

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Polyamines hydrosolubles dérivés du dextran et du N-(isopropylacrylamide):

Synthèse, propriétés et applications

par

Denis Dubé

Département de chimie

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Professeur Julian Zhu, Président-rapporteur

Professeur Françoise Winnik, Directrice de recherche

Professeur Huy Ong, Codirecteur

Professeur François Brisse, Membre du jury

Mémoire accepté le:



Université de Montréal

**Polyamines hydrosolubles dérivés du dextran et du N-(isopropylacrylamide):
Synthèse, propriétés et applications**

par

Denis Dubé

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M. Sc.)

en chimie

Denis Dubé ©

août 2001

QD

3

N54

2002

N. 003

Sommaire

L'objectif principal de ce travail est la préparation de polymères aminés hydrosolubles pour des applications en biotechnologie telles que les immunodosages d'analytes biologiques et le transport *in vivo* d'agents thérapeutiques. Les amines attachées le long du polymère servent de point d'ancrage de groupements fonctionnels tels le folate et la biotine.

Deux types de polyamines hydrosolubles ont été préparés : d'une part, le dextran, modifié par greffage de branches aminées de différentes longueurs (6 et 12 atomes) et avec différents taux de substitution (1.3 et 1.7 mmol/g), d'autre part, des copolymères de N-isopropylacrylamide, un monomère hydrosoluble, et de N-BOC-N'-(éthylènedioxy)-bis(éthylacrylamide), un monomère hydrosoluble et aminé lorsque déprotégé. Dans ce cas-ci les taux d'amines variés (1.3 à 3.6 mmol/g) ont été obtenus par copolymérisation de différents rapports de ces deux monomères.

Les polymères synthétisés ont été caractérisés par chromatographie d'exclusion stérique, par résonance magnétique nucléaire ainsi que par différentes autres méthodes spectroscopiques, dont l'infrarouge, l'ultraviolet et la fluorescence.

L'efficacité de ces différents polymères dans le cadre des deux applications biotechnologiques mentionnées est étudiée par nos collaborateurs. Plusieurs résultats intéressants ont été obtenus. Par exemple, un copolymère aminé de N-

isopropylacrylamide auquel de l'acide folique a été greffé a démontré une habileté intéressante à cibler les cellules cancéreuses (KB).

Mots clés : polyamine, dextran, poly(N-isopropylacrylamide), N-amine-N'-(éthylènedioxy)-bis(éthylacrylamide), acide folique, polymères amphiphiles.

Abstract

The objective of the work is to prepare new aminated hydrosoluble polymers for biotechnological applications like immunoassays of biological analytes and for controlled drug delivery in *in vivo* systems. The amino groups serve to link various functional groups of interest like folate and biotine.

Two types of hydrosoluble polyamines have been prepared: first, dextran was modified by attaching aminated branches of various length (6 to 12 atoms) in various ratios of amines (1.3 and 1.7 mmol/g) and second, copolymers of N-isopropylacrylamide and N-BOC-N'-(ethylenedioxy)-bis(ethylacrylamide), a monomer which presents an amino group when deprotected. In this case, various ratios of these two monomers brought copolymers with different amine ratios (1.3 to 3.76 mmol/g).

The obtained polymers were characterized by steric exclusion chromatography, nuclear magnetic resonance and different other spectroscopic techniques like infrared, ultraviolet-visible and fluorescence.

The efficiency of these polymers in the two biotechnological applications named previously are studied by our coworkers. Many interesting results have been obtained.

For example, an aminated copolymer of N-isopropylacrylamide on which folic acid has been linked has shown an interesting ability to target cancer cells (KB).

Key words: polyamine, dextran, poly(N-isopropylacrylamide), N-amine-N'-(ethylenedioxy)-bis(ethylacrylamide), folate, fluorescein, amphiphilic polymers.

Table des matières

Sommaire	II
Abstract	IV
Table des matières	VI
Liste des abréviations	X
Liste des tableaux	XIII
Liste des figures	XIV
Remerciements	XVII
1. Introduction	1
1.1 Immunodosage avec la spectroscopie de fluorescence en temps résolu	1
1.1.1 Principes	1
1.1.2 Amélioration de la technique par l'introduction de polymères aminés hydrosolubles	6
1.2 Ciblage via folates de cellules cancéreuses	8
1.2.1 Action de l'acide folique	8
1.2.2 Livraison d'agents thérapeutiques aux cellules cancéreuses par des liposomes modifiés	9
1.3 Système de polymères hydrosolubles aminés envisagé	11
1.3.1 Dextrans aminés	11

1.3.2	Poly[N-isopropylacrylamide-co-N-amine-N ² -(éthylènedioxy)-bis (éthylacrylamide)] (poly(NIPAM-co-EDBEAm) ou PNIPAM-NH ₂)	12
1.4	Projet de recherche	16
2.	Partie expérimentale	17
2.1	Produits utilisés	17
2.2	Méthodes physiques de caractérisation	18
2.2.1	RMN	18
2.2.2	FTIR	18
2.2.3	Ultra-violet	18
2.2.4	Spectroscopie de fluorescence	19
2.2.5	Détermination des masses molaires (GPC et viscosimétrie)	19
2.2.6	Détermination du contenu en amines libres des polymères (TNBS/UV et RMN ¹ H)	20
2.2.7	Détermination du contenu en folates des polymères	22
2.2.6	Détermination du contenu en fluorescéine des polymères	22
2.3	Synthèse de dextrans aminés	23
2.3.1	Synthèse de carboxyméthyl-dextran (CMD)	23
2.3.2	Synthèse de CMDA 1 (couplage avec EEDQ)	24
2.3.3	Synthèse de CMDA (couplage avec EDC)	25
2.4	Synthèse du monomère EDBEAm protégé (BOC)	26
2.4.1	Synthèse de EDBE-N-BOC monoprotégé (1)	26

2.4.2	Synthèse du monomère: N-BOC-N'-(éthylènedioxy)-bis (éthylacrylamide) (N-BOC-EDBEAm) (2)	27
2.5	Synthèse des polymères	28
2.5.1	Synthèse des copolymères de NIPAM et d'EDBEAm	28
2.5.2	Synthèse des copolymères de NIPAM, de EDBEAm et d'octadécylacrylamide	32
2.5.3	Modification des poly(NIPAM-co-EDBEAm) (avec et sans octa- décylacrylamide) par greffage d'acide folique et/ou de fluorescéine	34
3.	Résultats et discussion	37
3.1	Dextrans aminés	37
3.1.1	Synthèses	37
3.1.2	Caractérisations	42
3.2	PNIPAM aminés	51
3.2.1	Monomère N-BOC-EDBEAm: synthèse	51
3.2.2	Co-polymères de NIPAM et de EDBEAm: synthèse	54
3.2.3	Co-polymères de NIPAM, de EDBEAm et de N- <i>n</i> -octadécylacryl- amide: synthèse	56
3.2.4	Caractérisations	57
3.3	Polyacrylamides aminés avec des folates et fluorescéine liés	70
3.3.1	Attachement de l'acide folique sur les polyacrylamides aminés	70
3.3.2	Fixation de la fluorescéine sur les polyacrylamides aminés	74

4. Conclusion	78
4.1 Carboxyméthyl-dextrans aminés	78
4.2 Poly(N-isopropylacrylamides) aminés	78
Références	80
Annexe A: Spectres RMN ^1H	84
Annexe B: Spectres IR	88

Liste des abréviations

AIBN	2,2'-azo-bis(isobutyronitrile)
B	Biotine
BCPDA	4,7-bis-(chlorosulfofophenyl)-1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxylic acid
BOC	<i>tert</i> -Butoxycarbonate
BOC-O-BOC	Di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate
cac	Concentration d'aggrégation critique
CM	Carboxyméthyle
CMD	Carboxyméthyl-dextran
CMDA	Carboxyméthyl-dextran aminé
d	Doublet
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTAF	Dichlorotriazine de fluorescéine
EDBE	2,2'-(Éthylenedioxy)-bis(éthylamine)
EDBEAm	N-amine-N'-(éthylendioxy)-bis(éthylacrylamide)
EDA	Éthylènediamine
EDC	Hydrochlorure de 1-[3-(Diméthylamino)propyl]-3-éthylcarbodiimide
EEDQ	N-éthylloxycarbonyl-2-éthyl-1,2-dihydroquinoline

FA	Acide folique
GPC	Chromatographie à perméation de gel
Hz	Hertz
IR (FTIR)	Infrarouge
L	Litre
LCST	Température critique minimale de solubilisation
m	Multiplet
mg	Milligramme
MHz	Méga-Hertz
mL	Millilitre
mmol	Millimole
\overline{M}_n	Masse molaire moyenne en nombre
\overline{M}_p	Masse molaire moyenne en poids
\overline{M}_v	Masse molaire moyenne viscosimétrique
N-BOC-EBDEAm	N-BOC-N'-(Ethylenedioxy-bis(ethylacrylamide))
NIPAM	N-isopropylacrylamide
ODA	N- <i>n</i> -octadécyleamine
PNIPAM-NH ₂	Poly[N-isopropylacrylamide-co-N-amine-N'-(éthylènedioxy)-bis(éthylacrylamide)]
PNIPAM-NH-BOC	Poly[N-isopropylacrylamide-co-N-BOC-N'-(éthylènedioxy)-bis(éthylacrylamide)]

PNIPAM-NH-DTAF	Poly[N-isopropylacrylamide-co-N-amine-N'-(éthylènedioxy)-bis(éthylacrylamide)-co-N-DTAF-N'-(éthylènedioxy)-bis(éthylacrylamide)]
PNIPAM-NH-FA	Poly[N-isopropylacrylamide-co-N-amine-N'-(éthylènedioxy)-bis(éthylacrylamide))-co-N-folate-N'-(éthylènedioxy)-bis(éthylacrylamide)]
PNIPAM-NH-ODA	Poly[N-isopropylacrylamide-co-N-amine-N'-(éthylènedioxy)-bis(éthylacrylamide)-co-N- <i>n</i> -octadécylacrylamide]
ppm	Partie par million
PVA	Polyvinylamine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s	Singulet
SA (ou S)	Streptavidine
THF	Tétrahydrofurane
TNBS	Acide 1,3,5-trinitro-4-benzènesulfonique
UV/VIS	Ultraviolet-visible

Liste des tableaux

Tableau 3.1	Caractéristiques des dextrans aminés	50
Tableau 3.2	Caractéristiques des PNIPAM aminés	69
Tableau 3.3	Incorporation de l'acide folique et de la fluorescéine	77

Liste des figures

Figure 1.1	Mécanisme de transferts d'énergie	3
Figure 1.2	Complexe europium-BCPDA	4
Figure 1.3	Structure de la biotine	5
Figure 1.4	Immunodosage « deux sites » non-compétitifs d'un antigène	5
Figure 1.5	Immunodosage « deux sites » non-compétitifs d'un antigène avec utilisation d'un polymère aminé	7
Figure 1.6	Structure de l'acide folique	9
Figure 1.7	Complexe liposome-polymère-folate	10
Figure 1.8	Amination du dextran	11
Figure 1.9	Poly(NIPAM-co-EDBEAm) (PNIPAM-NH ₂)	13
Figure 1.10	Poly(NIPAM-co-EDBEAm-co-octadécylacrylamide) (PNIPAM-NH-ODA)	15
Figure 2.1	N-BOC-N'-EDBEAm	27
Figure 3.1	Schéma général de la synthèse des dextrans aminés	38
Figure 3.2	Synthèse de CMDA 1 suivant la méthode de Dellacherie	39
Figure 3.3	Mécanisme de la carboxyméthylation	39
Figure 3.4	Mécanisme de l'activation avec EEDQ	40
Figure 3.5	Formation de CMDA (EDC)	42
Figure 3.6	Spectre ¹ H RMN du dextran T40 (D ₂ O)	45
Figure 3.7	Spectre ¹ H RMN du CMD synthétisé selon la méthode de Dellacherie (D ₂ O)	45
Figure 3.8	Spectre ¹ H RMN du CMDA 1 (D ₂ O)	46

Figure 3.9	Spectre ^1H RMN du CMDA 2 (D_2O)	47
Figure 3.10	Synthèse du monomère N-BOC-EDBEAm (2)	51
Figure 3.11	Synthèse du Poly NIPAM-co-EDBEAm (PNIPAM-NH ₂)	56
Figure 3.12	PNIPAM-NH-ODA, polymère (14)	57
Figure 3.13	Spectre RMN ^1H de l'EDBE mono-BOC-protégé (D_2O , produit 1)	59
Figure 3.14	Spectre RMN ^1H de l'EDBEAm BOC-protégé (D_2O , produit 2)	59
Figure 3.15	Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-BOC (6, CDCl_3)	61
Figure 3.16	Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH ₂ (8, D_2O)	62
Figure 3.17	Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-BOC-NH-ODA (13, CDCl_3)	64
Figure 3.18	Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-ODA (14, D_2O)	64
Figure 3.19	Spectre d'émission du pyrène (zone d'intérêt)	67
Figure 3.20	Détermination du cac du PNIPAM-NH-ODA	68
Figure 3.21	Greffe de l'acide folique (synthèse du PNIPAM-NH-FA 15)	71
Figure 3.22	Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-FA (produit 15)	73
Figure 3.23	Greffe de la fluorescéine (exemple, synthèse du PNIPAM-NH-DTAF)	75
Figure A.1	Spectre RMN ^1H de l'EDBE (CDCl_3)	84
Figure A.2	Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-BOC (3, CDCl_3)	85
Figure A.3	Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-BOC (4, CDCl_3)	85
Figure A.4	Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-BOC (5, CDCl_3)	86
Figure A.5	spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-BOC (6, CDCl_3)	86
Figure A.6	Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-BOC (7, CDCl_3)	87
Figure B.1	Spectre IR du dextran T40	88
Figure B.2	Spectre IR du CMD (Dellacherie)	88

Figure B.3 Spectre IR du CMD (Takeo)	89
Figure B.4 Spectre IR du CMDA 1	89
Figure B.5 Spectre IR du CMDA 2	90

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement la professeure Françoise Winnik qui m'a accepté au sein de son groupe de recherche. Ses conseils pertinents, sa patience et son dévouement, très appréciés, m'ont permis de mener à bien ce projet tout en me permettant de parfaire mes connaissances sur la chimie des polymères.

Je remercie le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) pour leur soutien financier, ce qui a permis la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier aussi tous mes collègues de laboratoire que j'ai côtoyés durant mon séjour dans le groupe pour les conseils judicieux qu'ils m'ont souvent donnés, pour l'ambiance agréable que nous avons su créer ensemble ainsi que pour tout le plaisir que nous avons eu.

Je tiens également à remercier mes parents pour leur soutien constant et permanent tout au long de mes études, particulièrement dans les moments difficiles. Leurs encouragements ainsi que leur amour pour moi m'ont donné les énergies nécessaires à l'achèvement de ce travail.

CHAPITRE I

Introduction

1.1 Immunodosage avec la spectroscopie de fluorescence en temps résolu

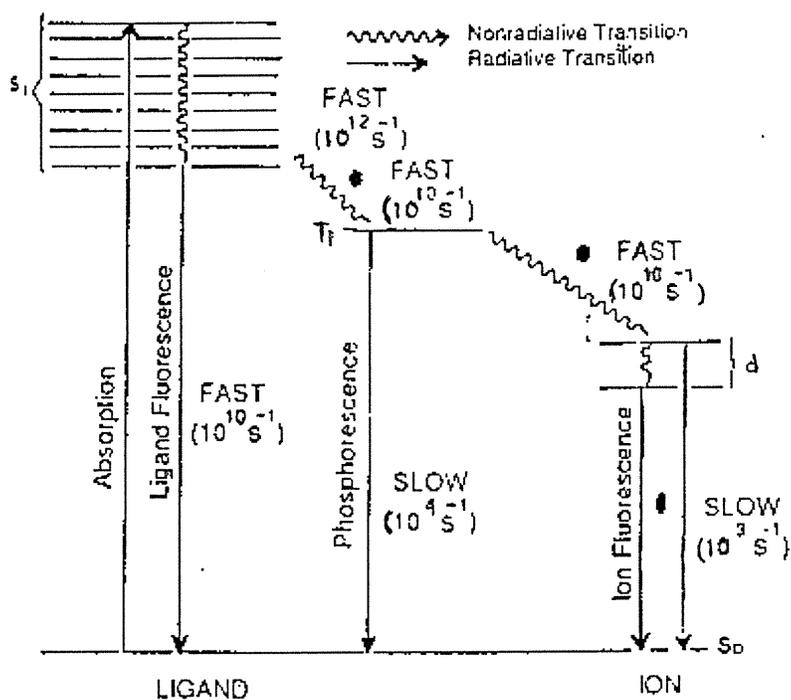
1.1.1 Principes

Dans le domaine bioanalytique, il est souvent requis de déterminer des concentrations infimes d'analytes. Il est donc important d'avoir comme outil des techniques d'analyse ultrasensibles avec des limites de détection souvent de l'ordre du $\mu\text{g/mL}$ ou pg/mL . Beaucoup de ces techniques déjà en utilisation nécessitent une liaison spécifique entre l'analyte et un réactif pour former un complexe détectable [1]. Une de ces techniques couramment utilisée dans le cadre d'immunodosages, détection de molécules biologiques comme des antigènes par exemple, est la spectroscopie de fluorescence en temps résolu d'ions de lanthanides (Eu(III) surtout) [1,2 revues]. En général, le lanthanide utilisé pour le dosage est complexé avec des molécules pouvant se lier spécifiquement à l'analyte. Avec l'assurance que le complexe est bel et bien lié à l'analyte (par exemple en effectuant l'analyse sur support solide avec des lavages pour éliminer ce qui n'a pas réagit), on quantifie l'intensité de fluorescence du complexe sur un intervalle de temps donné. La comparaison subséquente des résultats avec une courbe d'étalonnage permet la détermination quantitative de la molécule d'intérêt. Les limites de

détection rapportées pour cette technique sont de l'ordre des ng/mL aux pg/mL [1], ce qui est excellent.

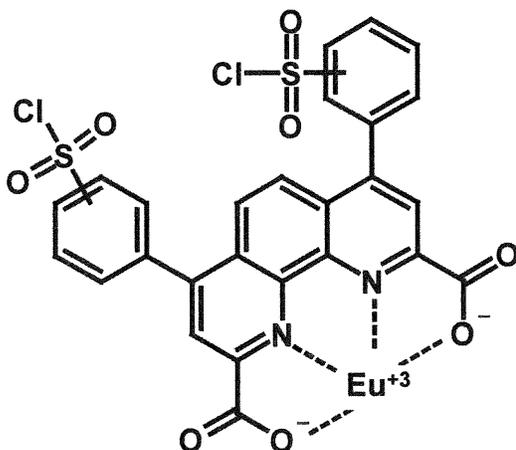
La détection d'analytes en infime concentration est possible grâce à la fluorescence de l'euporium qui lui est lié. L'euporium seul, lorsque excité, produit une radiation de fluorescence intense, mais le rendement quantique associé est faible. Cependant, lorsque l'euporium est complexé par certains ligands (voir exemples plus loin), le complexe résultant est hautement fluorescent et la détection de l'euporium peut alors être effectuée jusqu'à des concentrations de 10^{-13} mol/L [3]. Cela est dû au fait que l'absorption de radiations se fait très fortement au niveau du ligand de l'état S_0 aux états S_1 (voir Figure 1.1). Par transferts non-radiatifs, cette énergie se retrouve dans les niveaux d de l'ion euporium qui émet ensuite une radiation fluorescente par une transition $d \rightarrow S_0$ [2,4]. Cette fluorescence a plusieurs avantages, comme mis à part le fait d'être intense, d'avoir dans les meilleurs cas un déplacement de Stokes de l'ordre de 290 nm (28 nm pour la fluorescéine). Elle possède aussi une bande d'émission étroite (50% de l'émission dans un intervalle de moins de 10 nm), ce qui permet l'utilisation de filtres étroits sans trop de pertes d'énergie. Par ailleurs, les temps de vie de cette fluorescence sont longs, soit 10 à 1000 μ s comparativement à quelques nanosecondes pour les autres fluorophores [2]. Cela permet, grâce à la fluorimétrie en temps résolu (mesure de l'intensité totale de fluorescence sur un intervalle de temps), avec une instrumentation adéquate, de ne détecter que la longue fluorescence due à la détection de l'analyte et de ne pas considérer la fluorescence courte des impuretés. La détection se fait généralement entre 400 et 800 μ s de l'impulsion. Dans cet intervalle, la fluorescence de l'analyte décroît lentement, mais celle des impuretés est déjà terminée [2,5].

Figure 1.1 : Mécanisme de transfert d'énergie [2]



Un ligand qui permet à l'ion europium de fluorescer de manière optimale est l'acide 4,7-bis-(chlorosulfophényl)-1,10-phénanthroline-2,9-dicarboxylique (BCPDA, voir Figure 1.2) [6]. Ce ligand forme des complexes très stables avec l'euprium (deux BCPDA par ion Eu(III)) tout en produisant une très forte fluorescence. De plus, il possède des groupements chlorosulfophényles permettant de lier au complexe des molécules possédant des groupements aminés comme des protéines ou des polymères.

Figure 1.2 : Complexe europium-BCPDA (un seul des deux liguands est montré)



Un système universel de détection déjà développé avec ce complexe implique la streptavidine [7,8]. Il s'agit là d'une protéine comportant quatre sites de liaison pour la biotine, une vitamine possédant un acide carboxylique terminal qui peut être lié à des amines protéiques (voir Figure 1.3). Ainsi, le complexe Eu-BCPDA est lié à la streptavidine (possibilité d'environ 3 complexes d'europium par molécule de streptavidine) par réaction entre le chlorosulfophényle du BCPDA et les amines protéiques. Cela produit un nouveau complexe Eu-BCPDA-Streptavidine qui peut maintenant être lié à des molécules biologiques liées de façon covalente à la biotine [9,10]. Ainsi, à partir de ce complexe, un système d'analyse d'antigènes a été développé (immunodosage non-compétitif, voir Figure 1.4) [2]. Dans celui-ci, un anticorps spécifique à l'antigène est attaché sur un support solide. Un autre anticorps spécifique à ce même antigène est quant à lui biotynilé (lié par un lien covalent à l'acide carboxylique de la biotine), puis lié au complexe Eu-BCPDA-Streptavidine. L'antigène présent dans le

milieu est alors pris en sandwich entre les deux anticorps (Figure 1.4). Les lavages subséquent permettent d'éliminer tout complexe qui n'est pas attaché au support solide (et donc pas relié à l'antigène). Ainsi, à l'aide d'une courbe de calibration, il est possible de déterminer par ce système une concentration en antigènes dans un sérum donné avec des limites de détection infimes.

