ordonnée à l'origine (cf. Figure 14).

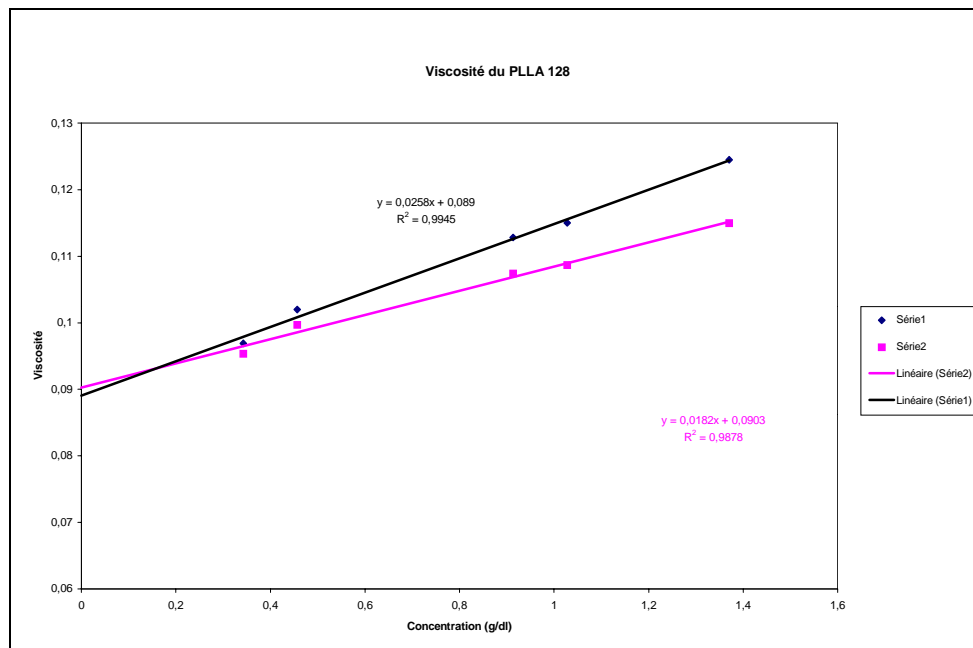


Figure 14
Graphe de la viscosité du PLLA 128

Cinquième Chapitre : Partie Expérimentale

De plus, le volume hydrodynamique d'un polymère est proportionnel au produit de cette viscosité spécifique et de la masse molaire du polymère. Ainsi, on a :

$$V_H = K [\eta] \overline{M}_v \quad \text{équation 6}$$

Si on considère que les volumes hydrodynamiques du polylactide et du polystyrène étalon de même masse en CES sont les mêmes, on peut écrire :

$$[\eta]_{\text{PLLA}} \overline{M}_{v \text{ PLLA}} = [\eta]_{\text{PS}} \overline{M}_{v \text{ PS}} \quad \text{équation 7}$$

La valeur de la masse molaire du polystyrène (PS) est celle donnée par la CES pour le PLLA, la viscosité intrinsèque du PS dans les mêmes conditions que le PLLA est donnée dans la littérature. Ainsi la connaissance de la viscosité intrinsèque du PLLA permet d'obtenir la masse molaire.

2°) Chromatographie d'exclusion stérique

Les mesures des masses molaires et d'indices de polymolécularité des polymères ont été effectuées par CES sur un appareillage Varian 5500 à détection par réfractométrie différentielle. Un jeu de trois colonnes TSK de porosités différentes (HXLG 2000, HXLG 3000, HXLG 4000) permet une séparation des chaînes macromoléculaires sur une large gamme de masses molaires. Le solvant utilisé est le THF ou le DMF et les valeurs des masses molaires sont calculées sur la base d'un étalonnage établi à partir de standards de polystyrène.

3°) Tonométrie

Les mesures des masses molaires sont effectuées à 45°C dans le toluène en utilisant un appareil GONOTEC-OSMOMAT 070 à pression de vapeur.

4°) Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire

Les spectres ^1H et ^{13}C ont été réalisés au moyen d'un appareil Bruker AC200 dans divers solvants deutérés. Les fréquences d'utilisation sont de 200MHz pour le proton et 90MHz pour le carbone.

II- Etude cinétique

Pour le calcul de la conversion, nous avons effectué des polymérisations du L-lactide en présence d'un composé inerte vis-à-vis de la polymérisation, le tétrakis(triméthylsilyl)-silane ($\text{Me}_{12}\text{Si}_5$) qui joue le rôle d'étalon interne.

Sur le spectre RMN ^1H (Figure 15), nous intégrons l'aire de la surface des pics correspondant aux protons du monomère lactide (Am) et celle des pics correspondant aux protons de l'étalon interne (Ae). Le déplacement chimique de ces derniers est de 0,2ppm.

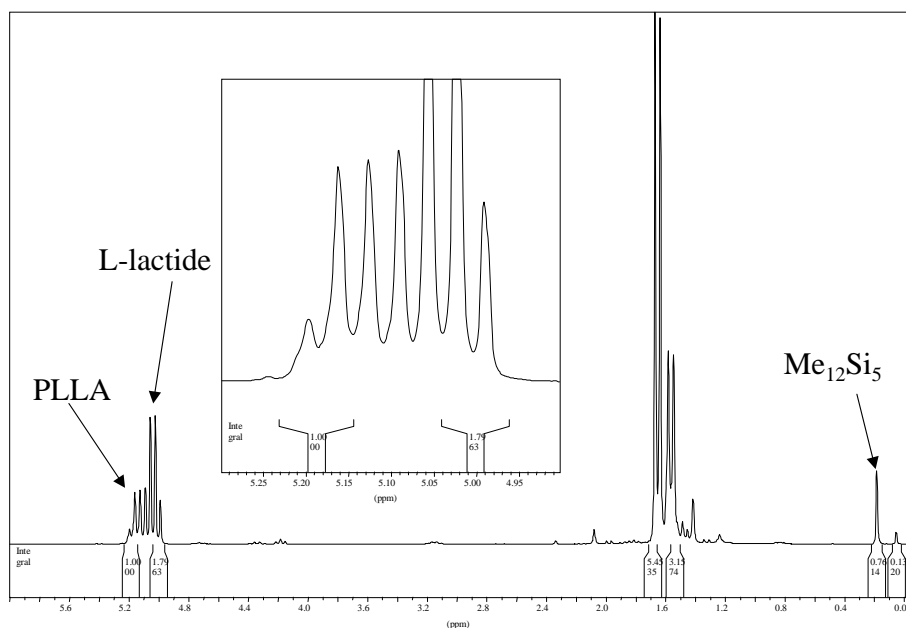


Figure 15
spectre RMN ^1H de l'échantillon du milieu réactionnel après 20minutes de polymérisation