Figure 1.3 : Structure de la biotine

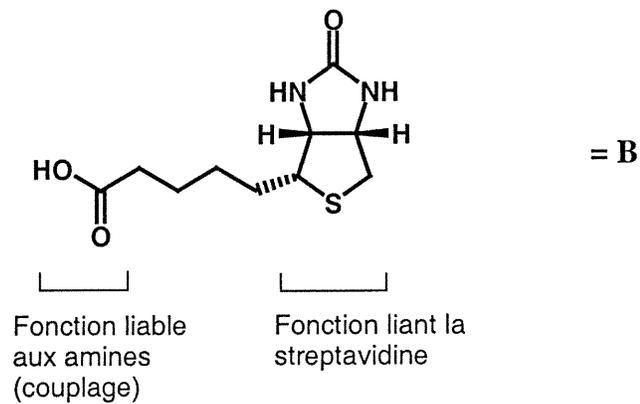
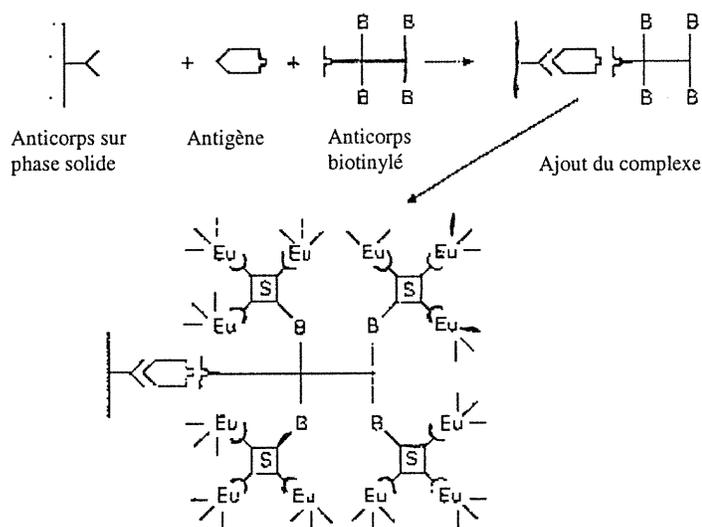


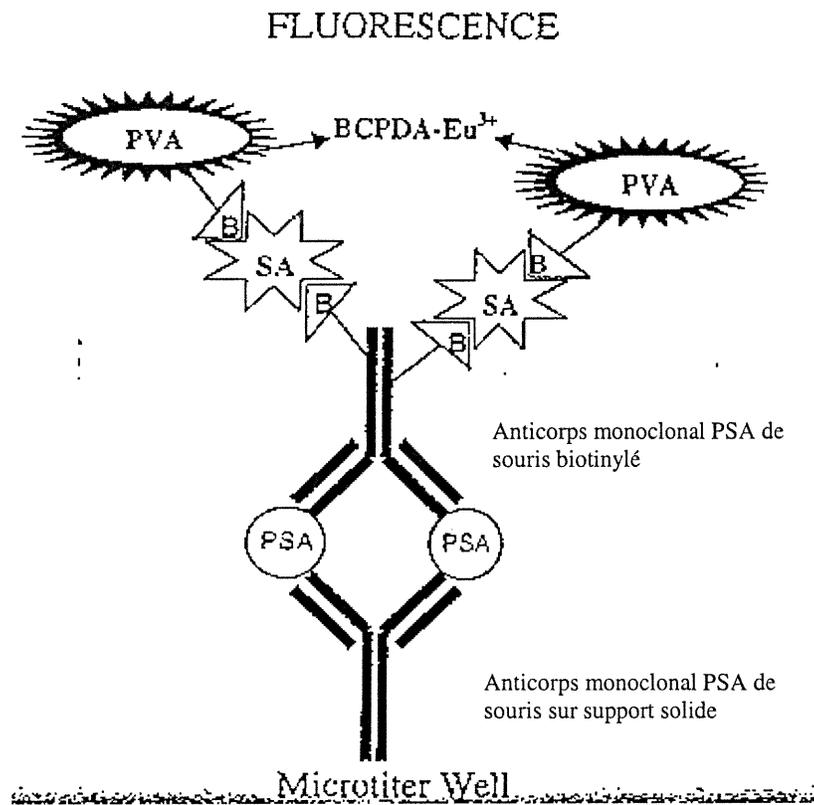
Figure 1.4 : Immunodosage « deux sites » non-compétitif d'un antigène [2]



1.1.2 Amélioration de la technique par l'introduction de polymères aminés hydrosolubles

Dans la technique d'immunodosage décrite précédemment, le complexe Eu-BCPDA est lié à la streptavidine par les fonctions amines de la protéine. Cela ne permet la fixation que d'un petit nombre de complexes Eu-BCPDA sur celle-ci. La liaison d'un plus grand nombre d'euprimums chélatés à la streptavidine aurait pour effet d'augmenter le nombre de complexes fluorescents liés à l'analyte. Pour une concentration donnée en antigènes, l'intensité de la fluorescence résultante serait plus élevée et ainsi, la limite de détection serait encore plus faible, donc meilleure. Pour réaliser cela, une stratégie intéressante consisterait à lier d'abord une grande quantité de complexes à un polymère fortement aminé par réaction entre les amines polymériques et le chlorosulfophényle du BCPDA. Les amines résiduelles du polymère seraient ensuite biotinylées, ce qui permettrait une liaison avec la streptavidine. Comme dans le cas de la technique précédente, le complexe Eu-BCPDA-polymère-streptavidine pourrait se lier à des anticorps biotinylés permettant ainsi la détection de l'antigène par immunodosage « deux sites » non-compétitifs, mais avec un rapport europium chélaté/antigène beaucoup plus élevé (Figure 1.5).

Figure 1.5 : Immunodosage « deux sites » non-compétitifs d'un antigène avec utilisation d'un polymère aminé (PVA) [11]



Le polyvinylamine (PVA) a déjà été testé dans ce système [11]. Il possède un excellent taux d'amination (23 mmol d'amines/g de polymère). Cependant, sa solubilité en milieu aqueux est faible, ce qui l'empêche de former suffisamment de complexes réactifs pour que la méthode soit efficace. La nécessité de tester de nouveaux polymères aminés qui soient de surcroît hydrosolubles s'impose et c'est l'un des objectifs de ce travail.

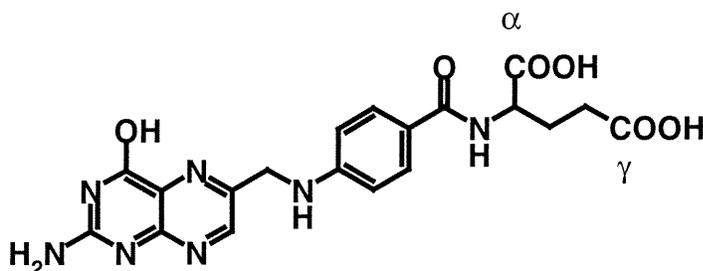
1.2 Ciblage via folates de cellules cancéreuses

1.2.1 Action de l'acide folique

En 1991, deux différents groupes de recherche ont isolé et identifié un marqueur tumoral important provenant de cancers ovariens comme étant le récepteur de l'acide folique [12, 13]. Il a aussi été démontré que ces récepteurs sont surexprimés chez une très grande variété de cellules cancéreuses en comparaison de cellules saines [13,14,15,16]. Cela est surtout vrai pour les cancers ovariens et pulmonaires [15,17], mais aussi pour les cancers du sein, du cerveau, des reins et du colon [13-17]. Cela a initié l'exploration de nouveaux modes de ciblage de cellules cancéreuses par la greffe d'acide folique sur des agents thérapeutiques et d'imageries. Les folates greffés peuvent être captés par les récepteurs à la surface de la cellule. Les conjugués de folates peuvent alors être ingérés par la cellule selon un mécanisme de potocytose (endocytose) et l'action de l'agent peut alors s'effectuer [18]. L'acide folique a ainsi été greffé à plusieurs molécules comme des protéines, anticorps et polymères aminés [13 et références citées]. Les interactions entre ces conjugués et les cellules cancéreuses ont été étudiées pour voir si les agents sont bel

et bien absorbés de manière efficace et spécifique. Cette stratégie de ciblage est actuellement à l'étude au sein de plusieurs groupes de recherche [13 et références citées]. Il apparaît, par ailleurs, que les conjugués de folates ne sont efficaces pour cibler les cancers que lorsque l'acide folique est lié au conjugué par son acide carboxylique γ (Figure 1.6) [19]. Les conjugués liés par l'acide carboxylique α ne sont pas absorbés aussi avidement par les cellules. Il est donc important de privilégier la greffe sur l'acide carboxylique γ .

Figure 1.6 : Acide folique

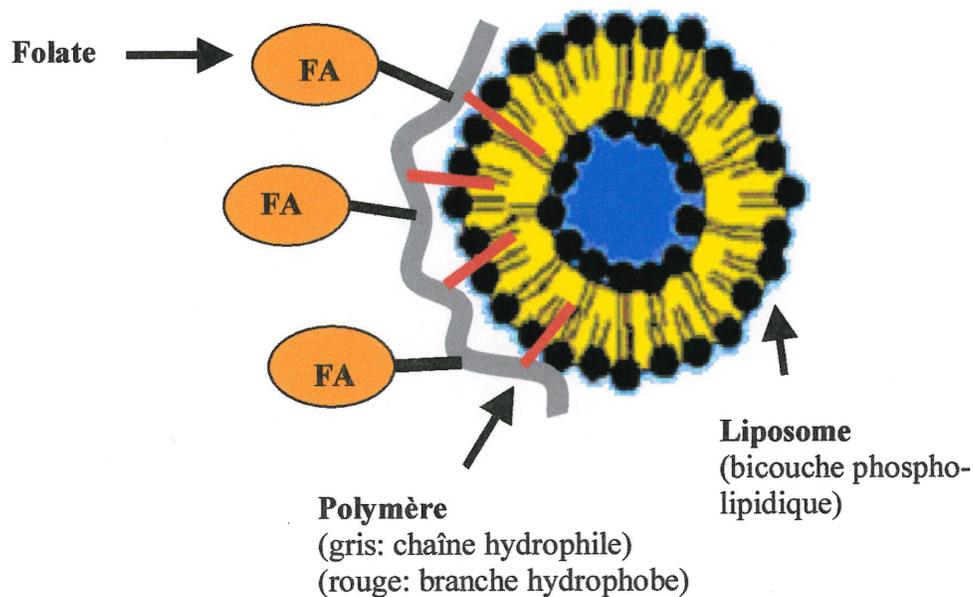


1.2.2 Livraison d'agents thérapeutiques aux cellules cancéreuses par des liposomes

Un des modes de transport d'agents thérapeutiques (drogues, etc.) dans les systèmes biologiques couramment à l'étude et potentiellement intéressant est le liposome [20]. Il s'agit d'une vésicule dont la membrane est composée d'une bicouche phospholipidique pouvant contenir une molécule hydrophile en son centre ou hydrophobe intercalée dans la membrane. Le fait de lui greffer de l'acide pourrait lui donner une

habileté à cibler les cellules cancéreuses. Le liposome serait ainsi absorbé par la cellule et le médicament serait ensuite relâché par la décomposition de la vésicule. Une stratégie envisagée pour attacher l'acide folique au liposome consiste à utiliser un polymère hydrosoluble possédant des branches hydrophobes pouvant s'ancrer dans la membrane lipidique de la vésicule ainsi que des branches liées à des folates (voir Figure 1.7).

Figure 1.7 : Complexe liposome-polymère-folate :

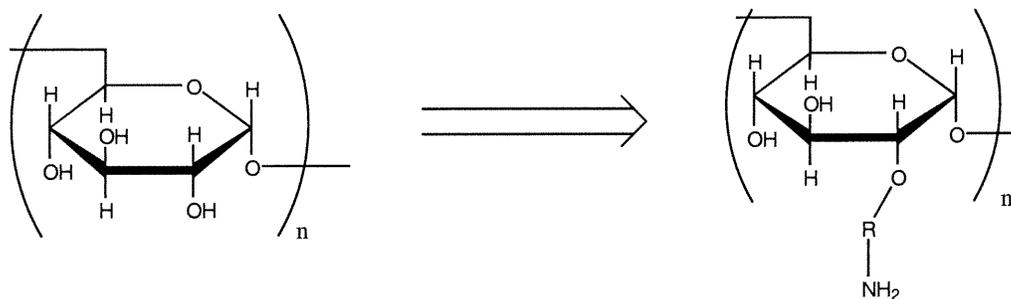


1.3 Système de polymères hydrosolubles aminés envisagé

1.3.1 Dextrans aminés

Le dextran est un polysaccharide majoritairement linéaire mais possédant des branches d'oligoglucoses de façon irrégulière (voir Figure 1.8 pour la structure) [21]. Il constitue un type de polymère de choix en ce qui a trait à son hydrosolubilité, le dextran étant rapidement solubilisé en milieu aqueux. Le fait qu'il soit disponible commercialement avec différentes masses molaires le rend intéressant. Cela permet d'avoir plus de contrôle sur la masse molaire des produits dérivés, plus que si une polymérisation initiale avait été nécessaire. Ce qui le rend aussi très intéressant, c'est qu'il possède une grande concentration de groupements hydroxyles, trois par monomère, aptes à des réactions d'addition en milieu basique. Il est ainsi possible de leur greffer des branches possédant des groupements aminés à leurs extrémités.

Figure 1.8 : Amination du dextran



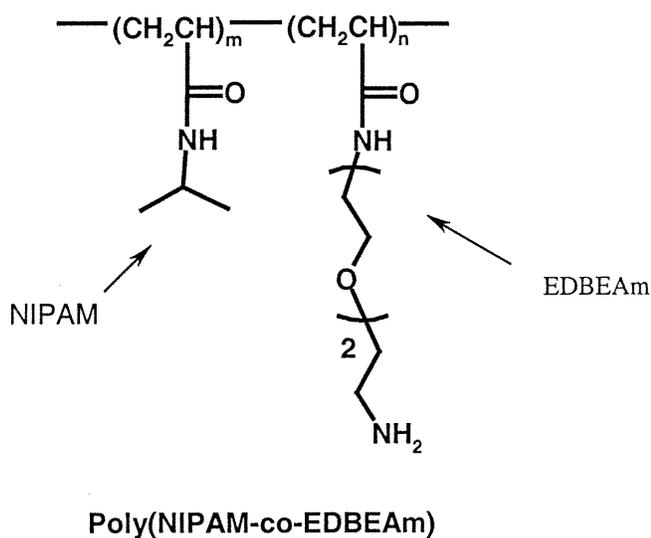
Sur les amines polymériques ainsi créées, on pourrait alors greffer de la biotine et du BCPDA. Cela constituerait alors un excellent complexe (avec l'euporium et la streptavidine) dans le cadre des immunodosages. Avec un taux d'amines incorporé important, l'hydrosolubilité du dextran aminé permettrait à cette méthode d'analyse d'être encore plus sensible par le fait que les complexes formés seraient plus disponibles à la réaction avec les protéines impliquées que s'ils étaient agglomérés entre eux (sites de réaction bloqués)[11].

1.3.2 Poly[N-isopropylacrylamide-co-N-amine-N'-(éthylènedioxy)-bis(éthylacrylamide)] (poly(NIPAM-co-EDBEAm) ou PNIPAM-NH₂)

Un autre type de polymère potentiellement intéressant pour améliorer la technique des immunodosages ainsi que pour modifier les liposomes afin qu'ils puissent cibler les cellules cancéreuses via les récepteurs de l'acide folique est le PNIPAM-NH₂ (voir structure à la Figure 1.9). Il s'agit d'un polyacrylamide où le N-isopropylacrylamide agit comme monomère hydrosoluble et biocompatible. L'EDBEAm, quant à lui, agit comme monomère aminé hydrosoluble. De plus, son groupement diéthylèneoxyde vient accroître l'hydrosolubilité du polymère et empêche la présence d'un point trouble dû au NIPAM [39]. Les polymères de NIPAM précipitent en milieu aqueux à une certaine température (point trouble) à cause du bris des ponts H entre l'amide et l'eau. Le caractère hydrophobe du NIPAM prédomine alors, ce qui incite les chaînes de polymères à s'agglomérer, ce qui cause la précipitation [22]. La présence de l'EDBEAm peut alors contrer ce phénomène. À une certaine température, même si les ponts H entre l'amide du

NIPAM et l'eau se sont brisés, les groupements éthylèneoxydes de l'EDBEAm maintiennent leurs liaisons H avec l'eau. Lorsque ce monomère est en présence suffisante dans le polymère, ce facteur est assez important pour que les chaînes ne s'agglomèrent pas et qu'elles soient solubles en milieu aqueux.

Figure 1.9 : Poly(NIPAM-co-EDBEAm) (PNIPAM-NH₂) :



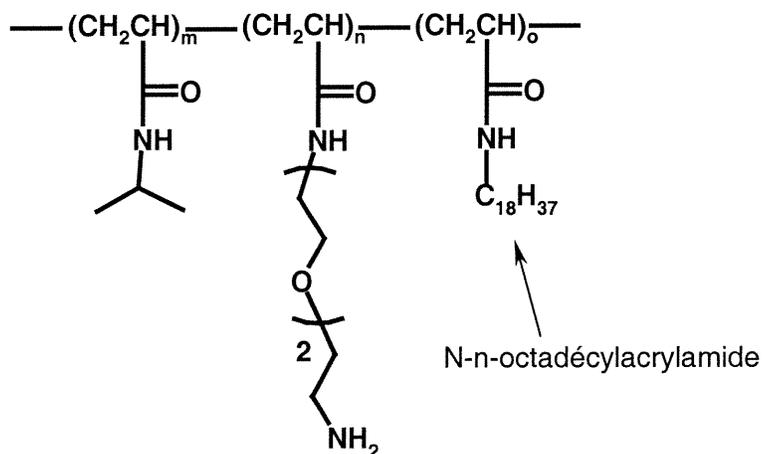
La préparation d'un tel type de polymère est simple. Il est synthétisé en général par polymérisation radicalaire d'un mélange des différents monomères en solution dans un solvant organique (THF, dioxanne) dégazé. Les monomères sont présents dans un rapport molaire prédéfini qui sera conséquemment incorporé au polymère [23]. L'initiation se fait à l'aide du 2,2'-azo-bis(isobutyronitrile) (AIBN). En libérant une molécule d'azote gazeux en se dégradant, l'AIBN produit des radicaux libres stables qui initient la polymérisation en réagissant avec un alcène d'acrylamide, ce qui crée un nouveau radical libre qui se propage à un autre acrylamide, ainsi de suite et ce pendant au

moins 16 heures. Les stratégies de synthèse sont décrites plus loin dans les chapîtres II et III.

Dans le cas des immunodosages, où une grande concentration en amines est requise, le rapport molaire de EDBEAm versus le NIPAM peut être plus élevé. Il doit cependant l'être dans les limites de la stabilité du copolymère résultant. Un grand rapport molaire d'EDBE permet au copolymère de présenter un grand nombre de groupes NH_2 . Cela lui permet de lier une grande quantité de biotine et de BCPDA, formant ainsi un complexe avec l'euprium et la streptavidine, ce qui permet potentiellement, comme dans le cas du CMDA, d'augmenter la sensibilité de la technique.

Dans le cas de la modification des liposomes pour fin de ciblage de cellules cancéreuses, l'ajout d'un comonomère hydrophobe au poly(NIPAM-co-EDBEAm) pourraient bien aussi se révéler utile. Un groupement hydrophobe qui est intéressant dans ce cas-ci est la n-octadécyle ($\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ voir Figure 1.10). Incorporé dans le copolymère sous forme d'acrylamide et avec un rapport molaire assez faible (4%), il pourrait permettre au polyacrylamide de s'ancrer dans la membrane des liposomes par interactions hydrophobes.

Figure 1.10 : Poly(NIPAM-co-EDBEAm-co-octadécylacrylamide) (PNIPAM-NH-ODA)



Poly(NIPAM-co-EDBEAm-co-octadécylacrylamide)

Les groupements amines de l'EDBEAm permettent la greffe de l'acide folique au polymère. Cette greffe se fait par couplage avec l'acide carboxylique γ de l'acide folique. De plus, les amines restantes peuvent aussi servir à la greffe d'autres molécules, comme par exemple des fluorophores, permettant l'étude de l'interaction du polymère avec les cellules cancéreuses par microscopie de fluorescence. Tous ces aspects rendent ce polymère intéressant pour le ciblage de cellules cancéreuses.

1.4 Projet de recherche

Les deux applications présentées précédemment, quoique très différentes, ont un grand potentiel de développement et d'amélioration dans leur champ respectif. Cependant, pour être améliorées, elles ont besoin des avantages et possibilités offerts par des polymères aminés et hydrosolubles.

Les polymères proposés dans la section 1.3, par leur structure, répondent parfaitement à ces deux derniers critères. De plus leurs synthèses sont simples, courtes et peu dispendieuses. Ainsi, ils ont été synthétisés et caractérisés. Leur potentiel dans le cadre de l'amélioration de ces deux méthodes pharmaceutiques décrites est actuellement à l'étude.

CHAPITRE II

Partie expérimentale

2.1 Produits utilisés

La 2,2'-(éthylendioxy)bis(éthylamine) (pureté 98%), le di-*tert*-butyldicarbonate (99+% pur), le chlorure d'acryloyle (96%), le 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide hydrochloride (EDC, 98+%), le DMSO anhydre et le dihydrate d'acide folique (97%) ont été obtenus de chez Aldrich (Oakville, ON) et utilisés sans d'autre purification. Le N-isopropylacrylamide (99%) a été obtenu de chez Fisher Scientific (Acros Organics) et purifié par recristallisation dans un mélange acétone/hexane 40/60. La fluorescéine dichlorotriazine (5-DTAF, minimum 90% de pureté) a été obtenue de Sigma (St-Louis, MO). Les solvants ont été obtenus de Anachemia (Montréal, QC). Le dextran T40 a été obtenu de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suède). La p-dioxane et le THF ont été séchés par distillation anhydre sur sodium en utilisant la benzophénone comme indicateur coloré (indicateur du caractère anhydre). La triéthylamine a été séchée par distillation anhydre sur hydroxide de potassium. Le dichlorométhane a été séché par distillation anhydre sur hydrure de calcium. Les tampons phosphate de pH 4.7 (20 mmol/L NaH_2PO_4 + HCl 0.1M), pH 7.4 (50 mmol/L Na_2HPO_4 , NaOH 3.9 mmol) et le tampon borate (12.5 mmol/L borax, 0.8 mmol NaOH) ont été préparés avec les sels correspondants.