Analyse du spectre RMN ^1H de l'échantillon du milieu réactionnel après 20 minutes de polymérisation :

Solvant CDCl_3 - Figure 15

Déplacements chimiques	Attribution
0,2 ppm	36 protons $\text{Me}_{12}\text{Si}_5$
1,5 ppm	6 protons Me du PLLA
1,65 ppm	6 protons Me du L-lactide
5,00 ppm	2 protons CH du L-lactide
5,10 ppm	2 protons CH du PLLA

Le rapport des différentes aires est relié au rapport des concentrations en monomère [M] et en étalon interne [E], selon l'équation 8 :

$$\frac{A_m}{A_e} = \frac{[M]}{[E]} \quad \text{équation 8}$$

Nous avons effectué un étalonnage préalable pour nous assurer de la validité de l'équation 8 dans les conditions de RMN utilisées. La courbe de la surface corrigée ($S_c = A_m/A_e$) en fonction du rapport de la concentration en monomère sur la concentration en étalon interne, $S_c = f([M]/[E])$, est une droite de pente égale à 1 (Figure 16). Cela nous permet d'utiliser l'équation 8 dans la gamme de concentrations testées pour déterminer la concentration en monomère à partir de la concentration en étalon interne.

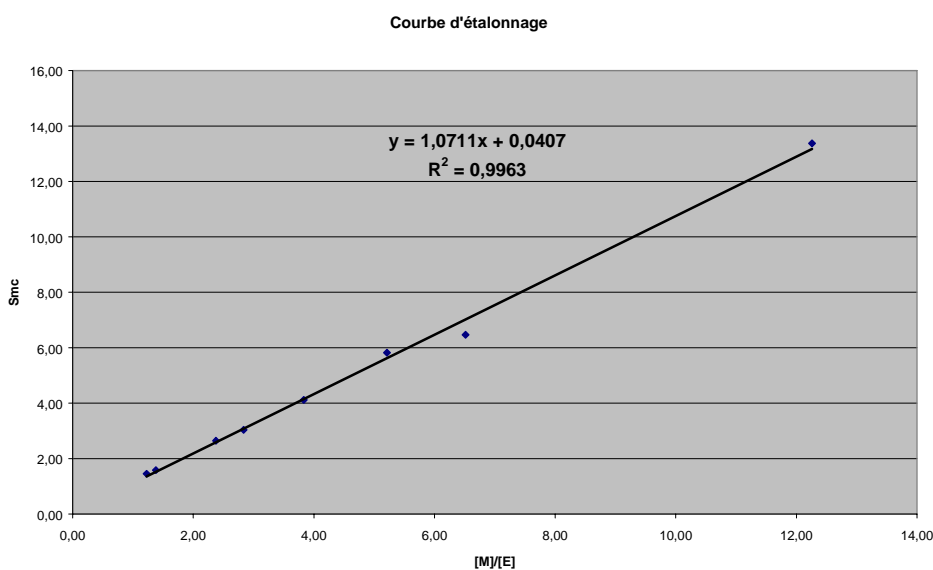
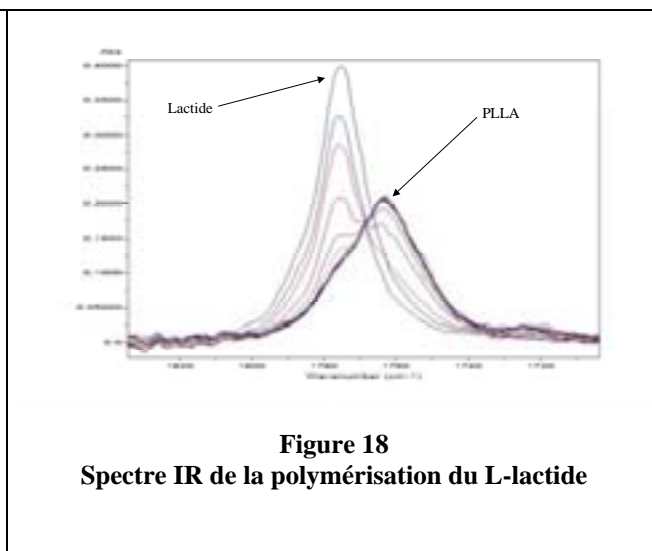
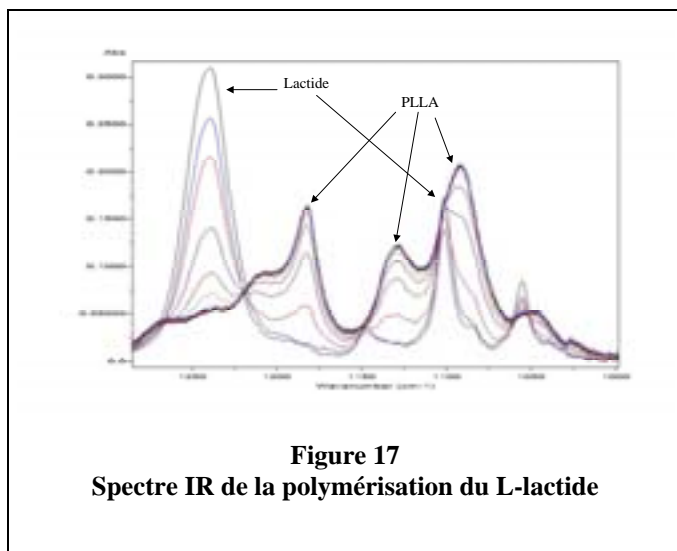


Figure 16
Courbe d'étalonnage $S_{mc} = f([M]/[E])$

Cinquième Chapitre : Partie Expérimentale

Les expériences de suivi cinétique par spectroscopie infra-rouge in situ ont été réalisées au Centre de Recherches de Flamel Technologies à Vénissieux.

Nous avons ainsi suivi la disparition des bandes de vibration des liaisons C=O à 1775cm^{-1} et C-O à 1230cm^{-1} du L-lactide, ainsi que l'apparition des bandes de vibration des liaisons C=O à 1760cm^{-1} et C-O à 1180cm^{-1} du polylactide (Figure 17 et Figure 18).