2.2 Méthodes physiques de caractérisation

2.2.1 RMN

Les spectres RMN ^1H des monomères et polymères ont été enregistrés sur un appareil Bruker ARX-400 opérant à 400 MHz pour le proton. Les solvants utilisés étaient le chloroforme deutéré (CDCl_3) et l'oxyde de deutérium (D_2O) tenant compte de la solubilité de l'analyte. Le délai de relaxation était fixé à 5 secondes et le nombre d'enregistrements accumulés était de 48.

2.2.2 FTIR

Les échantillons de polymère sont préparés en mélangeant le produit pulvérisé avec du bromure de potassium spectrograde dans un rapport d'environ 1 : 5 p/p, puis en fabriquant une pastille par pression (environ 200 bar) à l'aide d'une presse hydraulique. Les spectres infrarouges sont ensuite mesurés dans un intervalle de nombres d'onde compris entre 3600 et 500 cm^{-1} à l'aide d'un appareil Bomem Hartmann & Braun IR-spectrometer. Le traitement des données et résultats s'est faite avec le logiciel Bomem Grams/32 (version 4.04).

2.2.3 Ultra-violet

Les spectres UV ont été enregistrés sur un appareil Hewlett-Packard 8452A diode array en utilisant le logiciel HP8452Win basé sur Windows 3.1. Les spectres de solutions dans des cuvettes en quartz 1.0 cm ont été mesurés à la température de la pièce sans aucun contrôle de température. Les intervalles de longueur d'onde UV auxquels

l'absorbance est mesurée varient selon l'expérience. En général, le spectre du solvant donné servant de blanc a ensuite été automatiquement soustrait de l'échantillon par le logiciel.

2.2.4 Spectroscopie de fluorescence

Des solutions de polymère amphiphile dans de l'eau saturée de pyrène (filtrée) ont été préparées selon un grand intervalle de concentrations (de 10^{-4} g/L à 5 g/L). Les spectres de fluorescence de ces solutions ont été enregistrés sur un spectromètre SPEX Industries Fluorolog 212 muni d'un système d'analyse des données DM3000F. Les fentes ont été fixées à 1.5 nm pour l'excitation et à 0.5 nm pour l'émission. Les échantillons ont été excités à 334 nm et la fluorescence a été détectée et enregistrée entre 360 nm et 420 nm. L'intensité de fluorescence des pics caractéristiques d'émission du pyrène I_1 (374 nm) et I_3 (385 nm) a été obtenue. Les rapports d'intensité I_1/I_3 ont été calculés et tabulés en fonction de la concentration en polymère.

2.2.5 Détermination des masses molaires

2.2.5 i) Chromatographie à perméation de gel (GPC)

Du polymère (environ 5 mg) a été dissout dans du nitrate de sodium aqueux (0.1 mol/L, 10 mL). Un échantillon de cette solution (0.050 mL) est ensuite injecté dans un système Waters Millipore de chromatographie liquide (pompe Waters 510 HPLC, colonne GPC Ultrahydrogel maintenue à une température de 35 °C, réfractomètre différentiel Waters

410, détecteur d'absorbance UV Waters 486 et programme d'opération Millennium 2010) sous flot d'éluant (nitrate de sodium aqueux dégazé 0.1 mol/L) à débit constant de 0.7 mL/minute. La colonne (exclusion stérique) sépare les molécules en fonction de leur volume hydrodynamique. Les masses molaires \overline{M}_n , \overline{M}_p ainsi que l'indice de polydispersité $\overline{M}_p/\overline{M}_n$ sont alors déterminés par comparaison des temps de rétention avec une courbe de calibration utilisant des standards de Pullulans de masse molaire connue et avec de faibles polydispersités (Polymer Science).

2.2.5 ii) Viscométrie

Du polymère (environ 50 mg,) a été solubilisé dans du THF (distillé anhydre). La viscosité intrinsèque ($[\eta]$) du polymère a été déterminée à l'aide d'un viscosimètre (Size 75 Cannon-Ubbelohde Semi-Micro Dilution Viscometer No M469) par mesure de viscosité spécifique (η_{sp}) à différentes concentrations. À partir de 2 mL de cette solution (env. 25 g/L), les mesures ont été effectuées à 27°C. À partir de la viscosité intrinsèque, à l'aide de l'équation de Mark-Houwink-Sakaruda $[\eta] = K(M)^a$ ($K=10^{-3.31}$, $a=0.78$ [24]), la masse molaire a pu être déterminée.

2.2.6 Détermination du contenu en amines libres des polymères

2.2.6 i) Méthode TNBS/UV [25]

Le polymère aminé (amine déprotégée, 5 mg) a été traité avec une solution aqueuse d'acide 1,3,5-trinitro-4-benzenesulfonique (TNBS, 0.01 mol/L, 2.0 mL) à 40 °C pendant une période de 2h. La solution est refroidie à température ambiante, diluée par l'ajout de

THF (4 mL pour solubiliser le précipité formé). Le volume est complété à 10 mL par l'ajout d'une solution eau/THF 1:2 v/v. L'absorbance de cette solution est mesurée à 340 nm et comparée à celle d'une solution de TNBS (sans polymère) traitée de la même façon. À l'aide de la loi de Beer ($A = \epsilon lc$; A = absorbance, ϵ = coefficient d'extinction L/mol cm, c = concentration mol/L et l est la longueur du trajet optique) et un A connu (A polymère – A TNBS mesurés), ϵ (8700, valeur mesurée à partir d'étalons N-BOC-EDBE monoprotégés dont le contenu aminé est connu) et l (1 cm), il était ainsi possible de déterminer le contenu en amines libres de l'échantillon et ainsi donc du polymère.

2.2.6 ii) Détermination du contenu en amines par RMN ^1H :

À l'aide des spectres RMN ^1H des poly(NIPAM-co-N'-BOC-N-EDBE acrylamides), il était possible de déterminer facilement le rapport entre les deux monomères composants ces polymères (NIPAM et N'-BOC-N-EDBE acrylamide, ce dernier comportant l'amine primaire protégée) à l'aide de l'assignation des pics et de l'intégration des protons qu'ils représentent. Ainsi, en connaissant le rapport des monomères, le même avant et après déprotection ainsi que leur masse molaire respective, par simples calculs, il était alors possible de déterminer le nombre de moles d'amines par masse de polymère (amine protégée ou non). Par exemple, le *tert*-butyle du BOC engendre un singulet à 1.43 ppm (9 protons) et les méthyles du NIPAM forment un singulet à 1.14 ppm (6 protons). Dans le cas d'un copolymère de NIPAM:EDBEAm-protégé 80 :20 environ (produit **3**), le rapport d'intégration de ces deux pics 1.43ppm/1.14ppm égale 1/3, c'est à dire 18 BOC pour 82 NIPAM.

2.2.7 Détermination du contenu en folates des polymères:

Le polymère (quantité connue) est dissout dans un volume donné de tampon phosphate (pH 7.4) afin d'avoir une solution de concentration (g/L) connue. Le spectre d'absorbance UV de cette solution est mesuré. L'absorbance A à 348 nm est notée. À l'aide de la loi de Beer $A = \epsilon lc$ (où ϵ (6197 L mol⁻¹ cm⁻¹ pour $\lambda = 348$ nm [13]), l (1 cm) et A sont connus), la valeur de la concentration c (mol/L) en folate est déterminée.

Exemple : Du PNIPAM-NH-FA (4.8 mg, produit **15**) est dissout dans du tampon phosphate pH 7.4 (10 mL). L'absorbance de cette solution à 348 nm est mesurée : $A=0.9997$. $A = \epsilon lc$ et c est isolé : $c = 1.613 \times 10^{-4}$ mol/L. À partir de cela, il est déterminé qu'il y a 1.613×10^{-3} mmol de folates dans 4.8 mg de polymère et donc 0.336 mmol g⁻¹.

2.2.8 Détermination du contenu en fluorescéine des polymères

Une quantité donnée de polymère est dissoute dans un volume donné de tampon borate (pH 9.0) afin d'avoir une solution de concentration (g/L) connue. Le spectre d'absorbance UV de cette solution est mesuré. L'absorbance A à 490 nm est notée. À l'aide de la loi de Beer $A = \epsilon lc$ (où ϵ (70000 L mol⁻¹ cm⁻¹ pour $\lambda = 490$ nm [26]), l (1 cm) et A sont connus), la valeur de la concentration c (mol/L) en fluorescéine est déterminée.

Exemple : 1.5 mg de PNIPAM-NH-DTAF (produit 17) est dissout dans 10 mL de tampon borate pH 9.0, puis dilués 10 fois à l'aide du même tampon. L'absorbance de

cette solution à 490 nm est mesurée : $A = 0.10013$. $A = \epsilon lc$ et c est isolé : $c = 1.43 \times 10^{-6}$ mol/L. À partir de cela, il est déterminé qu'il y a 1.43×10^{-4} mmol de folates dans 1.5 mg de polymère et donc $0.0953 \text{ mmol g}^{-1}$.

2.3 Synthèse de dextrans aminés

Note: Les équations des synthèses présentées ici se retrouvent dans le chapitre III.

2.3.1 Synthèse de carboxyméthyl-dextran (CMD) [27]

Une solution aqueuse de dextran T40 (2.5 g, 16 mmol d'unités anhydroglucose) et d'acide chloroacétique (5.14 g, 54 mmol) dans la soude (6 mol/L, 23 mL, 138 mmol) est placée dans un ballon tricol de 50 mL muni d'un condenseur et d'un agitateur magnétique. Cette solution est chauffée à $60 \text{ }^\circ\text{C}$ sous agitation pendant 1 heure. Puis, le mélange réactionnel est refroidi à la température ambiante. Le polymère est isolé par précipitation dans du méthanol (1.5 L) sous agitation. Le polymère résultant est récupéré par filtration. Une solution aqueuse de ce polymère est dialysée (membrane SpectraPor 3 MWCO 3,500) dans un bain d'eau jusqu'à conductivité constante ($0.3 \text{ } \mu\text{ mho}$). Le polymère est isolé par lyophilisation. Le produit résultant est un solide blanc.

Rendement: 93%. RMN ^1H (400 MHz, D_2O , δ ppm): 3.43-4.14 (multiplets, 16H, hydrogènes axiaux des carbones des cycles anhydroglucoses); 4.20 (multiplet, 2H, carboxyméthyle); 4.97 (s, 1H, proton anomérique); 5.16 (s, 1H, proton anomérique). FTIR (KBr, $\nu \text{ cm}^{-1}$): 1416 et 1616 (C=O carboxylate); 3376 (hydroxyles).

2.3.2 Synthèse de CMDA 1 (couplage avec EEDQ) [27]

Le pH d'une solution aqueuse de CMD (0.5053 g, approx. 1.9 mmol carboxylates / 5 mL) est ajusté à environ 3.0 (papier pHDrion) par ajout de quelques gouttes de HCl aqueux (1 N). À ce mélange réactionnel est ajoutée une solution de N-éthylloxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoline EEDQ (0.79 g, 3.11 mmol) dans du méthanol (11 mL). Cette addition se fait goutte à goutte, sur une période de 10 minutes et sous agitation. La solution résultante est ajoutée sous agitation à de l'EDA (1.1 mL). Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante sur une période de 4 heures. Le polymère résultant est isolé par précipitation dans du méthanol (1.2 L) sous agitation. Le précipité blanc est récolté par filtration. Il est ensuite dissout dans de l'eau MilliQ et purifié par dialyse de la même façon que le CMD. Le polymère est isolé par lyophilisation. Le produit résultant est un solide blanc.

Rendement: 28%. RMN ^1H (400 MHz, D_2O , δ ppm): 3.06-4.34 (multiplets, 11H, hydrogènes axiaux des carbones des cycles anhydroglucoses, CH_2 éthyle et carboxyméthyle); 4.95 (s, 0.6H, proton anomérique); 5.16 (s, 0.6H, proton anomérique). FTIR (KBr, $\nu \text{ cm}^{-1}$): 1408 et 1594 (C=O carboxylate); 1666 (C=O amide secondaire); 3407 (hydroxyles).

2.3.3 Synthèse de CMDA (couplage avec EDC) [28]

Note: la procédure suivante est la description de la synthèse du CMDA 1 (branche éthylamine). Le CMDA 2 (branche bis(éthylèneoxy)éthylamine) a aussi été synthétisé à l'aide d'une procédure semblable. Ainsi, pour celui-ci, seuls les résultats de caractérisation seront décrits.

De l'EDA (5 mL, 80 mmol) est ajouté à une solution aqueuse de CMD (0.5 g, approx. 1.9 mmol carboxylates/ 20mL). Le pH du mélange réactionnel est ajusté à environ 5 (papier pHHydriion) par ajout de HCl aqueux (6 N et 1 N). L'EDC (0.75 g, 3.9 mmol) est ajouté au mélange par petites portions sur une période de 3.5 heures. Durant cet intervalle de temps, le pH est maintenu constant à 5 par addition périodique de HCl 1N. La solution qui en résulte est dialysée comme dans le cas du N-éthylloxycarbonyl-2-éthyl-1,2-dihydroquinoline (EEDQ). La lyophilisation permet d'isoler et de sécher le polymère. Le produit est un solide blanc.

CMDA 1 : Rendement: 88%. RMN ^1H (400 MHz, D_2O , δ ppm): 3.15-4.32 (multiplets, 16H, hydrogènes axiaux des carbones des cycles anhydroglucoses, CH_2 éthyle et carboxyméthyle); 4.96 (s, 1H, proton anomérique); 5.17 (s, 0.5H, proton anomérique). FTIR (KBr, $\nu \text{ cm}^{-1}$): 1429 et 1594 (C=O carboxylate); 1655 (C=O amide secondaire); 3412 (hydroxyles).

CMDA 2 : Rendement : 79%. RMN ^1H (400 MHz, D_2O , δ ppm): 3.20 (t, 2H, CH_2NH_2); 3.56-4.20 (multiplets, 18H, hydrogènes axiaux des carbones des cycles anhydroglucoses, CH_2 éthylèneoxy et carboxyméthyle); 4.96 (s, 1H, proton anomérique);

5.16 (s, 0.9H, proton anomérique). FTIR (KBr, ν cm^{-1}): 1413 et 1603 (C=O carboxylate); 1659 (C=O amide secondaire); 3384 (hydroxyles).

2.4 Synthèse du monomère EDBEAm-BOC-protégé

La synthèse de ce monomère s'est réalisée en deux étapes qui sont la monoprotection (BOC) de la 2,2'-(ethylenedioxy)-bis(ethylamine) (EDBE) suivie de la formation d'une fonction acrylamide à partir de l'amine libre restante. Dans ce cas-ci aussi, les équations sont présentées dans le chapitre III.

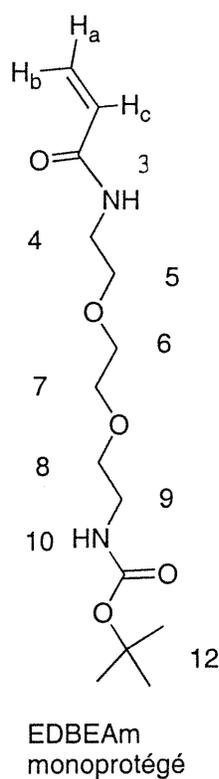
2.4.1 Synthèse de EDBE-BOC monoprotégé (1) [29] :

Une solution de di-*tert*-butyl dicarbonate (2.18g, 10 mmol) dans la dioxanne (30 mL) est ajoutée goutte à goutte sur une période de deux heures à une solution de 2,2'-(ethylenedioxy)-bis(ethylamine) (EDBE, 7.3 mL, 50 mmol) dans la dioxanne (30 mL) à la température de la pièce. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 16 heures. La solution est filtrée pour séparer le précipité blanc (impureté). Le filtrat est récupéré et concentré par évaporation du solvant. Le résidu est dissout dans de l'eau (50 mL). Le produit est ensuite extrait avec du dichlorométhane (3 X 50 mL), la phase organique est ensuite lavée avec de l'eau (2 X 100 mL) pour enlever l'excès de diamine. La phase organique est ensuite séchée avec du Na_2SO_4 et le dichlorométhane est évaporé. Le produit, huile jaune-verdâtre (N-BOC-EDBE monoprotégé), est séché sous vide.

Rendement: 87%. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1.38 (s, 11H, t-butyle et amine libre); 2.82 (t, 2H, C-4); 3.26 (q, 2H, C-9); 3.45 (t, 2H, C-5); 3.48 (t, 2H, C-8); 3.55 (s, 4H, C-6,7), 5.11 (s br., 1H, N-10).

2.4.2 Synthèse du monomère : N-BOC-N'-(éthylènedioxy)-bis(éthylacrylamide) (N-BOC-EDBEAm) (2) [30].

Figure 2.1: N-BOC-EDBEAm



Une solution de chlorure d'acryloyle (0.7 mL, 8.5 mmol) dans le dichlorométhane (10 mL) est ajoutée goutte à goutte à 0 °C à l'aide d'une ampoule à addition sur une période de 2 heures à une solution de (1) (1.94g , 8 mmol) et de triéthylamine (2.35 mL,

17 mmol) dans du dichlorométhane (40 mL). Le mélange résultant est agité pendant 1 heure tout en étant graduellement réchauffé à la température de la pièce. Le mélange réactionnel est lavé dans l'ordre avec de l'eau MilliQ (3 X 50 mL), de l'acide acétique aqueux 10 % (1N, 50 mL), une solution de bicarbonate de sodium saturée (50 mL) et une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (50 mL). La phase organique est ensuite séchée avec du sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée sous vide. Le produit résultant, huile visqueuse jaune foncé, est purifié par chromatographie flash (Gel de silice Baker 60-200 mesh en poudre, éluant 25/75 hexanes/acétate d'éthyle, $R_f = 0.1$). Le produit isolé est une huile visqueuse jaune pâle.

Rendement: 50%. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1.38 (s, 9H, t-butyle), 3.26 (q, 2H, C-9); 3.52 (mélange de multiplets, 10H, C-4-8); 4.95 (s br., 1H, N-10); 5.58 (doublet dédoublé, 1H, H(A)); 6.10 (doublet dédoublé, 1H, H(C)); 6.26 (doublet dédoublé, 1H, H(B)). $J(\text{A,B})=0.6$ Hz, $J(\text{A,C})=10$ Hz, $J(\text{B,C})=17$ Hz.

2.5 Synthèse des Polymères

Note: Les équations de ces synthèses sont présentées dans le chapitre III.

2.5.1 Synthèse des copolymères de NIPAM et de EDBEAm

(Note: les procédures suivantes décrivent la synthèse d'un polymère avec un rapport molaire NIPAM: EDBEAm 3:1 (**9**). Des polymères avec d'autres rapports (**8**, **10-12**) ont été synthétisés en suivant des procédures semblables. Ainsi, pour ceux-ci, seuls les résultats de caractérisation seront décrits.)

2.5.1 I) Synthèse de poly[N-isopropylacrylamide-co-N-BOC-N'-(éthylènedioxy)-bis(éthylacrylamide)] (PNIPAM-NH-BOC) par polymérisation radicalaire:

Du NIPAM (0.441g, 3.9 mmol) et du produit **2** (0.400g, 1.3 mmol) ont été mis dans un tricol de 50 mL propre et sec muni d'un condensateur. Le tout a été mis ensuite sous courant d'azote. De la dioxanne anhydre (10 mL) a été ajoutée et le mélange a été agité jusqu'à dissolution complète. La solution a été dégazée par bullage à l'azote pendant une période de 30 minutes. Toujours sous bullage d'azote, la solution a été portée à 60-65 °C et de l'AIBN (3.4 mg, 0.021 mmol) a été ajouté en une seule portion à la solution. Celle-ci a ensuite été laissée sous agitation et sous bullage d'azote à 60-65 degrés Celsius pendant 15 minutes, puis sous pression positive d'azote pendant 18 heures. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à température de la pièce. La solution visqueuse résultante est ensuite ajoutée goutte à goutte à 500 mL de diethyl éther (ou de l'hexanes pour les autres rapports) sous grande agitation afin de précipiter le copolymère résultant. Le polymère est isolé par filtration et dissolution dans un minimum de THF. Il est reprecipité dans de l'éther (500 mL) afin de le purifier d'avantage, isolé par filtration et séché dans un dessiccateur sous vide. Il en résulte un solide blanc (**4**). (Note : les autres copolymères de rapports différents en monomères ont été synthétisés selon cette procédure. Seulement les rapports des deux monomères de départ variaient, voir le tableau 3.2 dans la discussion).

(**4**) NIPAM:EDBEAm 3:1 Rendement: 58%. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.14 (s, 6H, méthyles du NIPAM); 1.43 (s, 9H, t-butyle du BOC); 3.31, 3.55, 3.60

(bandes larges, 12H, éthylèneoxy du N-BOC-N'-EDBEAm); 4.00 (s, 1H, CHMe₂ du NIPAM).

(3) NIPAM:EDBEAm 4:1 Rendement: 72%. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.13 (s, 6H, méthyles du NIPAM); 1.44 (s, 9H, t-butyle du BOC); 3.30, 3.55, 3.62 (bandes larges, 12H, éthylèneoxy du N-BOC-N'-EDBEAm); 3.99 (s, 1H, CHMe₂ du NIPAM).

(5) NIPAM:EDBEAm 2:1 Rendement: 76%. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.13 (s, 6H, méthyles du NIPAM); 1.42 (s, 9H, t-butyle du BOC); 3.30, 3.53, 3.62 (bandes larges, 12H, éthylèneoxy du N-BOC-N'-EDBEAm); 3.97 (s, 1H, CHMe₂ du NIPAM).

(6) NIPAM:EDBEAm 1:1 Rendement: 50%. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.13 (s, 6H, méthyles du NIPAM); 1.43 (s, 9H, t-butyle du BOC); 3.30, 3.53, 3.60 (bandes larges, 12H, éthylèneoxy du N-BOC-N'-EDBEAm); 3.99 (s, 1H, CHMe₂ du NIPAM).