- ¹ M. Ishimori, O. Nakasugi, T. Takeda, T. Tsuruta, *Makromolekulare Chemie*, **1968**, *115*, 103
- ² *Beilstein Handbook of Organic Chemistry*, 2^{ème} série, vol. 2, p709.
- ³ H. Leuchs, *Chem. Ber.*, **1906**, *39*, 857
- ⁴ Y. Shalitin, *Ring Opening Polymerization*, Frish and Reegen Eds., New York, **1969**, 421
- ⁵ W.D. Fuller, M.S. Verlander, M. Goodman, *Biopolymers*, **1976**, *15*, 1869
- ⁶ M. Oya, R. Kataka, H. Nakai, Y. Iwakura, *Chem. Lett.*, **1973**, 1143
- ⁷ R. Katakai, Y. Iizuka, *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 715
- ⁸ W.H. Daly, D. Poché, *Tetrahedron Letters*, **1988**, *29*, 5859
- ⁹ H. Eckert, B. Forster, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **1987**, *26*, 894
- ¹⁰ E.R. Blout, R.H. Karlson, P. Doty, B. Hargitay, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 4492
- ¹¹ Grubisic, *Polym. Letter*, **1967**, *5*, 753

L'étude présentée dans ce document, consistait en la synthèse de nouveaux copolymères amphiphiles, composés de polylactide et de poly(acide glutamique). Ces polymères ont été choisis car ils sont tous deux bioassimilables et ont des , de plus le polylactide est auto-associatifs en milieu aqueux, susceptibles de former des nanoparticules afin d'encapsuler l'insuline et de permettre ainsi sa protection et sa vectorisation passive à travers l'organisme lors de l'administration orale.

Le but de cette thèse était donc la synthèse de copolymères amphiphiles biodégradables susceptibles de s'autoassocier pour former des particules cœur-écorce en milieu aqueux. Ce sont le polylactide et le poly(acide glutamique) qui ont été choisis pour constituer ces copolymères. L'un et l'autre sont en effet bioassimilables, le polylactide est un polyester aliphatique hydrophobe et le poly(acide glutamique) un polypeptide hydrophile. Le polylactide est synthétisé à partir du L-lactide et le poly(acide glutamique) à partir du N-carboxyanhydride de L-glutamate de benzyle.

Dans le premier chapitre de ce document, nous avons présenté la littérature afférente à notre étude.

Nous avons réservé le deuxième chapitre à l'étude détaillée de la synthèse du polylactide et à sa caractérisation. Nous avons ainsi détaillé la synthèse du polylactide par polymérisation par

Conclusion Générale

ouverture de cycle du L-lactide amorcée par le N-terbutyl(carbamate)-propanolate de zinc. Cet amorceur à base de zinc est dénué de métaux toxiques comme l'étain ou l'aluminium et nous a permis de réaliser des synthèses de polylactide avec un bon contrôle des valeurs des masses molaires et des indices de polymolécularité. Nous avons ainsi synthétisé bon nombre d'échantillons de polylactide selon ce mode de synthèse et selon un autre procédé faisant appel à la polymérisation par ouverture de cycle amorcée par le triisopropanolate de lanthane. Nous avons caractérisé les polymères obtenus selon de nombreuses techniques : RMN ^1H et ^{13}C , spectroscopie infra rouge, chromatographie d'exclusion stérique, spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Nous avons de plus abordé l'aspect cinétique de la polymérisation du L-lactide.

Le troisième chapitre était dévolu à l'étude du poly(glutamate de benzyle), précurseur du poly(acide glutamique), à sa synthèse et ses caractérisations. Nous avons dans ce chapitre montré que nous étions en mesure de synthétiser l'homopoly(glutamate de benzyle) avec un bon contrôle des valeurs des masses molaires, que nous savions caractériser ce polymère selon diverses techniques telles que la RMN ^1H et ^{13}C , la spectroscopie infra rouge, la chromatographie d'exclusion stérique, la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Au terme de ces deux chapitres, nous avons prouvé que nous étions en mesure de synthétiser les deux blocs constitutifs des copolymères visés et que nous étions en mesure de caractériser les objets que nous voulions obtenir, en extrapolant aux copolymères notre savoir expérimenté sur les homopolymères. Nous avons consacré le quatrième chapitre à la synthèse des copolymères aux architectures à blocs. Nous avons, dans cette partie, réussi à synthétiser des copolymères à blocs amphiphiles en synthétisant d'abord un polylactide terminé par une amine primaire en bout de chaîne qui nous a permis d'amorcer la copolymérisation du NCA de L-glutamate de benzyle. Nous avons caractérisé les copolymères à blocs amphiphiles obtenus selon diverses techniques, et nous sommes parvenus à former des nanoparticules cœur-écorce à partir de ces copolymères à blocs. Ces particules associent l'insuline et sont prometteuses pour la vectorisation de protéines thérapeutiques. Un brevet d'invention a été déposé.

Le cinquième chapitre rassemble quant à lui tous les modes opératoires expérimentaux qui se rapportent à cette étude.

Cette étude semble avoir été menée à un terme satisfaisant puisque nous sommes parvenus au but fixé qui était de synthétiser et de caractériser avec beaucoup de précision un copolymère à blocs amphiphiles constitué de polylactide et de poly(acide glutamique). La société Flamel

Conclusion Générale

Technologies a pour sa part étudié la formation de particules et l'encapsulation de protéines à partir de ces copolymères. Une demande de brevet d'invention a été effectuée sur cette application. Une autre étude qui pourrait compléter celle-ci pourrait consister à continuer à explorer certaines des voies que nous n'avons pas finalisées et qui sont décrites dans le document confidentiel annexe.

ANNEXE 1 : Le polylactide, un polymère biodégradable

1°) L'acide lactique

La molécule constitutive du polylactide est l'acide lactique qui a été isolé pour la première fois en 1780 à partir de lait caillé par le Suédois Scheele, et qui fut produit à l'échelle industrielle dès 1881. Les applications dans l'industrie alimentaire représentent la majeure partie de sa production (85%). Il est utilisé comme tampon, agent de saveur, acidulant et inhibiteur de bactéries dans beaucoup de procédés alimentaires industriels. On peut obtenir l'acide lactique selon un procédé de synthèse chimique, ou par la fermentation des sucres, la voie la plus employée¹.