(7) NIPAM:EDBEAm 2:3 Rendement: 66%. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.13 (s, 6H, méthyles du NIPAM); 1.44 (s, 9H, t-butyle du BOC); 3.30, 3.54, 3.62 (bandes larges, 12H, éthylèneoxy du N-BOC-N'-EDBEAm); 4.00 (s, 1H, CHMe₂ du NIPAM).

2.5.1 II) Déprotection du PNIPAM-NH-BOC afin de former le Poly (N-isopropylacrylamide-co-N-amine-N'-(éthylènedioxy)-bis(éthylacrylamide)

(PNIPAM-NH₂) [31]:

Du polymère (4) (50 mg, 0.08 mmol de BOC) a été mis dans un ballon de 5 mL. Du dichlorométhane (1 mL) a été ajouté pour dissoudre le polymère. Un excès d'acide trifluoroacétique (60 microlitres, 0.80 mmol) a été ajouté. La solution est agitée à la température de la pièce pendant 18 heures. À la fin de cette période, la solution était devenue inhomogène. Le dichlorométhane est évaporé sous vide et le résidu est dissout dans un minimum de THF (2 mL). Cette solution est ajoutée goutte à goutte à 50 mL de diethyl éther sous grande agitation afin de précipiter le polymère résultant. Il est isolé par filtration et séché sous vide. Résultat : solide blanc. Il est ensuite dissout dans 15 mL d'eau MilliQ. Il a réagi avec 25 mg de Dowex 2X8-400 (résine échangeuse d'ions, basique) sous agitation sur une période de 2 heures afin de décomplexer l'acide trifluoroacétique. La solution est filtrée et le polymère est isolé par lyophilisation. Résultat : Solide blanc (9) désormais soluble dans l'eau et non dans le chloroforme (inversement au produit de départ qui lui est soluble dans le chloroforme et non dans l'eau).

(9) NIPAM:EDBEAm 3:1 Rendement: 68%. RMN ¹H (400 MHz, D₂O, δ ppm): 1.11 (s, 6H, méthyles du NIPAM); 3.21, 3.36, 3.60, 3.71, 3.76 (bandes larges, 12H, éthylèneoxy du EDBEAm); 3.90 (s, 1H, CHMe₂ du NIPAM).

(8) NIPAM:EDBEAm 4:1 Rendement: 63%. RMN ^1H (400 MHz, D_2O , δ ppm): 1.17 (s, 6H, méthyles du NIPAM); 3.19, 3.35, 3.59, 3.69, 3.74 (signaux larges, 12H, éthylèneoxy du EDBEAm); 3.90 (s, 1H, CHMe_2 du NIPAM).

(10) NIPAM:EDBEAm 2:1 Rendement: 70%. RMN ^1H (400 MHz, D_2O , δ ppm): 1.05 (s, 6H, méthyles du NIPAM); 3.21, 3.36, 3.61, 3.72, 3.80 (bandes larges, 12H, éthylèneoxy du EDBEAm); 3.90 (s, 1H, CHMe_2 du NIPAM).

(11) NIPAM:EDBEAm 1:1 Rendement: 85%. RMN ^1H (400 MHz, D_2O , δ ppm): 0.76 (s, 6H, méthyles du NIPAM); 2.82, 3.00, 3.22, 3.32, 3.37 (bandes larges, 12H, éthylèneoxy du EDBEAm); 3.50 (s, 1H, CHMe_2 du NIPAM).

(12) NIPAM:EDBEAm 2:3 Rendement: 85%. RMN ^1H (400 MHz, D_2O , δ ppm): 0.99 (s, 6H, méthyles du NIPAM); 3.06, 3.00, 3.23, 3.45, 3.56 (bandes larges, 12H, éthylèneoxy du EDBEAm); 3.72 (s, 1H, CHMe_2 du NIPAM).

2.5.2 Synthèse des copolymères de NIPAM, de EDBEAm et d'octadécylacrylamide

2.5.2 I) Synthèse du PNIPAM-NH-BOC-NH-ODA (13) :

Du NIPAM (0.5474 g, 4.84 mmol), du N-(BOC)-N'-EDBE acrylamide (0.7803 g, 2.5 mmol) ainsi que du N-n-octadécylacrylamide (101.2 mg, 0.308 mmol) ont été combinés dans un tricol sec de 50 mL. De la dioxane anhydre (Distillée sur sodium, 10 mL) a été ajoutée et le tout a été dissout sur une période d'environ 30 minutes sous bullage d'azote. La température du milieu a ensuite été élevée à 60 °C. Un ajout à la solution d'azoisobutyronitrile (AIBN) en une portion (12 mg, 0.076 mmol) a été effectué. Le bullage à 60 °C a été laissé pendant encore 15 minutes. Le bullage est ensuite arrêté et la

solution est mise sous pression d'azote. Le mélange est agité sur une période de 16 heures. Celui-ci est ensuite rapidement refroidi à la température de la pièce. Le solvant est partiellement évaporé sous vide. La solution visqueuse résultante est ajoutée goutte à goutte à 500 mL de diethyl éther/hexanes 50:50 sous grande agitation afin de précipiter le copolymère. Il est isolé par filtration et dissolution dans un minimum de THF. Le polymère est reprecipité dans de l'éther/hexane (500 mL) afin de le purifier d'avantage, isolé par filtration et séchage dans un dessiccateur sous vide à une température d'environ 50 °C sur une période de 3 heures. Résultat : solide blanc légèrement jaunâtre.

Rendement: 77%. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 0.87 (t, 3H, méthyle terminal de l'octadécyle); 1.14 (s, 6H, méthyles du NIPAM); 1.45 (s, 9H, t-butyle du BOC); 2.10 (signaux larges, CH_2 de la chaîne principale); 3.31, 3.54, 3.63 (signaux larges, 12H, CH_2 des groupements oxyéthylènes); 3.99 (singulet large, 1H, CH du NIPAM).

2.5.2 II) Déprotection (enlèvement du BOC du polymère (13) afin de former le poly (NIPAM-co-EDBEAm-co-octadécyllacrylamide)) (PNIPAM-NH-ODA) (14):

Du produit (13) (250 mg, 0.44 mmol de BOC) a été mis dans un ballon de 25 mL. Du dichlorométhane (8 mL) a été ajouté et la solubilisation du polymère a été effectuée sous agitation. Un excès d'acide trifluoroacétique (280 μL , 3.60 mmol) est ajouté. La solution est agitée à température de la pièce durant la nuit (16 heures). À la fin de cette période, la solution était devenue inhomogène. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu est dissout dans un minimum de THF (environ 3 mL). Cette solution est ajoutée

goutte à goutte dans 200 mL de diethyl éther sous grande agitation afin de précipiter le polymère résultant. Le solide est redissout dans un minimum de THF et reprécipité dans de l'éther afin de purifier le polymère. Il est isolé par filtration. Résultat : poudre blanche. Elle est ensuite dissoute dans 25 mL d'eau MilliQ. Le produit a ensuite réagi avec 75 mg de Dowex 2x8-400 (résine à échange d'ions, fortement basique) sous agitation sur une période de 2 heures (décomplexation du TFA). La solution est filtrée et le polymère, un solide blanc hydrosoluble, est isolé par lyophilisation.

NIPAM:EDBEAm:octadécyle 63:33:4 Rendement: 59%. RMN ^1H (400 MHz, D_2O , δ ppm): 0.89 (t, 3H, méthyle terminal de l'octadécyle); 1.14 (s, 6H, méthyles du NIPAM); 3.19, 3.38, 3.61, 3.71, 3.76 (bandes larges, 12H, éthylèneoxy du EDBEAm); 3.90 (s, 1H, CHMe_2 du NIPAM).

2.5.3 Modification des poly(NIPAM-co-EDBEAm) (avec et sans octadécylacrylamide) par greffage d'acide folique et/ou de fluorescéine:

2.5.3 I) Greffe d'acide folique: Exemple: Synthèse de Poly[N-isopropylacrylamide-co-N-amine-N'-(éthylènedioxy)-bis(éthylacrylamide))-co-N-folate-N'-(éthylènedioxy)-bis(éthylacrylamide bis(éthylacrylamide))] (PNIPAM-NH-ODA-NH-FA) (16) [13,31] :

(Note: La procédure suivante a aussi été utilisée pour lier l'acide folique au polymère (9) pour former le produit (15), produit auquel on a ensuite lié la fluorescéine.)

De l'acide folique (59 mg, 0.12 mmol) est dissout dans du DMSO anhydre (2 mL). De l'EDC (53 mg, 0.28 mmol) est ensuite ajouté à cette solution et dissout. La solution est agitée pendant 1 heure. Du PNIPAM-NH-ODA (**14**) (100 mg, 0.22 mmol d'amines) est dissout dans un tampon phosphate pH 4.7 (25 mL). À cette solution est combiné le mélange d'EDC/acide folique. Le mélange réactionnel est agité durant la nuit (16 heures) à la température de la pièce tout en protégeant le mélange de la lumière avec un papier d'aluminium. Le pH est ensuite porté à 9.0 avec du NaOH dilué afin de solubiliser les dérivés d'acide folique. La solution est dialysée pendant 3 jours contre un tampon phosphate (pH 7.4) afin d'éliminer le folate résiduel ainsi. Elle a ensuite dialysée pendant 3 jours contre de l'eau MilliQ pour éliminer les sels présents. Le produit, un solide jaune, est isolé par lyophilisation.

(**16**) NIPAM:EDBEAm:octadécyle:folate 63:30:4:3 Rendement: 50%. RMN ^1H (400 MHz, D_2O , δ ppm): 0.89 (t, 3H, méthyle terminal de l'octadécyle); 1.14 (s, 6H, méthyles du NIPAM); 3.19, 3.38, 3.61, 3.71, 3.76 (bandes larges, 12H, éthylèneoxy du EDBeAm); 3.90 (s, 1H, CHMe_2 du NIPAM). Note: le taux de folate est trop faible pour être vu en RMN, il a été déterminé par UV/VIS. UV/VIS (363 nm, $c = 0.4 \text{ g/L}$) $A=0.487$, 0.1964 mmol de folate/g de polymère.

2.5.3 II) Greffe de fluorescéine : Exemple : Synthèse de poly[N-isopropylacrylamide-co-N-amine-N'-(éthylènedioxy)-bis(éthylacrylamide)-co-N-DTAF-N'-(éthylènedioxy)-bis(éthylacrylamide] (PNIPAM-NH-DTAF) (17**) [32] :**

(Note: la procédure suivante a aussi été utilisée pour greffer la fluorescéine au poly (NIPAM-co-EDBEAm) 80:20 à laquelle le folate a déjà été greffé (15) pour former le produit (18)).

Du PNIPAM-NH₂ (9) (85 mg, 0.140 mmol d'amines) est dissout dans un tampon borate (pH 9.5, 25 mL). De la fluorescéine dichlorotriazine (3.9 mg, 0.0071 mmol) en solution dans 5 mL de tampon borate est ajouté au mélange sous agitation. L'agitation est maintenue à la température de la pièce pendant deux heures. La solution est dialysée pendant 16 heures contre un tampon borate (pH 9.5) afin d'éliminer la fluorescéine résiduelle. La solution est dialysée pendant 3 jours contre de l'eau MilliQ pour éliminer les sels présents. Le produit, un solide orange, est isolé par lyophilisation (17).

(17) NIPAM:EDBEAm:fluorescéine 80:19:1 Rendement: 71%. RMN ¹H (400 MHz, D₂O, δ ppm): 1.08 (s, 6H, méthyles du NIPAM); 2.89, 3.34, 3.58, 3.65 (bandes larges, 12H, éthylèneoxy du EDBEAm); 3.85 (s, 1H, CHMe₂ du NIPAM); 6.59 (s, 4 protons aromatiques de la fluorescéine). UV/VIS fluorescéine (492 nm, c=0.015 g/L) A=0.10013, 0.0953 mmol de fluorescéine/g de polymère.

(18) NIPAM:EDBEAm:folate:fluorescéine 80:14:5:1 Rendement: 72%. RMN ¹H (400 MHz, D₂O, δ ppm): 1.10 (s, 6H, méthyles du NIPAM); 3.08, 3.33, 3.55, 3.64 (signaux larges, 2.6H, éthylèneoxy du EDBEAm); 3.85 (s, 1H, CHMe₂ du NIPAM); 6.57 (s, 0.03H, 4 protons aromatiques de la fluorescéine); 6.74 (d, 0.07H, 2 protons aromatiques du folate); 7.62 (d, 0.07H, 2 autres protons aromatiques du folate). UV/VIS fluorescéine (492 nm, c = 0.010 g/L) A=0.030, 0.043 mmol de fluorescéine/g de polymère.

CHAPITRE III

Résultats et discussion

3.1 Dextrans aminés

3.1.1 Synthèses

Les carboxyméthyl-dextrans aminés (CMDA) constituent la première catégorie de polymères hydrosolubles aminés synthétisés et caractérisés dans ce travail. Afin d'obtenir ces produits, il fallait trouver une façon de modifier du dextran commercial en y greffant des groupements possédant des amines terminales. Une voie intéressante consiste à greffer, dans une première étape, des unités carboxyméthyles sur les hydroxyles du dextran (fig. 3.1). Cela permet au dextran de posséder désormais des fonctions carboxylates qui confèrent au polymère une plus grande hydrosolubilité et surtout la capacité de greffages subséquents par couplage [27]. Les carboxyméthyl-dextrans (CMD) ainsi formés peuvent être couplés à des diamines terminales par activation avec un carbodiimide, créant ainsi un dextran aminé (CMDA) avec une nouvelle liaison amide ainsi que des amines primaires sur les branches du polymère.

Figure 3.2: Synthèse de CMDA (CMDA1) suivant la méthode de Dellacherie :

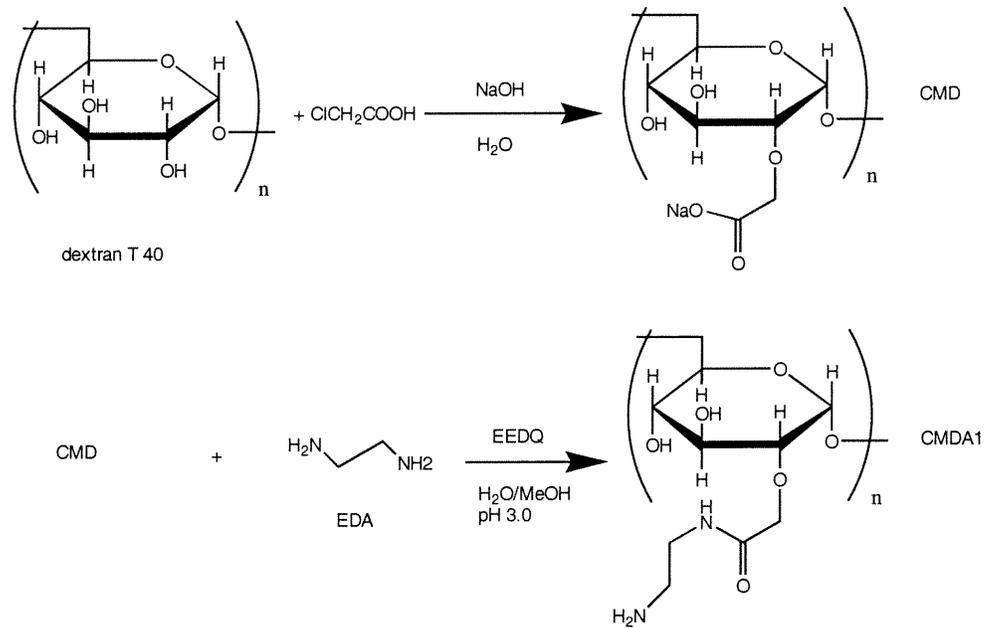


Figure 3.3 : Mécanisme de la carboxyméthylation

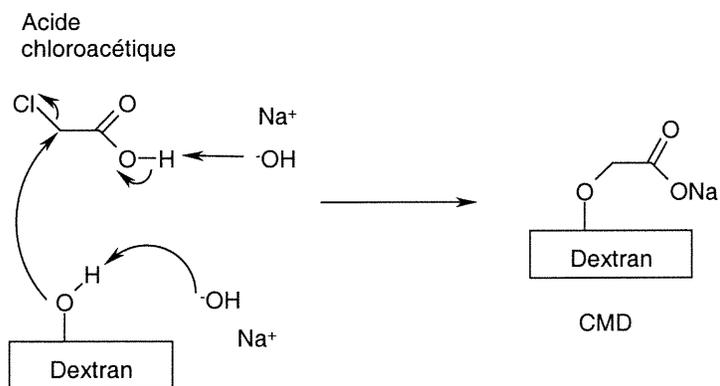
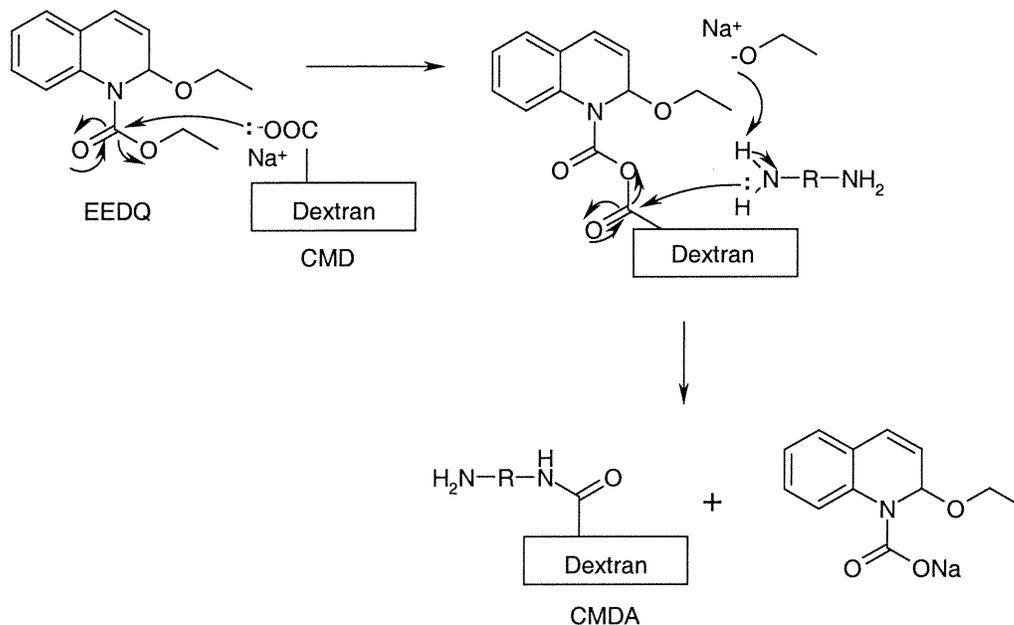


Figure 3.4 : Mécanisme de l'activation avec EEDQ :



Des modifications à la procédure rapportée par Dellachérie ont été essayées afin d'améliorer le taux de carboxyméthylation du dextran. D'autres auteurs ont rapporté des synthèses de CMD avec des taux de carboxyméthylation égaux ou supérieurs à celui rapporté par Dellacherie. Ainsi, la température de la réaction a été augmentée à 80°C au lieu de 60°C [33]. Le solvant a aussi été modifié. Des mélanges eau/éthanol [34] et eau/t-butanol [35] comme solvant du dextran et de la soude ont aussi été évalués. L'acide chloroacétique a aussi été remplacé par de l'acide iodoacétique [36]. Cependant les CMD obtenus par ces autres méthodes de synthèse ont des taux de carboxylates égaux ou

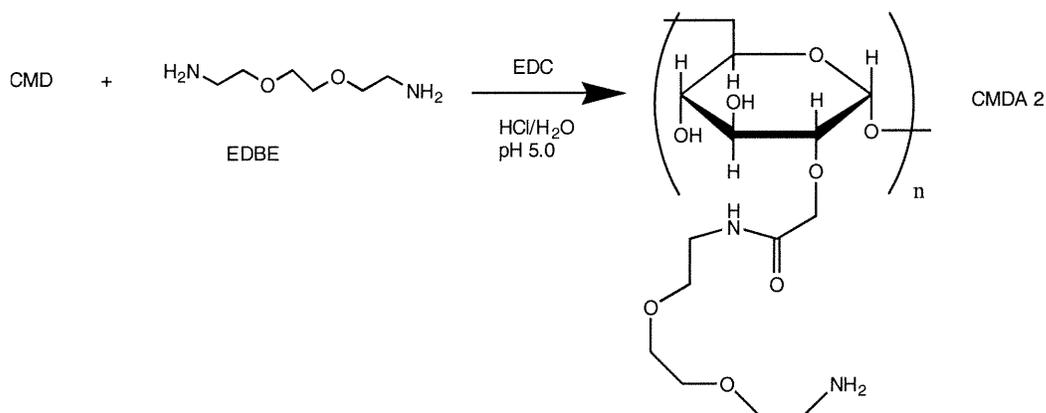
inférieurs (de plus de la moitié dans certains cas) à ceux de la réaction de Dellacherie. Ainsi, cette dernière méthode a été retenue pour la production de CMD.

L'amélioration des rendements de CMDA passait alors par l'utilisation d'une technique de couplage plus efficace. Même si la carboxyméthylation était optimale par la méthode de Dellacherie, le couplage de l'EDA sur les carboxylates pouvait bien être amélioré. C'est ainsi qu'un agent de couplage autre que l'EEDQ a été testé, soit la 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide hydrochloride (EDC) [28]. Contrairement à l'EEDQ, l'EDC est hydrosoluble. Ainsi, en présence d'EDC, la réaction de couplage entre l'EDA et le CMD peut être réalisée en milieu aqueux homogène. Le pH de la réaction est maintenu à environ 5.0 (valeur à laquelle l'EDC est le plus stable). Les polymères obtenus après dialyse extensive et lyophilisation ont été analysés. Les résultats des analyses démontrèrent que le taux d'incorporation des groupements amines est plus élevé que lorsque l'EEDQ est utilisée (voir section caractérisation). Vu son efficacité supérieure, la méthode de couplage à l'EDC a été retenue pour la synthèse de CMDA1.

Avec une stratégie de synthèse de CMDA bien définie et des méthodes de synthèse efficaces, un type de CMDA différent a été synthétisé de façon similaire en remplaçant l'EDA par la 2,2'-(éthylènedioxy)-bis-éthylamine (EDBE). Le dextran aminé résultant (CMDA2) possède des branches plus longues (voir Figure 3.5) que le CMDA1. Le fait que les groupements amines soient plus éloignés de la chaîne polysaccharide principale rend ceux-ci plus disponibles pour des réactions subséquentes. De plus, des groupements fonctionnels liés à ces bouts de branches sont aussi plus disponibles. Par

exemple, des groupements biotines liés pourraient plus facilement interagir avec la streptavidine, une protéine possédant une grande masse et dont une interaction stérique avec des chaînes de polymère empêcherait de se lier à la biotine.

Figure 3.5 : Formation de CMDA (EDC)



3.1.2 Caractérisation

3.1.2 i) Spectroscopie infrarouge

Dans le cadre de l'étude des carboxyméthyl-dextrans (CMD), la spectroscopie infrarouge s'avère très utile pour estimer de façon qualitative l'efficacité de la greffe du groupement carboxyméthyle sur le polymère. Cette technique permet l'obtention d'informations structurales importantes, surtout en ce qui a trait à la présence de carbonyles. Ceux-ci, dépendamment s'ils composent une fonction amide ou carboxyle, engendrent un pic d'absorption très intense à une fréquence caractéristique comprise entre 1500 et 1700 cm^{-1} . Même si l'on ne peut quantifier les carbonyles par cette

technique, elle permet néanmoins de confirmer la présence de carboxylates sur les CMD produits et d'évaluer le degré de greffage relatif d'un CMD à l'autre par comparaison des rapports intensité carbonyle/intensité hydroxyles (3400 cm^{-1}). Par exemple, les figures B.1 à B.3 en annexe montrent les spectres IR du dextran T40, du CMD synthétisé selon la méthode de Dellacherie avec un bon taux de greffe et du CMD synthétisé selon la méthode de Takeo avec un taux moins élevé (taux déterminés par $^1\text{H RMN}$). On voit que plus la carboxyméthylation a été efficace, plus la bande à 1600 cm^{-1} (carboxylate) est intense par comparaison à la bande à 3400 cm^{-1} . L'intensité de la bande à 1600 cm^{-1} est nulle dans le cas du dextran seul et plutôt faible dans le cas du CMD de Takeo, tandis qu'elle est très prononcée dans le cas du CMD de Dellacherie.

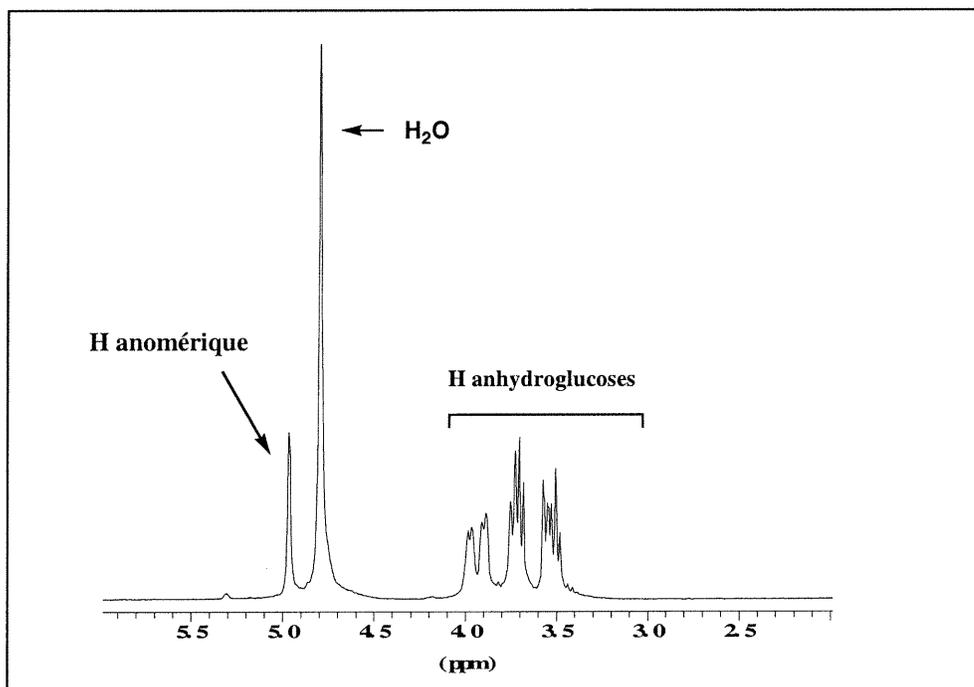
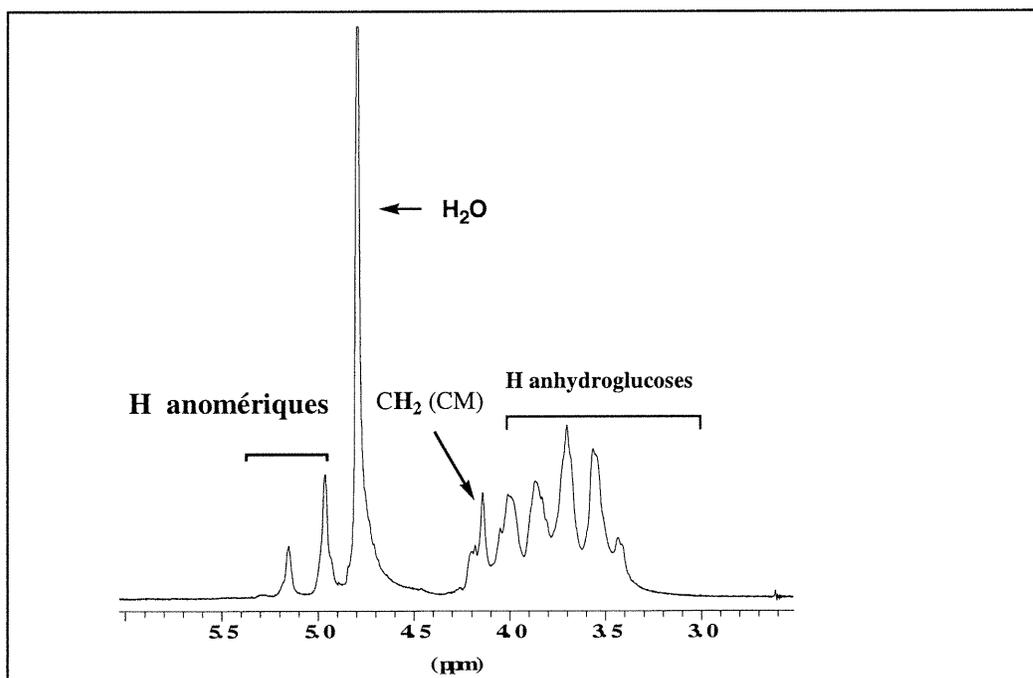
Dans le cas des CMDA, la spectroscopie infrarouge est surtout utile pour visualiser les fonctions amides. Durant la réaction de couplage, les carbonyles passent d'une fonction carboxylate à une fonction amide. Cela se traduit en spectroscopie infrarouge par un décalage de la bande d'absorption du carbonyle de 1600 cm^{-1} à 1660 cm^{-1} . Ceci est visible dans les figures B.4 et B.5 en annexe. On voit ici deux bandes correspondant à un mélange de carbonyles provenant de carboxylates et d'amides. Dans le cas du CMD, on ne voit qu'une seule bande.

3.1.2 ii) Spectroscopie RMN

La spectroscopie $^1\text{H RMN}$ s'est avérée très utile pour confirmer la réussite de la réaction et pour déterminer le degré de carboxyméthylation des CMDs. En comparant le

spectre du dextran initial (Figure 3.6) et du CMD (Figure 3.7), on remarque plusieurs différences qui viennent prouver que la réaction a bien fonctionné. Le spectre du CMD présente des signaux qui n'apparaissent pas dans le spectre du dextran. En particulier, on note les signaux à 4.2 ppm et 5.2 ppm qui correspondent, respectivement, aux protons des méthyles liés à l'acide carboxylique et aux protons anomériques qui ont vu leur environnement chimique modifié suite à la réaction. De plus, le fait que les signaux soient plus larges et moins bien définis dans le cas du CMD que du dextran montre que les carboxyméthyles se sont greffés aux hydroxyles du dextran de façon aléatoire. Cette observation confirme également que la réaction a bien eu lieu et que les signaux détectés ne proviennent pas de réactifs non attachés au polymère. Par ailleurs, l'intégration des signaux correspondant aux protons méthyléniques et aux protons anomériques, sur les spectres de CMD permet d'évaluer le degré de substitution des carboxyméthyles. Cela se fait en calculant le rapport d'intégration de la moitié de la valeur du signal des méthyles (nombre de carboxyméthyles) sur la valeur de l'intégration des protons anomériques (nombre de monomères anhydroglucose) X 100% (formule en bas de page). Le CMD produit selon la méthode de Dellacherie possède un taux de carboxyméthyle de 50% et c'est la plus haute valeur pour les CMD synthétisés.

$$\left(\frac{0.5 H_{\text{méthyles}}}{H_{\text{anomériques}}} \right) \times 100 \%$$

Figure 3.6: Spectre ^1H RMN du dextran T40 (D_2O) :Figure 3.7: Spectre ^1H RMN du CMD synthétisé selon la méthode de Dellacherie (D_2O) :

Dans le cas des CMDA, la RMN ^1H permet de confirmer la greffe des diamines sur les branches du CMD (figures 3.8 et 3.9) de la même façon que pour les carboxyméthyles. Cependant, par cette méthode, il est très difficile de quantifier le taux de greffe de diamine ainsi que le taux d'amines libres présent sur le CMDA. Les signaux dus aux protons d'intérêt ont des déplacements chimiques approximativement identiques à ceux des protons des anhydroglucoses et se chevauchent, rendant ainsi leur intégration spécifique difficile. De plus, l'échange entre les protons des amines terminales et des deutériums du solvant rend la quantification de l'amination impossible par cette méthode. Pour atteindre cet objectif, il a été nécessaire d'utiliser une autre technique d'analyse des amines. Celle-ci est décrite dans la section suivante.

Figure 3.8: Spectre ^1H RMN du CMDA1 (D_2O) :

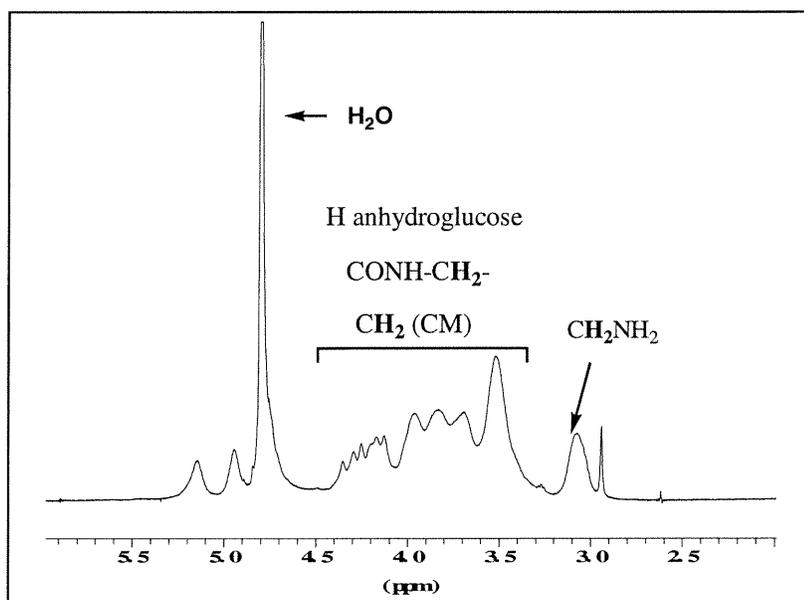
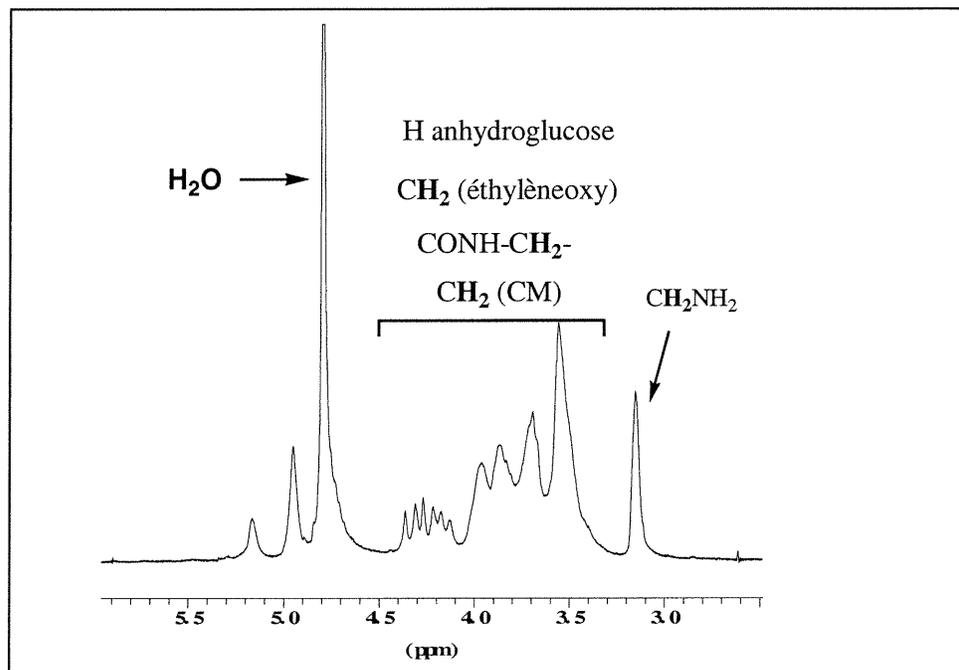


Figure 3.9: Spectre ^1H RMN du CMDA2 (D_2O) :

3.1.2 c Quantification des amines par la technique TNBS/UV basée sur une méthode colorimétrique [25]

Lorsque l'acide trinitrobenzènesulfonique (TNBS, acide picrylsulfonique) réagit avec une amine primaire, il se forme un composé coloré (orange) possédant une bande d'absorbance en UV/VIS à une longueur d'onde de 342 nm avec un coefficient d'extinction molaire de $14\,600\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ en milieu aqueux. Ainsi, après réaction quantitative des amines des CMDA avec le TNBS, par simples mesures d'absorbance UV/VIS, il a été possible avec la loi de Beer de déterminer la concentration en colorant et

donc en amines primaires. Ainsi, on obtient par cette technique un taux en amines de 1.7 mmol/g (26 % mol) pour le CMDA1 et de 1.3 mmol/g (20 % mol) pour le CMDA2.

3.1.2 d Détermination des masses molaires par GPC

Les masses molaires du dextran T40, du CMD et des CMDA ont été déterminées par chromatographie de perméation de gel (GPC) en milieu aqueux, un type de chromatographie d'exclusion stérique, en utilisant des pullulans (un autre type de polysaccharides) comme standards. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.1.

Ici, la masse molaire en nombre expérimentale du T40 est très proche de la valeur nominale de (40 000). Cependant, la masse molaire en nombre du CMD est près de 97 000. Cela est explicable par le fait qu'à pH 6.5, en milieu salin, le CMD est alors un polyanion et possède alors une conformation plus étendue. Cela lui confère un volume hydrodynamique plus grand qui accélère sa progression à l'intérieur de la colonne et qui augmente alors sa masse molaire apparente déduite par cette méthode. La masse molaire des dextrans aminés (CMDA 1 et 2) est plus proche du dextran initial (40 000) car le polymère n'étant plus sous une forme anionique, sa conformation en solution se trouve plus contractée. On remarque aussi que la polydispersité de tous les polymères est à peu près égale à celle du dextran commercial (1.5), ce qui est normal vu que tous les polymères produits sont issus de la même polymérisation.

Par ailleurs, l'analyse par GPC d'échantillons de CMDA auxquels du TNBS a été greffé permet de démontrer que les amines sont liées au polymère de façon covalente. Ceci est rendu possible par l'utilisation de deux détecteurs liés en tandem, soit un réfractomètre différentiel et un détecteur d'absorbance UV. Par détection d'absorbance UV à 342 nm d'un échantillon de CMDA 2 , on remarque une bande d'absorption à un temps de rétention de 21.8 minutes (environ 36 000 g/mol de masse molaire), ce qui démontre que le TNBS ainsi que les amines sont bel et bien attachés au CMDA.

Tableau 3.1 : Caractéristiques des dextrans aminés :

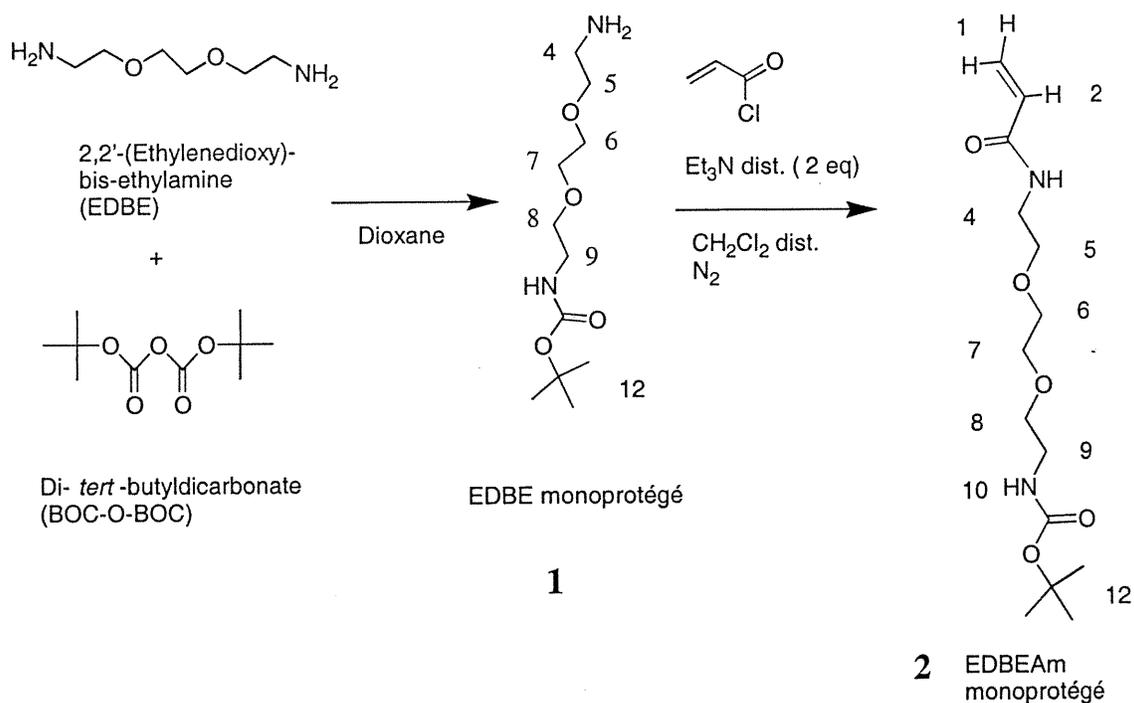
Polymère	Rendement (%)	\overline{M}_n (g/mol)	\overline{M}_p (g/mol)	$\overline{M}_p / \overline{M}_n$ polydispersité	Taux de carboxyméthyles (mol %)	Taux d'amines (mmol/g)
Dextran T40	---	40 000	60 000	1.5	---	---
CMD	93	97 000	143 000	1.5	50	---
CMDA1	88	25 000	36 000	1.5	---	1.7
CMDA2	79	36 000	55 000	1.5	---	1.3

3.2 PNIPAM aminés

3.2.1 Monomère EDBEAm : synthèse

La stratégie qui a été envisagée pour synthétiser des poly(alkylacrylamides) aminés est de synthétiser un copolymère de NIPAM et d'un acrylamide possédant une amine terminale. L'acrylamide retenue est la 2,2'-(ethylenedioxy)-éthyl-N-BOC-amine-N'-éthylacrylamide (N-BOC-EDBEAm, voir Figure 3.10, structure **2**). En plus de posséder une fonction amine primaire, ce monomère a une branche composée de deux éthylènoxydes qui lui donne une certaine longueur d'espace, mais surtout une excellente hydrosolubilité, propriété requise pour les copolymères désirés (voir section 3.2.2).

Figure 3.10 : Synthèse du monomère N-BOC-EDBEAm (**2**)



Ainsi, la synthèse de ce monomère s'est effectuée à partir de la 2,2'-(éthylendioxy)-bis-éthylamine (Aldrich, 98% de pureté), une diamine dans laquelle les deux amines primaires sont séparées par deux unités éthylèneoxyde. Cette diamine a tout d'abord été monosubstituée par un groupement protecteur BOC (t-butoxycarbonate). Cela s'est fait en faisant réagir du di-*tert*-butyl dicarbonate (BOC-O-BOC) avec un grand excès (5-6 équivalents) de diamine en solution dans la dioxanne. Le fait que la diamine soit en excès combiné au fait que le BOC₂O soit introduit par petites portions (en solution et goutte à goutte) dans le milieu réactionnel fait en sorte que plus de 90% du limitant, le BOC₂O, est converti en diamine mono-protégée, le reste étant de la diamine diprotégée. L'excès de diamine non-protégée est finalement éliminé par solubilisation dans l'eau. Cela est possible puisque la diamine non-protégée est beaucoup plus soluble en milieu aqueux que le produit protégé. Le groupement *tert*-butyle de ce dernier le rend plus soluble dans un solvant organique comme le dichlorométhane.

Le produit résultant est composé de plus de 95% de diamine monoprotégée et d'un peu moins de 5% de diprotégée. Cette dernière constitue une impureté qui n'est pas éliminée préalablement à la synthèse du monomère EDBEAm protégé. Le fait que la diamine di- et monoprotégée ont des propriétés semblables ainsi (surtout) que le fait que la diamine monoprotégée interagisse trop fortement avec la silice rend leur séparation par colonne (ou par d'autres méthodes) difficile. Mais, n'étant pas réactive, la diamine diprotégée ne nuit pas à la synthèse du monomère. Puisqu'elle n'est présente qu'en faible quantité, de plus, le rendement de la réaction n'est que peu diminué (87%).