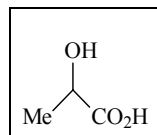


Figure 1
Acide lactique

L'acide lactique (acide 2-hydroxy-propionique) est l'hydroxy acide avec un carbone asymétrique le plus simple (Figure 1). Il existe sous la forme de deux configurations optiques. L'isomère L(+) est produit par le métabolisme des sucres de tous les mammifères, y compris les humains. Cet isomère polarise la lumière vers la droite. L'isomère D(-) polarise la lumière vers la gauche. Les deux isomères D et L sont tous les deux produits par les bactéries. La grande majorité de l'acide lactique commercialisé dans le monde est produit à partir de la fermentation bactérienne des sucres en utilisant des souches bactériennes modifiées de *Lactobacilli* qui produisent uniquement de l'acide lactique. Les bactéries qui produisent majoritairement l'acide L-lactique sont *lactobacilli amylophilus*, *lactobacilli bavaricus*, *lactobacilli casei*. D'autres souches, comme *lactobacilli acidophilus* produisent l'isomère D ou un mélange des deux isomères.

Les différents types de sucres qui peuvent être utilisés pour la fermentation dépendent de la souche bactérienne utilisée. En général, la plupart des sucres simples sous-produits de l'industrie agricole peuvent être utilisés : glucose, maltose, dextrose...

La fermentation industrielle est réalisée selon des procédés qui durent trois à six jours.

La voie chimique de la synthèse de l'acide lactique est actuellement utilisée par une seule société pour produire de grandes quantités de mélange racémique d'acide lactique. Ce procédé est économiquement beaucoup moins avantageux que celui faisant appel à la fermentation bactérienne.

Dans la première étape de ce processus, le cyanure d'hydrogène est additionné à l'acétaldéhyde, avec un catalyseur basique, pour donner du lactonitrile. Dans la deuxième étape, le lactonitrile est hydrolysé en utilisant de l'acide chlorhydrique (Figure 2) pour obtenir de l'acide lactique brut et des sels d'ammonium.

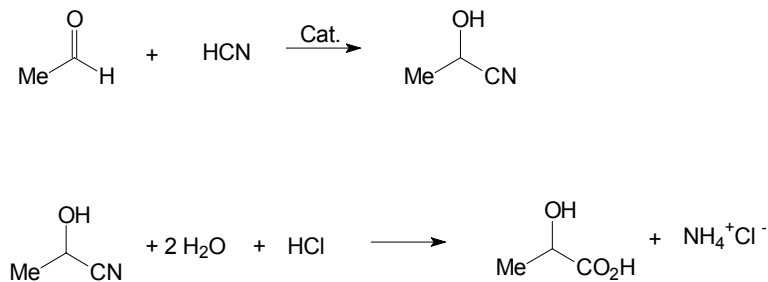


Figure 2

Synthèse de l'acide lactique

L'acide lactique brut est estérifié avec du méthanol. L'ester est alors purifié par distillation et hydrolysé avec un catalyseur acide pour donner l'acide lactique purifié.

3°) Synthèse du lactide

C'est Carothers qui le premier a mis au point la polymérisation par ouverture de cycle du L-lactide en 1932ⁱⁱ. Il ne synthétisa alors que des PLA de faibles masses molaires. C'est seulement avec l'amélioration des techniques de purification du lactide par Dupont en 1954 que du polylactide de masse molaire élevée fut synthétiséⁱⁱⁱ.

On obtient le lactide par dépolymérisation d'oligomères de polylactide sous pression réduite (Figure 3). On récupère en fait un mélange d'isomères D, L et meso. La composition en divers isomères de ce mélange dépend de la qualité de l'acide lactique initial, de la température de la réaction et du catalyseur employé.

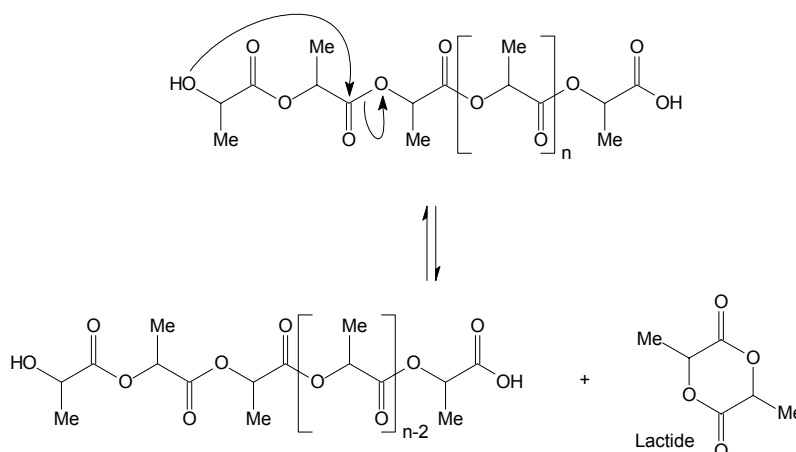


Figure 3
Synthèse du lactide

Il existe trois isomères du lactide ou 3,6-diméthyl-1,4-dioxane-2,5-dione, le L-lactide, le D-lactide et le meso-lactide (Figure 4). Seuls les deux premiers isomères sont optiquement actifs. Le L-lactide polarise la lumière vers la gauche, il est noté L(-), le D-lactide polarise la lumière vers la droite, il est noté D(+).

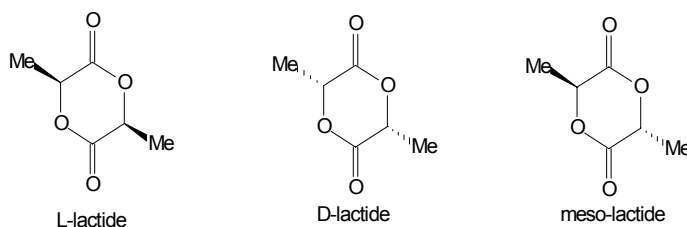


Figure 4
Les différents isomères du lactide

Le L-lactide conduit au poly(L-lactide), le D-lactide au poly(D-lactide), deux polymères semi-cristallins (70% de cristallinité), assez durs à température ambiante. Le mélange racémique de ces deux isomères conduit à un polymère semi-cristallin de température de fusion plus élevée. Quant au meso-lactide il conduit au poly(D,L-lactide), amorphe et transparent^{iv}.

De nombreuses méthodes ont été développées pour obtenir du lactide selon des voies économiquement avantageuses. Une de ces méthodes consiste à polycondenser de l'acide lactique en présence de divers catalyseurs, à des températures de l'ordre de 110-180°C, sous une pression réduite de l'ordre de 25mm Hg de manière à retirer l'eau produite. On obtient un polymère de masse molaire de 1000 à 5000g/mol. Ce polymère est alors porté à 180-215°C, sous 0,1-15mm Hg où il subit une dépolymérisation pour former du lactide qui est distillé^v. Le lactide brut peut être purifié selon diverses techniques : sublimation, recristallisation dans le toluène, l'acétate d'éthyle^{vi}... Ces étapes de purification visent à éliminer toutes les traces d'impuretés présentes dans le lactide - eau, acide lactique, meso-lactide, oligomères - pour obtenir du L, du D ou du D,L-lactide pur. En effet pour arriver à synthétiser des polylactides de masses molaires élevées, le monomère doit être très pur, et surtout dénué de toute trace d'eau ou d'acide. Une grande pureté est aussi requise pour accéder aux applications biomédicales. Pour certains monomères, l'ultime vérification de la pureté consiste en un test de polymérisation, car mêmes des traces indétectables d'impuretés peuvent gêner la réaction de polymérisation^{vii}.

3°) Dégradation du polylactide

La première synthèse d'un polymère biodégradable fut celle du polyglycolide (PGA) en 1954^{viii}. Ce polymère a été rejeté car il était cassant, insoluble, et montrait une faible résistance à la chaleur et à l'hydrolyse, ce qui l'empêchait d'être utilisé comme une matière plastique comme les autres. Vingt ans après, il est devenu le premier matériau biodégradable utilisé pour les sutures^{ix}. Depuis, de nombreux polymères ont été étudiés et classés comme biodégradables, bioabsorbables... Il est dès lors judicieux d'utiliser une nomenclature commune^{x,xi} :

- polymère biodégradable : polymère dont la dégradation est réalisée, au moins partiellement, selon un processus biologique
- dégradation d'un polymère : modification de la structure chimique du polymère, ayant des conséquences néfastes sur ses propriétés
- polymère bioabsorbable : polymère assimilable par le corps humain
- érosion : processus de détérioration du polymère
- polymère biorésorbable : polymère dont les sous-produits issus de sa dégradation sont éliminables ou dégradables par des chemins naturels (reins, métabolisme...)

Il est à noter que le préfixe « bio » ne renvoie qu'à un processus de dégradation enzymatique, ainsi le polylactide est dégradé (par simple hydrolyse) et biorésorbable (car le sous-produit de sa dégradation, l'acide lactique est dégradé et éliminé selon un processus métabolique). On acceptera cependant de parler de biodégradation.

Le PLLA est un polymère semi-cristallin, biodégradable, de $T_g = 35^\circ\text{C}$, $T_m = 175^\circ\text{C}$, avec 35% de cristallinité. Le P(D,L)LA est amorphe, avec $T_g = 57^\circ\text{C}$ ^{xiii}. Les groupes méthyle sur le PLA le rendent plus hydrophobe que le PGA, il va donc se dégrader moins rapidement. Le poly(D,L-lactide) racémique est amorphe, il sera dégradé plus rapidement que le PLLA ou que le PDLA. Ainsi, des implants réalisés à partir de PLLA seront dégradés moins vite que des dispositifs préparés à partir de PLA racémique, de PGA ou de copolymères aux compositions variables en PGA. Par exemple, trente-trois mois après leur implantation chez des rats, des plaques rectangulaires de PLLA n'ont pas encore totalement disparu^{xiii}. Lewis remarque que le P(D,L)LA est dégradé quant à lui en douze à seize mois^{xiv}.

D'un point de vue chimique, les systèmes absorbables subissent 5 étapes de dégradation. Ces étapes ne se font pas forcément successivement et peuvent interférer^{xv} :

La première étape est l'hydratation de l'implant qui commence quand il est placé dans le corps humain. Durant cette étape, le dispositif absorbe de l'eau présente dans l'environnement direct. Selon la masse, la surface et la balance hydrophile/hydrophobe de l'implant, ce procédé dure quelques jours à quelques mois. Bien sûr, l'hydratation des parties amorphes est plus rapide que celle des parties cristallines. Dans une matrice hydrophile en trois dimensions, l'eau pénètre profondément à l'intérieur, produisant un mécanisme de dégradation par fragmentation, alors que l'érosion de surface se produit avec des polymères hydrophobes. Il est à noter que la différence entre les phénomènes érosion de surface/en masse dépend aussi de la vitesse relative entre la pénétration de l'eau (balance hydrophile/hydrophobe) et la vitesse de réaction pour dégrader le polymère (réactivité chimique).

La deuxième étape est la dépolymérisation ou clivage chimique du squelette polymère qui résulte en une diminution des propriétés mécaniques. Lors de cette étape, l'eau réagit avec le polymère d'une façon hydrolytique, clivant des liaisons covalentes et produisant une diminution considérable de la masse molaire et des propriétés physiques. La cinétique de cette étape dépend de beaucoup de facteurs, tels que la taille de l'implant, de la surface, le type de polymère, sa pureté, son taux de cristallinité, le pH de la solution, sa masse molaire initiale^{xvi,xvii}. La dégradation des zones amorphes se produit en premier lieu, suivie par la dégradation des zones cristallines. Pendant cette

phase, la masse de l'échantillon ne varie pas s'il s'agit d'une érosion en masse, mais varie si c'est de l'érosion de surface..

La troisième étape commence quand l'implant n'a plus de force cohésive et se transforme en fragments de masse molaire de plus en plus faible.

La quatrième étape de ce processus est l'absorption de l'échantillon. Elle se produit après hydrolyse poussée, quand la taille des fragments leur permet d'être assimilés par phagocytose ou quand on obtient des monomères ioniques solubles (lactate) dans le fluide inter-cellulaire. C'est à ce niveau qu'intervient la perte de masse réelle, correspondant en fait à l'absorption.

L'absorption du polylactide dure de 20 mois à 5 ans (3 ans pour des vis dans les os)^{xviii}.

La cinquième étape consiste en l'élimination des sous-produits de la dégradation. Le L-lactate est ainsi converti en pyruvate qui entre dans le cycle de Krebs via l'acétylation de la coenzyme A. Durant cette phase, la majeure partie des produits de dégradation du PLA est éliminée par la respiration (CO₂) et seulement une faible partie de ces produits est éliminée par l'excrétion (urine/fécès).