Le produit (2) est préparé par addition de chlorure d'acryloyle à une solution d'EDBE monoprotégé (1) et de triéthylamine dans le dichlorométhane anhydre. Le caractère anhydre de la solution est important car le chlorure d'acryloyle réagit violemment avec l'eau pour former de l'acide acrylique, ce qui diminue le rendement de la réaction. Par ailleurs, la triéthylamine est nécessaire à la réaction pour capter l'acide chlorhydrique formé. La température du milieu réactionnel, quant à elle, est maintenue à environ 4°C à l'aide d'un bain de glace. Il était préférable de réaliser cette manipulation à basse température car la réaction entre l'amine primaire et le chlorure d'acryloyle est exothermique. Le mélange est ensuite porté à température ambiante. Des mesures de chromatographie sur couche mince ont révélé que le chlorure d'acryloyle a complètement réagi après un temps de réaction de deux heures à température ambiante. La purification du monomère (2) s'est faite par lavage à l'eau, suivie d'une chromatographie sur colonne de silice. Le lavage permet d'éliminer les sels hydrosolubles formés. Puisque le produit et les impuretés ont des polarités différentes, la chromatographie s'est avérée très efficace pour séparer le produit des impuretés, dont la diamine diprotégée. Il était impératif que ces impuretés soient éliminées car, même en très faible concentration, elles entraînent la fin prématurée de la croissance des chaînes lors de la polymérisation. Le produit résultant est alors un oligomère difficile à récupérer et impropre aux usages prévus. Cependant, cette purification a fait diminuer le rendement (masses) qui décroît de 85% à 50% après le passage du produit dans la colonne. Les faibles rendements après chromatographie peuvent être attribués, soit à une autopolymérisation durant le processus, soit à des

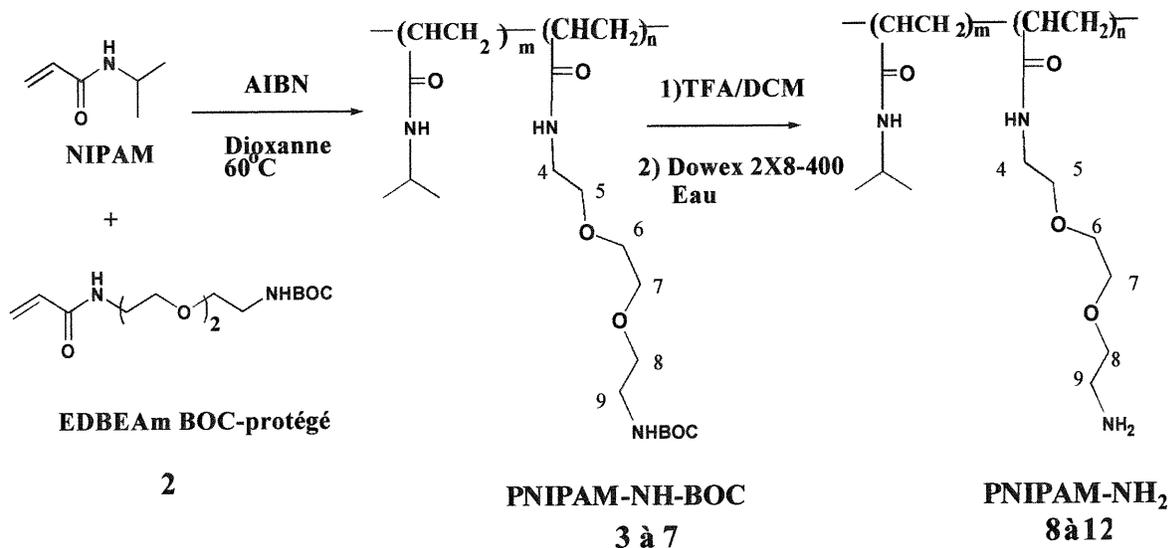
interactions fortes entre la silice et le monomère. Néanmoins, le monomère était recueilli en quantité suffisante et de pureté adéquate pour passer à l'étape de la polymérisation.

3.2.2 Co-polymères de NIPAM et de EDBEAm : synthèse

Par sa fonction acrylamide, l'EDBEAm BOC-protégé obtenu précédemment peut alors être utilisé comme monomère lors d'une polymérisation (ou d'une copolymérisation). Ainsi, le N-BOC-EDBEAm a été copolymérisé avec le NIPAM par polymérisation radicalaire. Cette méthode a été choisie pour sa facilité d'exécution et pour les très bons taux de conversion résultants. De plus, les deux co-monomères ont une excellente solubilité en solvant organique, comme le THF et la dioxane, ce qui se prête bien à ce type de polymérisation. Le NIPAM a été choisi comme co-monomère car il donne au polymère un caractère hydrosoluble, essentiel pour que le polymère puisse être utilisé dans les systèmes pharmaceutiques prévus. De plus, il est neutre. Ses copolymères dérivés ont ainsi moins d'interactions avec les sels, interactions susceptibles d'influencer la conformation des chaînes en solution [40]. Par ailleurs, l'amine est maintenue protégée par le groupe BOC durant la polymérisation. La présence du BOC, protégeant l'amine du monomère EDBEAm, confère à celui-ci une excellente solubilité en milieu organique. En effet, le monomère non protégé est peu soluble en milieu organique, ce qui rendrait sa polymérisation par la méthode choisie difficile. De plus, la présence d'amines primaires libres pourrait éventuellement agir comme désactivateur de polymérisation. Le groupement protecteur BOC n'est enlevé qu'après la formation et la purification du polymère. Avant déprotection, le polymère résultant est soluble en milieu organique

(dichlorométhane) et non en milieu aqueux. Après déprotection des groupements amines terminaux, il en résulte un polymère possédant des amines primaires disponibles pour des réactions subséquentes. Le polymère est alors hydrosoluble, mais il n'est plus soluble en solvant organique tel que le dichlorométhane. Par ailleurs, la présence de branches éthylèneoxydes vient donner au polymère un caractère hydrosoluble beaucoup plus prononcé que celui donné par le NIPAM, un monomère plus hydrophobe.

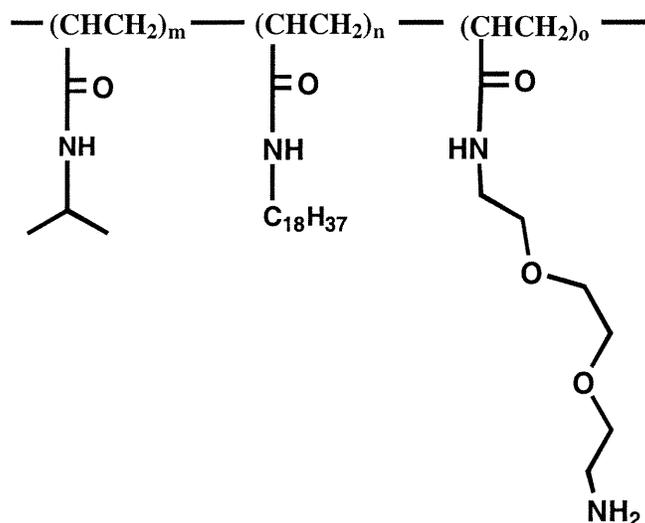
La copolymérisation du NIPAM et du N-BOC-EDBEAm a été effectuée dans la dioxanne anhydre et dégazée par bullage d'azote (Figure 3.11). Les co-monomères ont d'abord été combinés selon des quantités molaires déterminées et solubilisés avant le dégazage effectué à température ambiante. La température du milieu réactionnel a été élevée à 60°C. Le polymère formé est récupéré par précipitation dans un non-solvant (éther) puis filtré. Le polymère est alors déprotégé par réaction avec un acide fort. Puisque le polymère est soluble en milieu organique, la déprotection est effectuée dans le dichlorométhane en utilisant l'acide trifluoroacétique, engendrant un complexe entre l'amine libre et l'acide trifluoroacétique. Celui-ci est détectable par RMN ^{19}F où un pic apparaît à -75 ppm. Afin d'utiliser le polymère subséquentement, il était impératif d'éliminer l'acide trifluoroacétique. Pour cela, le polymère a été traité avec une résine à échange d'ions fortement basique. Cette résine capte l'acide trifluoroacétique complexé au polymère et le remplace par du HCl, beaucoup plus biocompatible. Le PNIPAM-NH₂ résultant est ensuite isolé et caractérisé. Plusieurs de ces polymères avec des rapports molaires différents ont ainsi été synthétisés (voir tableau 3.2, polymères **8 à 12**). Les résultats de leur caractérisation seront présentés dans la section 3.2.4.

Figure 3.11 : Synthèse du PNIPAM-NH₂:

3.2.3 Copolymères de NIPAM, d'EDBEAm et de N-*n*-octadécylacrylamide : synthèse

La synthèse de ce copolymère s'est faite de façon similaire au poly NIPAM-co-EDBEAm. Pour introduire le groupement N-*n*-octadécyle (C₁₈H₃₇), l'acrylamide correspondant de cet aliphatique (N-*n*-octadécylacrylamide, préparé comme le produit 2, par réaction entre le chlorure d'acryloyle et le dérivé aminé de l'aliphatique) a été combiné avec les deux autres co-monomères pour en résulter le polymère 13, puis le polymère 14 après déprotection.

Figure 3.12 : PNIPAM-NH-ODA, polymère (14)



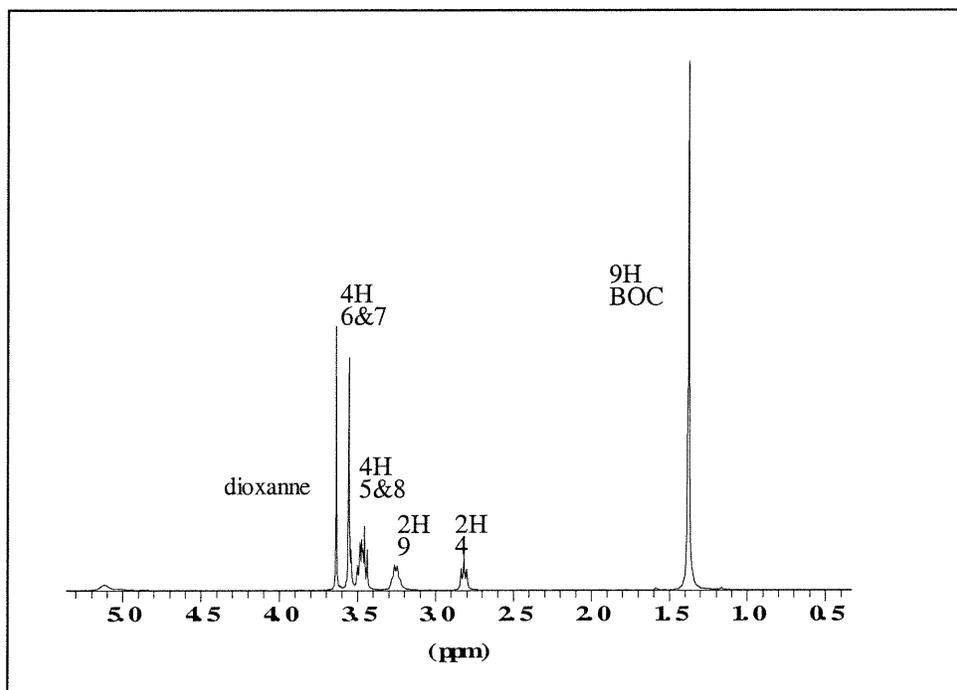
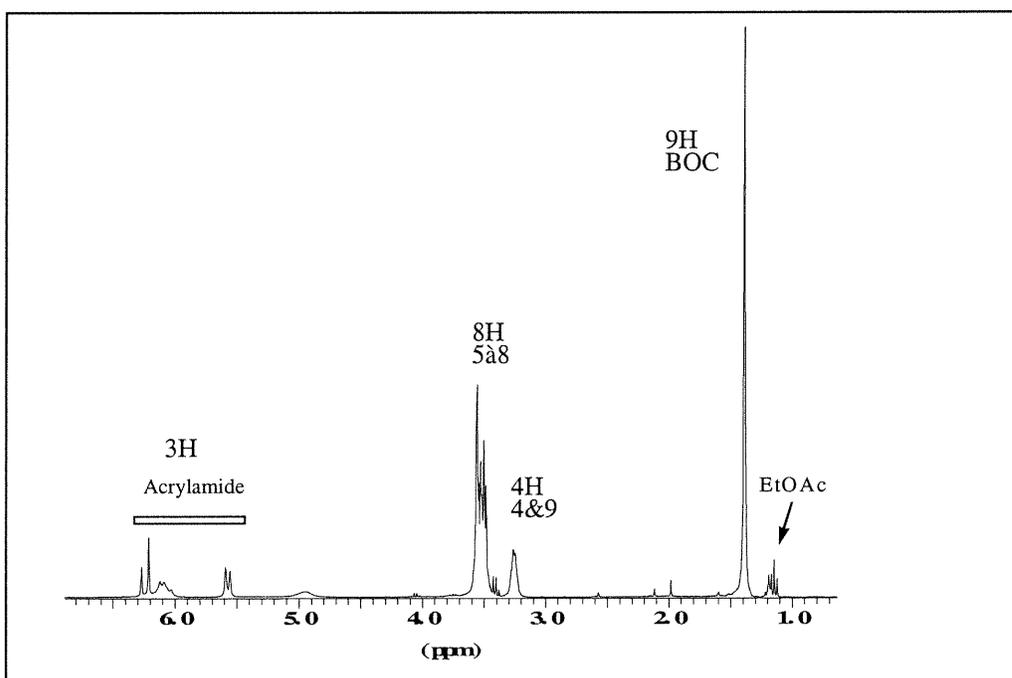
3.2.4 Caractérisations

3.2.4 a Spectroscopie RMN ^1H

3.2.4 a i) Monomère EDBEAm

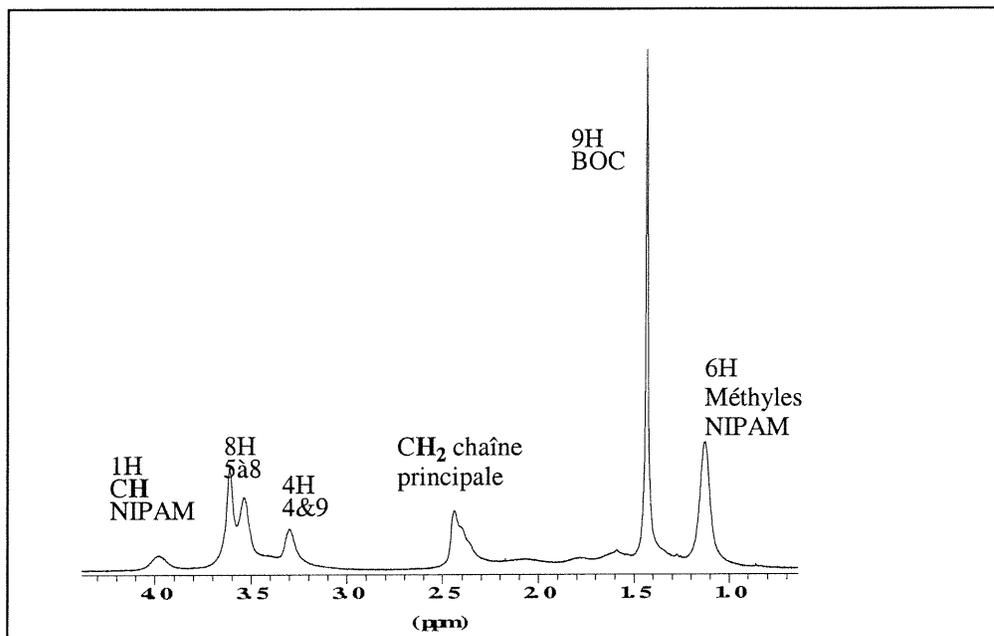
La diamine monoprotégée (1) et l'EDBEAm protégé (2) ont été caractérisés par RMN ^1H . Par comparaison des spectres d'un réactif et d'un produit, il est possible d'évaluer les changements dans la structure de la molécule. Le spectre RMN ^1H de l'EDBE présente quatre signaux caractéristiques, soit un singulet large à 1.3 ppm correspondant aux 4 protons amine, un triplet à 2.9 ppm correspondant aux 4 protons méthyléniques liés aux carbones 4 et 9 (Figure A.1 annexe), un triplet à 3.5 ppm correspondant aux 4 protons liés aux carbones 8 et 5 ainsi qu'un singulet à 3.6 ppm correspondant aux 4 protons des carbones 6 et 7. Dans le spectre du produit 1, on

retrouve comme signaux un singulet intégrant pour 11 protons apparaissant à 1.3 ppm correspondant au signal de l'amine (2H) et du t-butyle du BOC (9H), un triplet à 2.9 ppm correspondant aux 2 protons du carbone 4, un quadruplet à 3.2 ppm correspondant aux 2 protons du carbone 9, un triplet à 3.4 ppm correspondant aux deux protons du carbone 8, un triplet à 3.5 ppm correspondant aux 2 protons du carbone 5 ainsi qu'un singulet à 3.6 ppm correspondant aux 4 protons des carbones 6 et 7. En comparant les spectres de l'EDBE (produit de départ, Figure A.1) et du composé **1** (Figure 3.13), on voit que certains signaux présents dans le spectre du produit de départ voient leur intégration diminuer de moitié dans le spectre du composé **1** et d'autres signaux apparaissent. Ainsi, les triplets à 2.9 ppm et 3.5 ppm voient leur intégration diminuer de moitié puisque l'environnement chimique des hydrogènes des carbones 8 et 9 a changé. Ces derniers ont désormais des nouveaux signaux les représentant à 3.2 ppm et 3.4 ppm. Cela vient démontrer que l'EDBE a bel et bien été modifié et que la structure du produit est celle qui est attendue. Le spectre du produit **2** (Figure 3.14), quant à lui, présente aussi quelques différences notables avec son précurseur, le produit **1**. Le signal du carbone 9 est maintenant décalé de 3.2 à 3.5 ppm, démontrant ainsi que son environnement chimique a changé après la réaction de l'amine restante avec le chlorure d'acryloyle grâce à un déblindage causé par la fonction acrylamide. Aussi, de nouveaux signaux sont apparus entre 5.5 et 6.5 ppm correspondant aux protons de l'alcène terminal. Ceux-ci confirment donc que l'amine a bel et bien réagi avec le chlorure d'acryloyle pour engendrer la fonction acrylamide.

Figure 3.13 : Spectre RMN ^1H de l'EDBE mono-BOC-protégé (D_2O , produit 1) :Figure 3.14 : Spectre RMN ^1H de l'EDBEAm BOC-protégé (D_2O , produit 2)

3.2.4 a ii) Poly NIPAM-co-EDBEAm (avec et sans N-*n*-octadécylacrylamide)

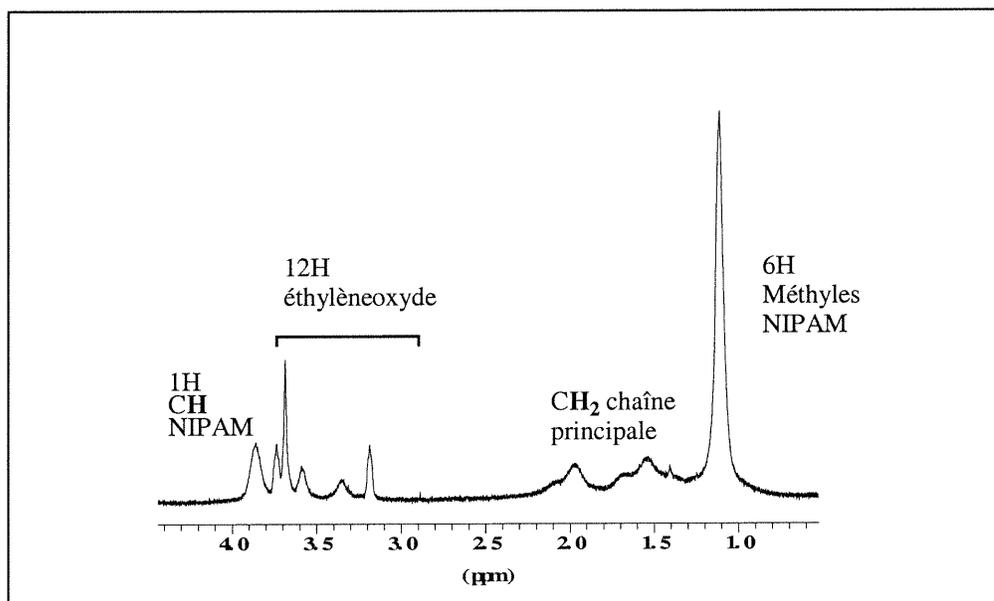
Lors de l'analyse des copolymères, l'utilité première de la RMN ^1H a été de déterminer les différents rapports de monomères incorporés. Cela est possible par intégration de pics caractéristiques à chacun des monomères incorporés. Avec ces valeurs, par calcul, il est ensuite possible de déterminer la quantité d'une fonction donnée d'un monomère relativement aux autres fonctions des autres monomères et, conséquemment, de trouver le nombre relatif des différents monomères présents dans un copolymère donné. Ainsi, pour le PNIPAM-NH-BOC (produits **3** à **7**, Figure 3.15 comme exemple du **6**), on retrouve les signaux correspondant aux méthyles (6H) et au proton du carbone tertiaire (1H) du NIPAM à 1.14 et 4.0 ppm respectivement. On retrouve aussi les signaux des éthylèneoxydes (12H) et des méthyles du *tert*-butyle (9H) de l'EDBE-protégé à 3.3-3.6 et 1.4 ppm respectivement. L'intégration de ces pics divisée par le nombre de protons correspondant à la fonction, donne le nombre relatif de ces mêmes fonctions. Celles-ci sont ensuite comparées entre elles pour obtenir les rapports relatifs des monomères en présence. Ainsi, pour tous les poly(NIPAM-co-EDBEAm-protégés) synthétisés, les rapports en pourcentage des différents monomères sont décrits dans le tableau 3.2.

Figure 3.15 : Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-BOC (**6**, CDCl_3) :

La similitude entre la composition du milieu réactionnel de polymérisation (feed ratio) et la composition du polymère résultant, déterminée par RMN ^1H , démontre que le contrôle de l'incorporation des unités monomériques par le contrôle de la stœchiométrie des produits de départ est efficace. Puisque les deux monomères sont des acrylamides de solubilité similaire dans le solvant utilisé, chacun d'eux possède le même degré de réactivité («reactivity ratio») avec l'autre monomère qu'avec lui-même lors de la polymérisation [41]. Ainsi, les polymères formés sont de distribution aléatoire (pas de blocs) et de composition statistique dirigée par la composition du milieu réactionnel (le «feed ratio»). Par ailleurs, les spectres RMN ^1H des produits **3** à **7**, grâce aux rapports des monomères qu'ils permettent de déterminer, ont permis une estimation théorique des taux d'amines (mmol/g) correspondant au polymère formé (voir partie expérimentale, section

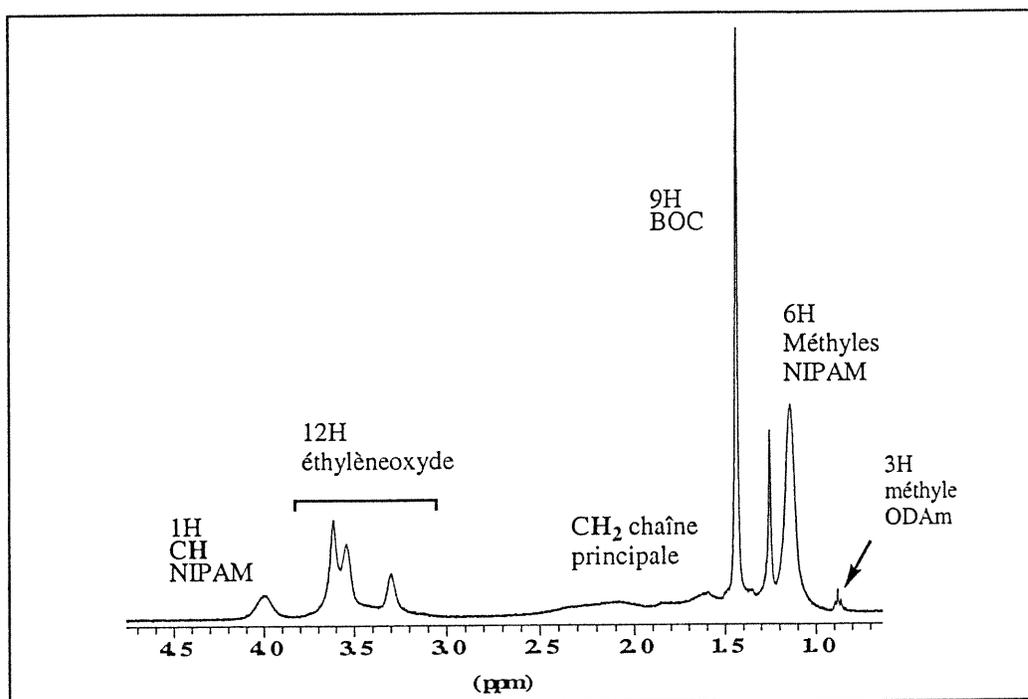
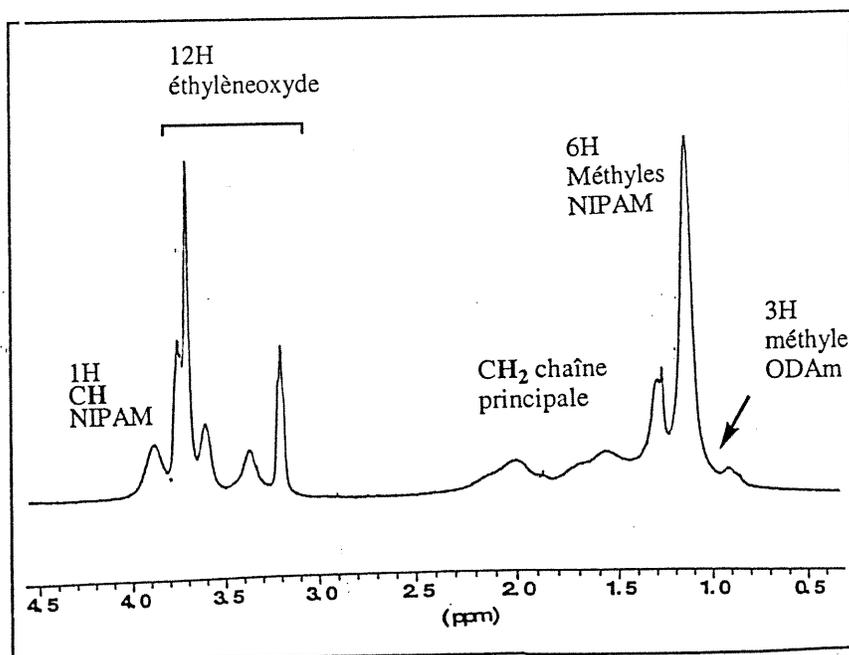
2.2.6 ii). Les taux calculés d'amines sont présentés dans le tableau 3.2. Par ailleurs, la spectroscopie RMN ^1H a permis aussi de déterminer que la déprotection de l'amine avec l'acide trifluoroacétique est quantitative. De fait, sur les spectres RMN ^1H PNIPAM-NH₂ (produits **8** à **12**, Figure 3.16), on remarque la disparition du singulet à 1.4 ppm (présent sur le spectre de la Figure 3.15) correspondant au *tert*-butyle du BOC ainsi que l'apparition d'un pic à 3.2 ppm correspondant aux protons du carbone 9 voisin de l'amine, absent sur la Figure 3.15. Ainsi, il ne reste plus de groupement protecteur sur les amines des polymères.

Figure 3.16 : Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH₂ (**8**, D₂O)



Dans le cas du PNIPAM-NH-ODA (**14**), la RMN ^1H a également permis la détermination du contenu (mol % des monomères) en groupements C₁₈H₃₇. Le spectre

RMN ^1H du polymère protégé (**13**) montre un triplet à 0.87 ppm correspondant au méthyle terminal (3H) de la chaîne aliphatique (voir Figure 3.17). L'intégration de ce triplet ainsi que des autres signaux, de la même manière que les autres PNIPAM-NH-BOC, a permis l'obtention de la composition molaire de ce polymère, soit NIPAM :EDBEAm :octadécylacrylamide 63 :33 :4 (tableau 3.2). Par ailleurs, il est à noter que, pour des raisons de solubilité, les spectres RMN des polymères protégé et déprotégé ont été pris dans des solvants différents. Mis à part la présence ou l'absence du pic du BOC, plusieurs différences causées par des effets de solvants sont remarquées. Sur le spectre du polymère déprotégé (Figure 3.18), on remarque que la résolution est beaucoup plus faible que celle du polymère protégé (Figure 3.17). De fait, sur le spectre pris dans l'eau deutérée, le signal des protons du méthyle de l'octadécyle à 0.88 ppm est flou et il est impossible de déterminer sa multiplicité, ce qui n'est pas le cas sur le spectre pris dans le chloroforme-*d*, où il est clair que ce signal est un triplet. Ce manque de résolution des signaux détectés dans l'eau deutérée est due à la formation de micelles [42]. S'aggrégant ainsi, les chaînes polymériques voient leur temps de relaxation augmenter, ce qui cause la baisse de résolution. Ce phénomène ne survient pas dans le chloroforme-*d* car il n'y a pas formation de micelle dans ce solvant et, conséquemment, pas de perte de résolution.

Figure 3.17: Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-BOC-NH-ODA (13, CDCl_3)Figure 3.18: Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-ODA (14, D_2O)

3.2.4 b Détermination du taux d'amines des polyacrylamides par la méthode TNBS/UV

La technique utilisée pour déterminer le contenu en amines des polyacrylamides synthétisés est similaire à celle utilisée lors de la quantification des groupements amino des CMDA (section 3.1.2 c). Cependant, la mauvaise hydrosolubilité des dérivés colorés de polyacrylamides ne permettait pas une analyse juste en utilisant telle quelle la technique employée pour les CMDA. De légères modifications se sont imposées (voir section 2.2.6 i). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.2.

On remarque que les valeurs de taux d'amination obtenues par les deux techniques sont assez similaires. Ce bon accord entre l'estimation théorique et pratique démontre ainsi que la technique du TNBS/UV est assez juste pour déterminer le contenu aminé des polymères. Il est d'autant plus certains que les valeurs obtenues soient correctes.

3.2.4 c Détermination de la viscosité intrinsèque $[\eta]$ des polyacrylamides

En analysant les polymère **3** à **7** par viscosimétrie (voir la section 2.2.5 ii), les valeurs de viscosités intrinsèques dans le THF ont été déterminées. Les masses molaires \overline{M}_v (viscosimétrique) de ces polymères ont aussi été estimées à l'aide de ces valeurs et grâce aux paramètres de l'équation de Mark-Houwink déterminés pour le PNIPAM. Les

valeurs obtenues varient entre 20 000 et 150 000. Cependant, puisque les quantités de monomère N-BOC-EDBEAm sont élevées (de 20 à 60% mol), les viscosités des polymères en sont affectées et les paramètres de Mark-Houwink ne sont très probablement pas applicables aux polymères synthétisés. Les masses molaires ainsi déterminées ne seraient peut-être pas correctes.

3.2.4 d Détermination de la concentration d'agrégation critique (cac) par spectroscopie de fluorescence du pyrène

La mesure des rapports d'intensité de fluorescence (hauteur) des bandes d'intérêt I_1/I_3 en fonction de la concentration est couramment utilisée pour déterminer le cac des polymères amphiphiles [45]. Le principe de cette analyse réside dans le fait que lorsque le pyrène se retrouve dans un environnement polaire (eau), le rapport I_1/I_3 varie entre 1.6 et 1.7 (Figure 3.19). Cependant, lorsque le pyrène se retrouve en milieu non-polaire, solubilisé dans des micelles, I_3 devient de plus en plus important par rapport à I_1 , ce qui fait chuter le rapport I_1/I_3 souvent au-dessous de l'unité. Dans le cas de surfactants, cette chute se fait souvent sur un intervalle de concentration très petit, ce qui permet la détermination d'une concentration micellaire critique (cmc) de façon précise [46]. Cependant, dans le cas de polymères amphiphiles, cet intervalle de concentrations est souvent beaucoup plus grand, ce qui démontre que la formation d'aggrégats de polymères ne se fait pas à une concentration précise, mais bien sur un intervalle de concentration qui peut être parfois très grand. Dans le cas du PNIPAM-NH-ODA (polymère **14**), cet intervalle comprend trois décades, soit de 0.01 g/L à 10 g/L (Figure 3.20) dans lequel les

octadécyles s'agglomèrent pour former des micelles dans lesquelles les molécules de pyrène se solubilisent et voient la polarité de leur environnement changer.

Figure 3.19 : Spectre d'émission du pyrène (zone d'intérêt) :

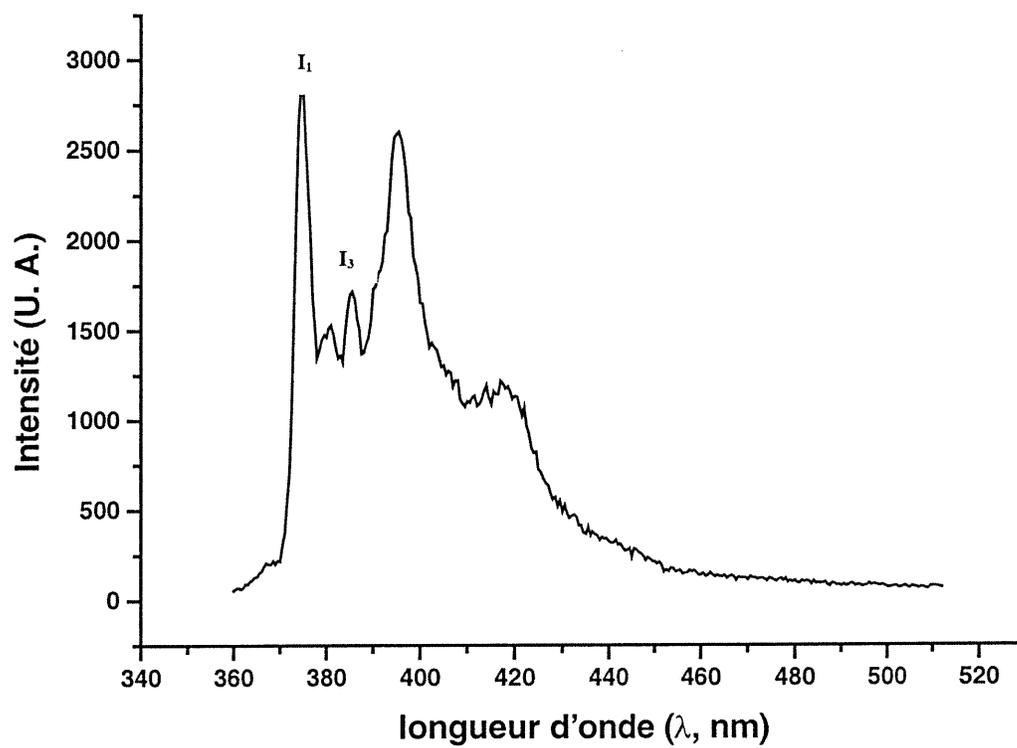


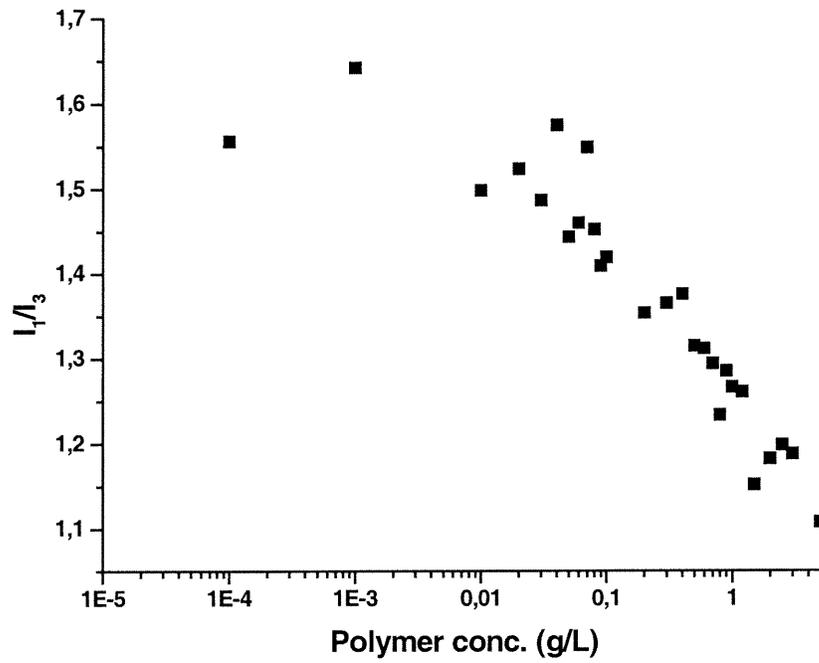
Figure 3.20 : Variation de I_1/I_3 en fonction de la concentration en PNIPAM-NH-ODA

Tableau 3.2 : Caractéristiques des PNIPAM aminés :

Polymère	Taux de conversion (rendement, %)	milieu réactionnel initial (NIPAM :EDBEAm-BOC :ODA)	Ratio incorporé (polymères 3-7, 13; RMN ¹ H, CDCl ₃ , NIPAM :EDBEAm-BOC :ODA)	Contenu en amines (polymères 8-12, 14; RMN ¹ H, mmol/g)	Contenu en amines (polymères 8-12, 14; TNBS/UV, mmol/g)	^a Viscosité intrinsèque [η] (dL/g)
3 et 8	72	80 :20 :0	78 :22±2 :0	1.65±0.05	1.5±0.1	0.392
4 et 9	58	75 :25 :0	79 :21±2 :0	1.59±0.05	1.3±0.1	0.183
5 et 10	76	67 :33 :0	69 :31±2 :0	2.20±0.05	1.9±0.1	0.205
6 et 11	50	50 :50 :0	48 :52±2 :0	3.30±0.05	3.4±0.1	0.185
7 et 12	66	40 :60 :0	40 :60±2 :0	3.60±0.05	3.6±0.1	---
13 et 14	77	63 :33 :4	63 :33±2 :4	2.20±0.05	1.9±0.1	---

a : mesuré dans le THF à 27°C, amines protégées

3.3 Polyacrylamides aminés avec des folates et fluorescéine liés

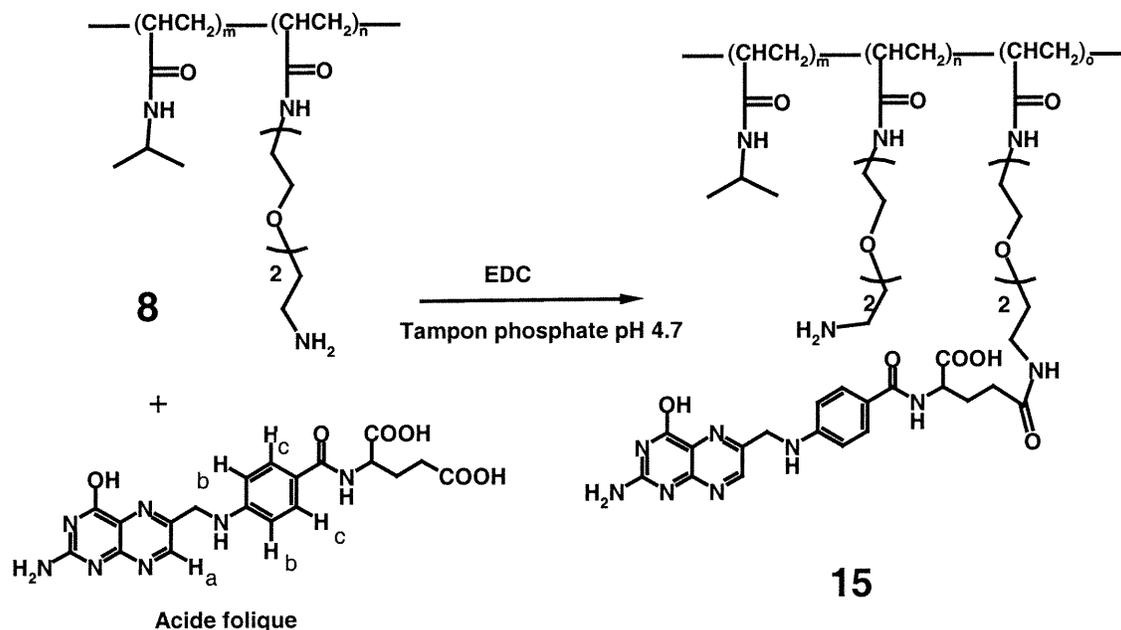
3.3.1 Attachement de l'acide folique sur les polyacrylamides aminés

3.3.1 a) Synthèses

Afin de tester l'utilité des poly(acrylamides) comme polymères amphiphiles dans le système de ciblage des cellules cancéreuses (voir Introduction), il fallait préalablement greffer l'acide folique sur ces polymères. La première stratégie envisagée était de coupler, à l'aide d'un activateur, l'acide carboxylique γ de l'acide folique avec les amines libres des polymères. L'agent d'activation choisi était le 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC). Le mécanisme de couplage qu'effectue ce réactif est semblable au DCC [38]. Cependant, il a l'avantage d'être hydrosoluble comme dans le cas de l'acide folique et des poly(acrylamides) déprotégés. De plus, il a été découvert que ce mode de couplage est particulièrement efficace pour lier l'acide folique aux macromolécules (polymères, protéines) [13]. Cependant, cette méthode de couplage donne lieu à un dilemme. L'EDC est stable en milieu aqueux à des pH variant entre 4.7 et 6.0 mais les réactions de couplages ne sont généralement effectives qu'à des pH supérieurs à 7.5 [38]. De plus, l'acide folique n'est soluble en milieu aqueux qu'en pH basique. En milieu acide, ses deux acides carboxyliques étant protonés, l'acide folique est peu soluble. En milieu basique, cette molécule est déprotonée, ce qui lui confère un caractère ionique et hydrosoluble. Il s'avérait donc important de trouver un compromis entre la solubilité des réactifs et la stabilité de l'EDC. Ce dernier facteur a été considéré comme étant le plus important. À pH basique, l'EDC serait dégradé trop rapidement pour pouvoir permettre une réaction. Cela n'est pas le cas à pH acide où, de plus, une certaine

quantité d'acide folique est quand même solubilisée permettant ainsi à la réaction de s'effectuer.

Figure 3.21 : Greffe de l'acide folique (synthèse du PNIPAM-NH-FA 15)



Ainsi, un excès d'acide folique et d'EDC par rapport à la quantité d'amines du polymère a été dissout dans un minimum de DMSO anhydre. Cette opération préalable permet l'activation de l'acide carboxylique γ de l'acide folique par l'EDC, celui-ci étant bien plus stable dans ce solvant. La réaction entre le polymère et l'acide folique activé s'effectue dans un tampon phosphate pH 4.7. À ce pH, l'acide folique activé n'est que très peu soluble, mais une agitation du mélange réactionnel sur une période de 18 heures, suivie d'une dialyse extensive contre un tampon phosphate pH 7.4 (pour enlever les sous produits ainsi que l'excès des réactifs de petites tailles) ont permis l'obtention de

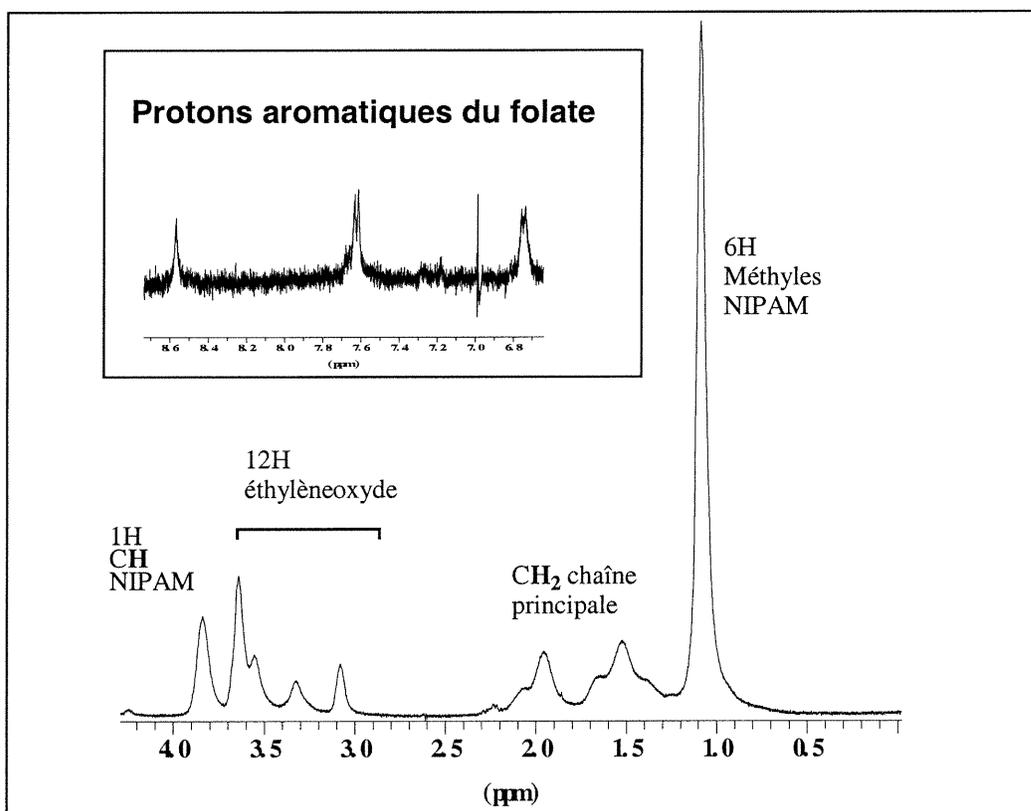
polymères avec des taux en folates variant de 3 à 5% (mol % des monomères). Un désavantage apparent de cette méthode est la nécessité d'un excès important d'acide folique [13]. La faible solubilité de cette vitamine à pH 4.7 fait en sorte que seulement une infime quantité de celle-ci réagira avec le polymère. Cependant, les taux obtenus (voir tableau 3.3) sont adéquats pour l'application envisagée. La reconnaissance cellulaire de l'agent ciblant n'a besoin que d'une quantité minimale de folates pour être effective [13].