ⁱ H. Benninga (Ed), A History of Lactic Acid Making, **1990**, Kluwer Academic Publishers

ⁱⁱ W.H. Carothers, J. Am. Chem. Soc., **1932**, *54*, 761

ⁱⁱⁱ C. E. Lowe, USP 2668162, **1954**

^{iv} H.R. Kricheldorf, K. Saunders, Macromol. Symp., **1996**, *103*, 85-102

^v D. Hartmann, Biopolymers from Renewable Resources, Kaplan Ed., **1998**

^{vi} H. E. Bellis, USP 4727163, **1988**

^{vii} D. Bendix, Polym. Degrad. And Stability, **1998**, *59*, 129-135

^{viii} R.G. Charles, **1954**, US Patent 2668162

^{ix} E.J. Frazza, E.E. Schmitt, J. Biomed. Mater. Res. Symposium, **1971**, *1*, 43-58

^x S. Li, M. Vert, Biodegradation of Aliphatic Polyesters, Degradable Polymers, Scott & Gilead Ed., **1995**

^{xi} R. Ottenbrite, **1992**, Discussion on Degradation Terminology, Biodegradable Polymers & Plastics, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 73-92

^{xii} S. Gogolewski, J. Pennings, J. of Appl. Pol. Sci., **1983**, *28*, 1045-1061

^{xiii} R.R. Bos, F.R. Rozema, G. Boering, A.J. Nijenhuis, A.J. Pennings, A.B. Verwey, P. Nieuwenhuis, H.W. Jansen, Biomaterials, **1991**, *12*, 32

^{xiv} H. Lewis, Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems, Dekker Ed., NY, **1990**

^{xv} Kronenthals, Polymers in Medicine and Surgery, Kronenthals, Oser, Martin Ed., NY, **1975**, 119-137

^{xvi} Y. Matsusue, T. Yamamuro, S. Yoshiri, M. Oka, Y. Ikada, S. Hyon, Y. Shikinami, J. App. Biomat., **1991**, *2*, 1-12

^{xvii} F. Rozema, Trans. 9th Europ. Conf. on Biomat., Chester, UK, **1991**, 154

^{xviii} J. E. Bergsma, F.R. Rozema, R.R.M. Bos, G. Boering, W.C. De Brijn, A.J. Pennings, Biomaterials, **1995**, *16*, 267-274

ANNEXE 2 : Acides aminés, NCA et polypeptides

1°) Les acides aminés

Tous les peptides et les polypeptides sont des polymères formés d' α -acides aminés et toutes les protéines animales sont formées à partir de seulement 20 acides aminés différents.

On trouve cependant plusieurs acides aminés à l'état libre dans le corps, ou combinés (mais pas associés en peptides ou protéines). Ces acides aminés ont des fonctions particulières. Plusieurs des acides aminés présents dans les protéines ont aussi des fonctions autres que celle de constitution des protéines.

Les acides aminés impliqués dans la synthèse des peptides et des protéines (à l'exclusion de la proline) contiennent un acide carboxylique et une fonction amine portés par le même carbone. C'est le carbone α , il est asymétrique. Le résidu de l'acide aminé est un **groupe R** qui distingue un acide aminé d'un autre. Le quatrième substituant du $C\alpha$ est un proton. La liaison peptidique résulte d'une réaction de condensation conduisant à la polymérisation des acides aminés en peptides et protéines.

Une protéine est un polypeptide de grande longueur. On ne peut pas appliquer aux α -acides aminés la méthode de polycondensation en masse ou en solution des acides aminés ayant la fonction acide et la fonction amine éloignés de plus de 5 carbones. Cette méthode de synthèse des polyamides avait été mise au point par Carothers en 1931ⁱ. En effet, à température élevée, (150, 200°C), les acides aminés et les peptides subissent des réactions secondaires telles que des décarboxylations ou des déaminations qui conduisent à la formation de composés de dégradation de faibles masses qui terminent la polymérisation.

2) Les NCA

C'est en 1906 que Leuchs présente son premier article sur la synthèse et la polymérisation d'un NCAⁱⁱ. C'est en 1920, après l'avènement de la chimie macromoléculaire que l'étude de la synthèse, de la purification et de la polymérisation des NCA prit de l'ampleurⁱⁱⁱ. Dès que furent polymérisés les NCA qui permettaient de synthétiser des polypeptides avec des configurations en hélice α , on réussit à obtenir des masses molaires élevées (100 000g/mol)^{iv}. Des polypeptides de masses

molaires élevées ont été développés, en particulier le polyglutamate, développé au Japon en tant qu'analogue synthétique de la soie sous forme de fibre de textile^v.

Par ailleurs, le poly(glutamate de benzyle) fut le premier polymère dans lequel on détecta une phase mésogène lyotrope, c'est-à-dire un caractère de cristal liquide^{vi}.

Les polymères obtenus à partir des NCA ont servi en outre de modèle à l'étude des protéines car c'est la seule voie permettant d'obtenir des polypeptides de hautes masses molaires sans racémisation.

La synthèse des NCA s'effectue en faisant réagir un α -acide aminé avec du phosgène (Cl_2CO). Cette réaction (Figure 1) s'accompagne d'un dégagement de CO_2 ^{vii}.

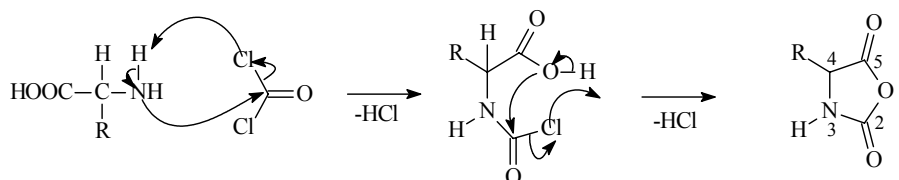


Figure 1

Schéma de synthèse d'un NCA à partir d'un acide aminé et de phosgène

Un NCA est en fait une 1,3-oxazolidine-2,5-dione. Le cycle est électrophile, il réagit avec une base ou un nucléophile sur les positions C2, N3 et C5. Ainsi, la réaction d'un NCA et d'un nucléophile sur la position C5 forme un adduit (Figure 2).

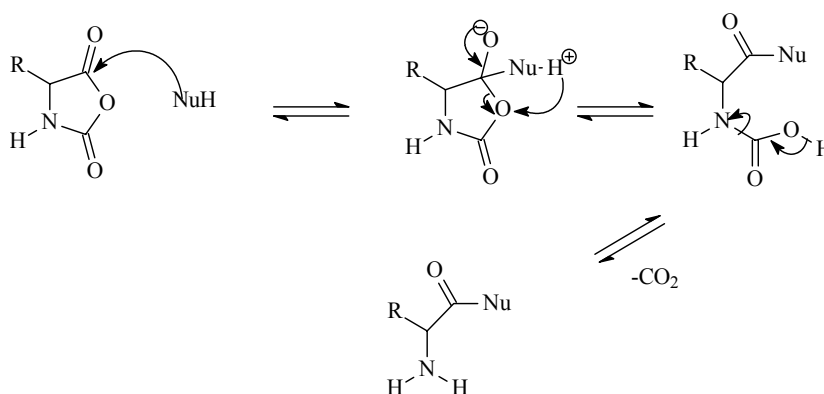


Figure 2

Réaction d'un Nucléophile NuH sur un NCA

L'adduit peut à son tour réagir sur le NCA par attaque de l'amine primaire sur le C5, et ainsi générer une réaction de polymérisation amorcée par le nucléophile.

Le NCA peut être activé par réaction avec une base, selon une réaction de transfert de proton (Figure 3). Cette réaction ne se produit pas si le NCA est N-substitué.

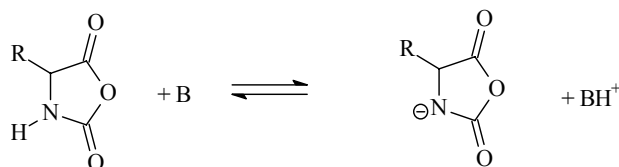


Figure 3

Activation d'un NCA par une base

Les NCA sont des substances cristallines, blanches, au point de fusion bien défini. Le point de fusion du NCA de L-glutamate de γ -benzyle est $T_f = 97^\circ\text{C}^{\text{viii}}$.

Ce sont des composés très réactifs dont la plupart doivent être stockés à des températures voisines de -20 à -30°C , dans des conditions rigoureusement anhydres. A 10°C , ils se solubilisent dans l'eau pour finir par se décomposer en acides carbamiques qui se décarboxylent immédiatement en acides aminés (Figure 4).

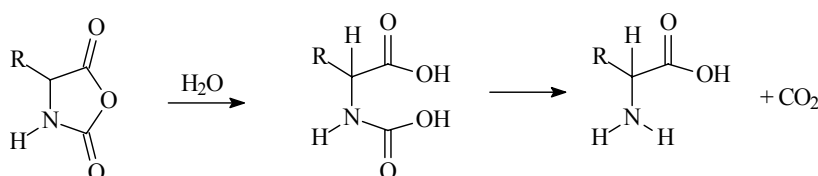


Figure 4

Décomposition hydrolytique d'un NCA

3°) Les peptides

Les conformations les plus répandues des polypeptides sont l'hélice α , proposée pour la première fois par Pauling et Corey^{ix} et le feuillet β . Ces structures qui sont aussi présentes dans les protéines étaient déjà bien connues pour avoir été observées dans les nylons à l'état solide (Figure 5).

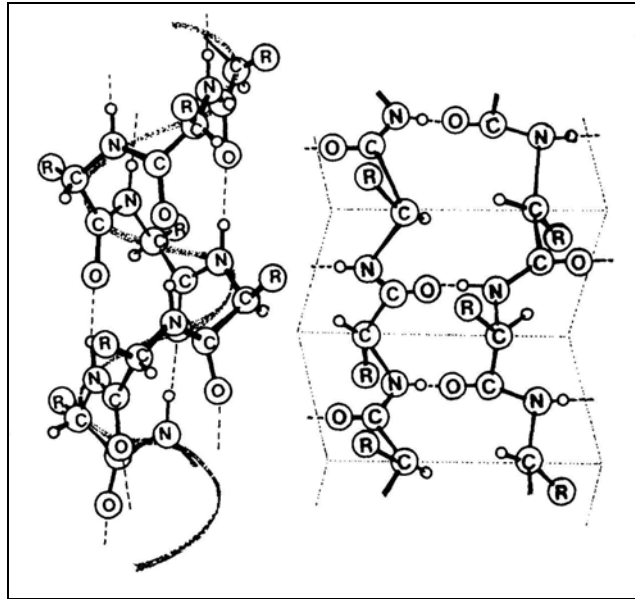


Figure 5

L'hélice α et le feuillet β

L'hélice α doit sa structure aux liaisons hydrogène intra-moléculaires. Dans sa forme initiale, elle possède un pas d'hélice formé de 13 atomes. Dans le cas du feuillet β , les liaisons hydrogène sont inter-moléculaires. Le pas de l'hélice α est d'environ 0,54nm, il tourne vers la droite pour les L-acides aminés. On recense environ 3,6 résidus par tour. En fait, le nombre de résidus par tour et les dimensions de l'hélice varient selon les angles de liaison avec les $C\alpha$ et les longueurs des liaisons hydrogène^x.

Les polypeptides n'ont pas une seule structure en hélice, mais cette conformation regroupe en fait plusieurs structures qui dépendent de l'environnement et dont les dimensions ne sont pas exactement les mêmes. La stabilité de l'hélice α résulte de deux facteurs : la formation de liaisons hydrogène et l'optimisation de l'arrangement des résidus le long de la chaîne hélicoïdale. Certains solvants ont la capacité de détruire l'arrangement hélicoïdal, induisant une transition d'hélice α en pelote statistique.

ⁱ W.H. Carothers, Chem. Rev., **1931**, 8, 353

ⁱⁱ H. Leuchs, Deutsch. Chem. Ges., **1906**, 39, 857

ⁱⁱⁱ Wessely, Z. Physiol. Chem., **1925**, 146, 72

^{iv} E.R. Blout, R.H. Karlson, J. A. C. S., **1956**, 79, 3955

^v J. Noguchi, S. Tokura, N. Nishi, Angew. Makromol. Chem., **1972**, 22, 107

^{vi} A. Elliot, E.J. Ambrose, Discuss. Faraday Soc., **1950**, 9, 246

^{vii} G.H. Bamford, R.J. Block, Cyclic Monomers, **1972**, 26, High Polymers Series, Frisch Ed., NY

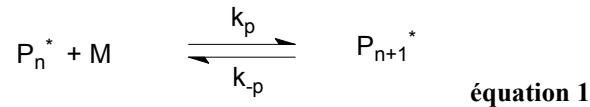
^{viii} E.R. Blout, R.H. Karlson, P. Doty, B. Hargitay, J. Am. Chem. Soc., **1954**, 76, 4492

^{ix} L. Pauling, R.B. Corey, Proc. Nat. Acad. Sci. US, **1951**, 37, 235

^x R.J. Block, Poly(γ -benzyl-L-glutamate) and other glutamic acid containing polymers, **1983**, Gordon & Breach Ed.

ANNEXE 3 : Généralités sur les polymérisations équilibrées

Une polymérisation équilibrée peut être représentée par l'équation 1 :



La constante d'équilibre s'écrit alors :

$$K_{\text{éq}} = \frac{[P_{n+1}^*]}{[P_n^*][M]} \quad \text{équation 2}$$

Or si les chaînes sont suffisamment longues, nous pouvons considérer que $[P_{n+1}^*] = [P_n^*]$, ce qui donne pour la constante d'équilibre :

$$K_{\text{éq}} = \frac{1}{[M]_{\text{éq}}} \quad \text{équation 3}$$

De plus, une polymérisation, comme toute réaction chimique est régie par la loi thermodynamique :

$$\Delta G_p^0 = \Delta H_p^0 - T\Delta S_p^0 \quad \text{équation 4}$$

où ΔG_p^0 , ΔH_p^0 et ΔS_p^0 sont respectivement l'énergie libre, l'enthalpie et l'entropie de polymérisation standards. Enfin, l'énergie libre est aussi liée à la constante d'équilibre par la relation :

$$\Delta G_p^0 = -RT \cdot \ln(K_{\text{éq}}) \quad \text{équation 5}$$

Ainsi, en combinant l'équation 3, l'équation 4 et l'équation 5 on obtient l'équation 6 reliant la concentration à l'équilibre, la température, l'enthalpie et l'entropie de polymérisationⁱ :

$$\frac{1}{[M]_{\text{éq}}} = -\frac{\Delta H_p^0}{RT} + \frac{\Delta S_p^0}{R} \quad \text{équation 6}$$

La réaction de polymérisation n'est possible que si l'enthalpie libre (ΔG_p^0) est négative. Ainsi, d'après l'équation 4, plusieurs cas peuvent se présenter :

Si $\Delta H_p^0 < 0$ et $\Delta S_p^0 > 0$: la polymérisation se produit quelle que soit la température.

Si $\Delta H_p^0 > 0$ et $\Delta S_p^0 < 0$: la polymérisation est impossible.

Si $\Delta H_p^0 > 0$ et $\Delta S_p^0 > 0$: il existe une température de seuil (T_s) en dessous de laquelle la polymérisation n'a pas lieu.

Si $\Delta H_p^0 < 0$ et $\Delta S_p^0 < 0$: il existe une température plafond (T_c) au-delà de laquelle on assiste à la dépolymérisation des macromolécules.

Dans la plupart des polymérisations par ouverture de cycle, les enthalpies et entropies de polymérisation sont négativesⁱⁱ. En effet, l'ouverture de cycle est exothermique et libère de l'énergie ($\Delta H_p^0 < 0$) et le plus faible degré de liberté existant dans le polymère par rapport au monomère rigide entraîne une diminution de l'entropieⁱⁱⁱ. Ainsi, pour ce type de polymérisation, il existe une température plafond (T_c) que nous pouvons calculer en utilisant l'équation 7 :

$$T_c = \frac{\Delta H_p^0}{\Delta S_p^0 + R \ln[M]} \quad \text{équation 7}$$

Un des facteurs influençant la valeur de la température plafond (T_c) est celle de la concentration initiale en monomère. Plus cette dernière est élevée et plus la valeur de la température est faible. C'est pourquoi on donne généralement la valeur de T_c pour $[M]_0 = 1 \text{ mol/L}$ (car $R \ln[M] = 0$). Enfin, pour un monomère donné, d'autres facteurs influencent aussi les paramètres thermodynamiques de la polymérisation : la nature du solvant^{iv}, la température, la pression et la cristallisation éventuelle du polymère pendant la polymérisation^v.

ⁱ H. Sawada, Reviews in Macromolecular Chemistry, **1970**, 4, 313

ⁱⁱ Polymeric Materials Encyclopedia, Salamone Eds., **1996**, 10

ⁱⁱⁱ D.J. Brunelle, ROP, Mechanisms, Catalysis, Structure, Utility, Hanser Eds., **1993**

^{iv} K.J. Ivin, W.K. Busfield, Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Wiley, New-York, **1988**, 2, 555

^v K.J. Ivin, Makromol. Chem., Macromol. Symp., **1991**, 42/43, 1

Le sujet de cette étude consiste en la synthèse de nouveaux copolymères, associatifs en milieux aqueux, susceptibles d'encapsuler une protéine. Ces copolymères doivent être biocompatibles et biorésorbables pour une application biomédicale éventuelle et doivent de plus être amphiphiles. Le but de ce manuscrit est ainsi de décrire la synthèse de copolymères à blocs amphiphiles. L'association des blocs hydrophobes du copolymère doit en effet permettre la formation de particules en émulsion aqueuse.

La partie hydrophobe des copolymères à blocs est constituée de polylactide synthétisé par polymérisation par ouverture de cycle du L-lactide. Le bloc hydrophile est constitué de poly(acide glutamique), peptide obtenu en deux étapes. On synthétise le poly(glutamate de benzyle) lors de la première étape par polymérisation par ouverture de cycle d'un anhydride de Leuchs, le N-carboxyanhydride de L-glutamate de benzyle. On déprotège ensuite les fonctions acide de ce polymère encore hydrophobe, le poly(glutamate de benzyle), pour obtenir le poly(acide glutamique), hydrophile.

L'architecture du copolymère à blocs est obtenue à l'aide d'un amorceur difonctionnel qui amorce dans un premier temps la polymérisation du L-lactide. Le premier bloc de polylactide ainsi synthétisé possède en bout de chaîne un groupement susceptible d'amorcer la polymérisation du N-carboxyanhydride de L-glutamate de benzyle. On synthétise donc dans un deuxième temps le copolymère à blocs hydrophobes et on déprotège les fonctions acide du deuxième bloc pour obtenir le copolymère à blocs amphiphiles.

The aim of this study is to synthesize new auto-associative copolymers in order to encapsulate a protein in water. These copolymers have to be biocompatible and bioassimilable for a possible biomedical application. Further more, they have to be amphiphilic. This document aims at describing the synthesis of amphiphilic bloc copolymers. The association of the hydrophobic blocs of the copolymer in water should entail to core-shell particle formation in aqueous emulsion.

The hydrophobic part of the copolymers is a polylactide synthesized by ring opening polymerization of the L-lactide. The hydrophilic bloc is a poly(glutamic acid) peptide synthesized in two steps. We first synthesized a poly(benzyl glutamate) bloc by ring opening polymerization of a Leuch's anhydride, the N-carboxyanhydride of benzyl L-glutamate. Then we unprotect the acidic functions of this poly(benzyl glutamate), still hydrophobic polymer to yield the hydrophilic poly(glutamic acid).

The architecture of this bloc copolymer is obtained thanks to a difunctional initiator that initiates the polymerization of the L-lactide in a first step. This polylactide first bloc has an end-group that can initiate the polymerization of the N-carboxyanhydride of benzyl L-glutamate. So we synthesize in a second step the hydrophobic bloc copolymer and we unprotect the acidic functions of the second bloc to yield the amphiphilic bloc copolymer.