3.3.1 b) Caractérisation

La principale technique de caractérisation utilisée pour déterminer le taux de folate greffé sur les polymères a été la spectroscopie UV/VIS. Les spectres UV des groupements folates présentent une bande d'absorbance caractéristique à 348 nm (transition $\pi \rightarrow \pi^*$) avec un coefficient d'extinction molaire de $6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (section 2.1.5). La concentration en folate dans un échantillon de polymère (mmol/g) a été déterminée à l'aide de la loi de Beer. Connaissant les masses molaires des différents monomères ainsi que leurs taux d'incorporation (mol %), il était aussi possible par calculs de déterminer le taux de greffe en acide folique en fonction des monomères (mol %, voir tableau 3.3). Une autre technique qui a permis d'obtenir ces taux d'incorporation est la RMN ^1H . Le spectre de l'acide folique présente des doublets à 6.8 et 7.6 ppm respectivement (protons b et c respectivement, voir Figure 3.21) ainsi qu'un singulet à 8.8 ppm (proton a). La comparaison de l'intégration de ces pics avec ceux caractéristiques au NIPAM (signal à 4.0 ppm correspondant au proton méthine du groupe isopropyle et

signal à 1.1 ppm correspondant aux méthyles de l'isopropyle), à l'EDBEAm (signaux entre 3.2 et 3.8 ppm correspondant aux groupements éthylyes) et au N-n-octadécylacrylamide (produit **16**, signal à 0.88 ppm du méthyle terminal) permet comme dans le cas de la spectroscopie UV/VIS de déterminer le taux de folates incorporés (mol %).

Figure 3.22 : Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-FA (produit **15**) :

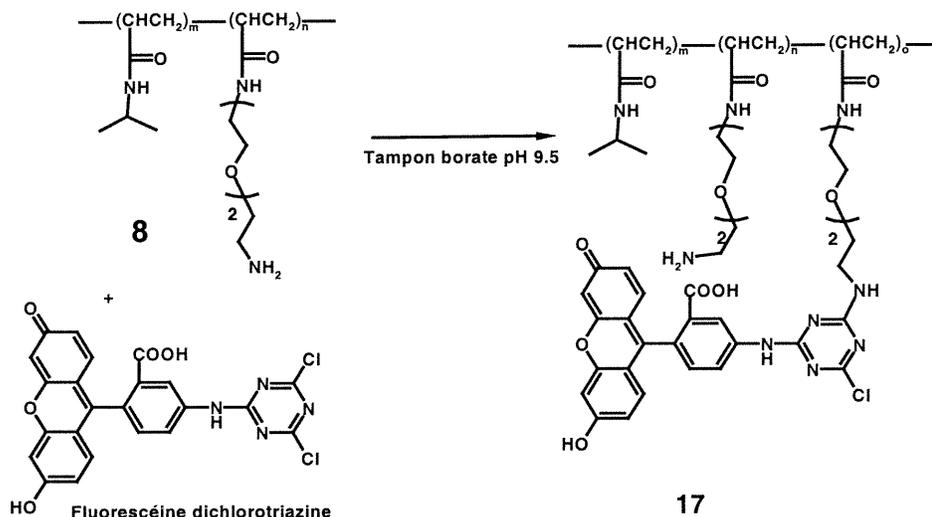


3.3.2 Fixation de la fluorescéine sur les polyacrylamides aminés

3.3.2 a) Synthèse

La fixation de la fluorescéine sur les poly(acrylamides) étudiés avait comme objectif de rendre les polymères fluorescents afin de permettre l'étude de leurs interactions avec les cellules cancéreuses par microscopie de fluorescence. La fluorescéine est un colorant fluorescent de choix pour plusieurs raisons. Elle possède une bonne hydrosolubilité, une haute absorptivité ainsi qu'un excellent rendement quantique. Mais ce qui en fait un fluorophore intéressant pour la microscopie de fluorescence, c'est que son maximum d'absorption (490 nm) correspond presque avec la ligne spectrale du laser argon-ion utilisé en microscopie de fluorescence, ce qui induit des limites de détection plus basses [37]. Dans le cas de cette greffe, la stratégie retenue était de faire réagir les amines des polymères avec de la fluorescéine possédant un groupement permettant une substitution nucléophile. Ainsi, la 5-([4,6-dichlorotriazin-2-yl]amino)-fluorescéine (fluorescéine triazine, voir Figure 3.23) a été réagie avec les polymères. Sur cette molécule, les chlores sont substitués par les amines pour former un lien covalent entre le dérivé fluorescent et le polymère.

Figure 3.23 : Greffe de la fluorescéine (exemple, synthèse du PNIPAM-NH-DTAF) :



Ainsi, la fluorescéine a été ajoutée à une solution aqueuse de polymère et le tout a été mélangé sur une période de 2 heures (voir section 2.5.3 ii). Il était important que le pH de la solution soit basique (entre 8.5 et 10.5) afin de bien déprotoner l'acide carboxylique de cette molécule. Étant alors sous forme ionique, la fluorescéine peut se solubiliser. En milieu acide, l'acide carboxylique est protoné, ce qui donne un caractère plus neutre à la molécule. Le caractère non-polaire organique prévaut alors et la molécule n'est plus soluble en milieu aqueux. Par ailleurs, la réaction a été effectuée à la température de la pièce ainsi que sur une courte période de 2 heures afin d'éviter que les deux chlores de la molécule ne soient substitués par des amines. Cette situation engendrerait des points de réticulations sur le polymère, ce qui pourrait éventuellement nuire à sa solubilité et créer un gel. À la fin de la réaction, pour éliminer le résidu de fluorescéine dichlorotriazine qui n'a pas été greffé sur les branches du polymère, il a fallu

dialyser le produit contre un tampon phosphate de pH 9.0-9.5. Ce pH élevé permettait alors à la fluorescéine de rester soluble durant la dialyse.

3.3.2 b) Caractérisation

Comme dans le cas des groupements folates, la détermination du contenu en fluorescéine des polymères s'est faite par UV/VIS. La fluorescéine possède une bande d'absorption attribuée à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ (coefficient d'extinction molaire de 70 000 L mol⁻¹cm⁻¹) à 490 nm. Aussi, de la même façon que pour le folate, les taux d'incorporation (mol %) ont pu être calculés. Pour tous les polymères synthétisés auxquels la fluorescéine a été greffée, l'objectif était un taux d'incorporation d'environ 1%, soit le pourcentage idéal pour que le polymère ne soit pas trop fluorescent tout en étant bien détectable par microscopie de fluorescence. Par UV/VIS, les taux obtenus variaient entre 0.75% et 1.2%, ce qui est très proche de la valeur ciblée. Par ailleurs, contrairement au folate, il a été difficile de déterminer les taux d'incorporation par RMN ¹H car le pourcentage était trop faible pour que les signaux soient bien distinguables. Malgré la présence d'un signal caractéristique (singulet, 6.58 ppm) attribué aux protons aromatiques du fluorophore, sa trop faible intensité a rendu cette méthode inadéquate.

Tableau 3.3 : Incorporation de l'acide folique et de la fluorescéine

Polymère	Contenu en folate (UV/VIS, mol%)	Contenu en fluorescéine (UV/VIS, mol%)	Contenu en C ₁₈ H ₃₇ (RMN ¹ H, mol%)
16	3	---	4
17	---	1	---
18 (PNIPAM- NH-FA-NH- DTAF)	5	1	---

CHAPITRE IV

Conclusion

4.1 Carboxyméthyl-dextrans aminés

Nous avons réussi à modifier des dextrans dans le but de leur greffer des branches aminées. En premier lieu, le dextran a été carboxyméthylé, puis le groupement carboxylate incorporé a été couplé à différentes diamines pour résulter en des carboxyméthyl-dextrans aminés. Leur purification s'est réalisée par dialyse extensive. Leurs identités et leurs puretés ont été confirmées par RMN ^1H . Leurs masses molaires ont été évaluées par GPC et leur taux d'amines ont été évalués par TNBS/UV. Les polymères résultants sont très solubles dans l'eau. L'objectif de modifier le dextran pour en faire un polymère aminé a donc été atteint. Son utilité dans le système des immunodosages est actuellement en cours.

4.2 Poly(N-isopropylacrylamides) aminés

Afin d'obtenir un Poly(N-isopropylacrylamide) aminé, il fallait passer par une copolymérisation avec un monomère aminé. C'est ainsi que le N'-BOC-N-EDBE acrylamide, monomère possédant une amine protégée, a été synthétisé et caractérisé. La RMN ^1H a permis de confirmer son identité ainsi que sa pureté. Ce monomère a ensuite été copolymérisé au NIPAM, puis l'amine a été déprotégée pour obtenir un copolymère

de NIPAM aminé hydrosoluble sans température minimale critique de précipitation (LCST). Les contenus des différents monomères ont été évalués par RMN ^1H . Comme dans le cas des CMDA, le contenu en amine a aussi été évalué par TNBS/UV. Ce polymère est actuellement étudié dans le système des immunodosages.

Afin de tester le potentiel de ciblage des cellules cancéreuses par le PNIPAM aminé, celui-ci a été couplé à de l'acide folique (agent ciblant) ainsi qu'à de la fluorescéine, ce qui permet d'étudier son interaction avec les cellules cancéreuses par spectroscopie et microscopie de fluorescence. De telles études ont déjà été effectuées sur ce polymère avec des résultats plus qu'encourageants [43,44]. Les dérivés fluorescents du PNIPAM-NH-FA ont été mis en contact avec des cellules cancéreuses (KB). Celles-ci ont assimilé le polymère et sont devenues fluorescentes (microscopie de fluorescence). Le dérivé fluorescent sans folate n'a, quant à lui, pas été ingéré par les cellules, qui ne sont pas devenues fluorescentes. Cela permet d'espérer que ce polymère puisse permettre le développement d'un nouveau traitement du cancer par sa contribution à un système de livraison d'agents thérapeutiques spécifiquement aux cellules malades.

Comme travail futur sur ce type de polymère, il serait intéressant d'étudier l'effet de la longueur des branches éthylèneoxydes sur l'interaction des folates avec les cellules ainsi que sur la solubilité du polymère comme, par exemple, la détermination concentration molaire maximale en NIPAM à laquelle le polymère est hydrosoluble peu importe la température. Aussi, les folates pourraient être greffés en bout de chaîne, les rendant ainsi plus accessibles pour réagir avec les récepteurs des cellules cancéreuses.

Références

1. Dickson, E. F. G.; Pollak, A.; Diamandis, E. P. *Journal of Photochemistry and Photophysics B : Biology*, **27**, 3, 1995.
2. Diamandis, E. P. *Clin. Biochem.*, **21**, 139, 1988.
3. Hemmila, I.; Dakubu, S.; Mikkala, V.-M.; Sitari, H.; Lovgren, T. *Anal. Biochem.*, **137**, 335, 1984.
4. Sinha, A. P. B. *Spectroscopy in Inorganic Chemistry*, **2**, 255, 1971.
5. Soini, E. *Pulsed Light, Time-Resolved Fluorimetric Immunoassay*, Pp. 197-208, Elsevier, New York, 1984.
6. Evangelista, R. A.; Pollak, A.; Allore, B.; Templeton, E. F.; Morton, R. C.; Diamandis, E. P. *Clin. Biochem.*, **21**, 173, 1988.
7. Diamandis, E. P.; Morton, R. C.; Reichstein, E.; Khosravi, M. J. *Anal. Chem.*, **61**, 48, 1989.
8. Christopoulos, T. K.; Diamandis, E. P. *Anal. Chem.*, **62**, 1149A, 1990.
9. Bayer, E. A.; Wilchek, M. *Methods of Biochemical Analysis*, **26**, 1, 1980.
10. Wilchek, M.; Bayer, E. A. *Immunology Today*, **5**, 39, 1984.
11. Scorilas, A.; Diamandis, E. P. *Clin. Biochem.*, **33**, 345, 2000.
12. Coney, L. R.; Tomaselti, A.; Carayannopoulos, L.; Frasca, V.; Kamen, B. A.; Colnaghi, M. I.; Zurawsky, V. R. *J. Cancer Research*, **51**, 6125, 1991.
13. Reddy, J. A.; Low, P. S. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems*, **15**, 587, 1998.

14. Weitman, S. D.; Lark, R. H.; Coney, L. R.; Fort, D. W.; Frasca, V.; Zurawsky, V. R. J.; Kamen, B. A. *Cancer*, **52**, 3396, 1992.
15. Ross, J. F.; Chaudhuri, P. K.; Ratnam, M. *Cancer*, **73**, 2432, 1994.
16. Weitman, S. D.; Frazier, K. M.; Kamen, B. A. *Journal of Neurology and Oncology*, **21**, 107, 1994.
17. Mattes, M. J.; Major, P. P.; Goldenberg, D. M.; Dion, A. S.; Hutter, R. V. P.; Klein, K. M. *Cancer Research (Suppl.)*, **50**, 880S, 1990.
18. Anderson, R. G. W.; Kamen, B. A.; Rothberg, K. G.; Lacey S. W. *Science*, **255**, 410, 1992.
19. Leamon, C. P.; Pastan, I.; Low, P. S. *J. Biol. Chem.*, **268**, 24847, 1993.
20. Lasic, D.; Martin, F. *Stealth Liposomes*, CRC Press, Boca raton, FL. 1995.
21. Ioan, C. E.; Aberle, T.; Burchard, W. *Macromolecules*, **33**, 5730, 2000.
22. Winnik, F. M. *Polymer*, **31**, 2125, 1990.
23. Ege, S. *Organic Chemistry, Structure and reactivity*, 3e édition, D.C. Heath and co., Lexington (MA), 1996, pp 1218-1225.
24. Ganachaud, F.; Monteiro, M. J.; Gilbert, R. G.; Dourges, M.-A.; Thang, S. H.; Rizzardo, E. *Macromolecules*, **33**, 6738, 2000.
25. Kuijpers, A. J.; Engbers, G. M. H.; Meyvis, T. K. de Smedt, S. S. C.; Demeester, J.; Krijgveld, J.; Zaat, S. A. J.; Dankert, J. Feijen, J. *Macromolecules*, **33**, 3705, 2000.
26. Blakeslee, D. *Journal of Immunological Methods*, **17**, 361, 1977.
27. Rebizak, R.; Shaefer, M.; Dellacherie, E. *Bioconjug. Chem.*, **8**, 605, 1997.
28. Rosemeyer, H.; Seela, F. *Makromolekulare Chemie*, **185**, 687, 1984.
29. Krapcho, A. P.; Kuell, C. S. *Synth. Commun.*, **20**, 2559, 1990.

30. Sanda, F.; Abe, T.; Endo, T. *Journal of Polymer science : Part A : Pol. Chem.* **35**, 2619,1997
31. Citro, G.; Szczylik, C.; Ginnobi, P.; Zupi, G.; Calabretta, B. *British Journal of Cancer*, **69**, 463, 1994.
32. de Belder, A. N.; Granath, K. *Carbohydrate Research*, **30**, 375, 1973
33. Skold, C. N.; Gibbons, I.; Russell, M. E.; Juaristi, E.; Rowley, G. L.; Ullman, E. F. *Biochim. Biophys. Acta*, **830**, 64, 1985.
34. Takeo, O. Brevet (Japan Kokai Tokkyo Koho JP 61,152,702 [86,152,702]), 1986.
35. Huynh, R.; Chaubet, F.; Jozefonvicz, J. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, **254**, 61, 1998.
36. Buckmann, A. F.; Kula, M.-R.; Wichmann, R.; Wandrey, C. *Journal of Applied Biochemistry*, **3**, 301, 1981.
37. Wells, S.; Johnson, I. *Three-Dimentional Confocal Microscopy : Volume Investigation of Biological Specimens*, J.K. Stevens, L. R. Mills et J. E. Trogadis, Eds., Academic Press, pp. 101-129, 1994.
38. Lee, R.; Wang, S.; Low, P. S. *Biochim. Biophys. Acta*, **1312**, 237, 1996.
39. Winnik, F. M. *Polymer*, **31**, 2125, 1990.
40. Dobrynin, A. V.; Rubinstein, M. *Macromolecules*, **32**, 915, 1999.
41. Erbil, C.; Ozdemir, S.; Uyanik, N. *Polymer*, **41**, 1391, 2000.
42. Winnik, F. M. *J. Phys. Chem.*, **93**, 7452, 1989.
43. Dubé, D. Poster Canadian Society for Chemistry 2001, 28 mai 2001, Montréal (Canada)

44. Dubé, D.; Francis, M.; Leroux, J. C.; Winnik, F. M. *Bioconj. Chem.* (en cours de soumission), 2001.
45. Ringsdorf, H.; Venzmer, J.; Winnik, F. M. *Macromolecules*, **24**, 1678, 1991.
46. Thomas, J. K. *Chem. Rev.*, **80**, 283, 1980.

Annexe A: Spectres RMN ^1H

Figure A.1: Spectre RMN ^1H de l'EDBE (CDCl_3):

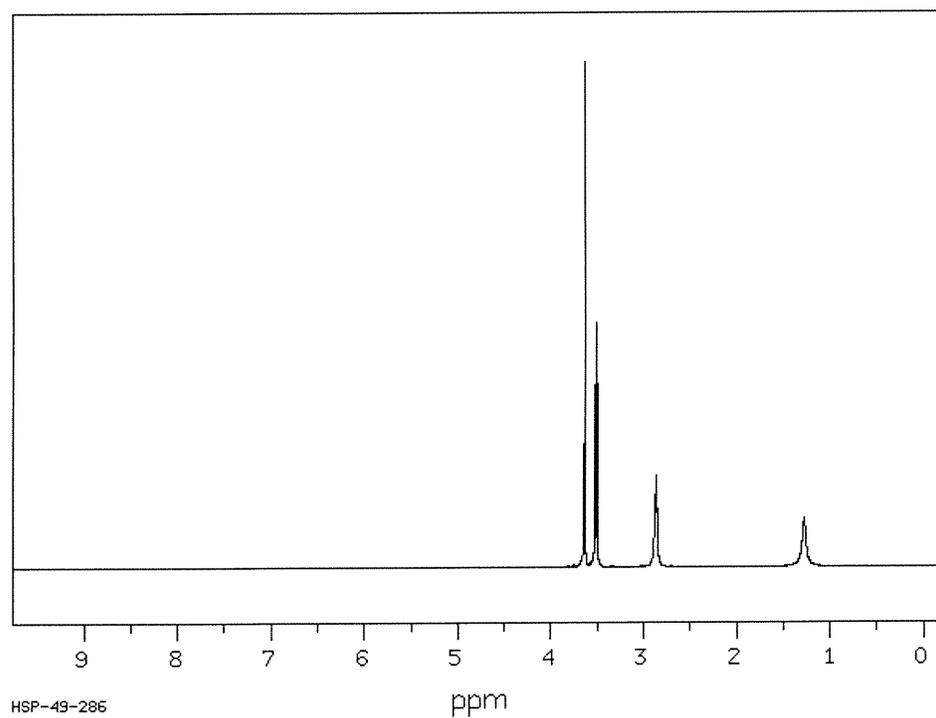


Figure A.2: Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-BOC (**3**, CDCl_3):

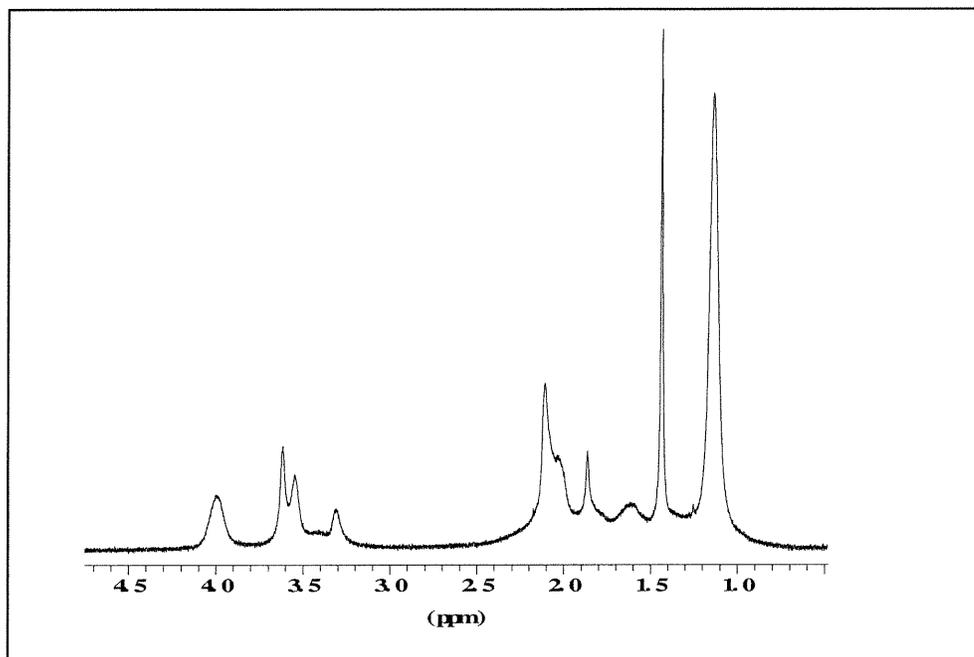


Figure A.3: Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-BOC (**4**, CDCl_3):

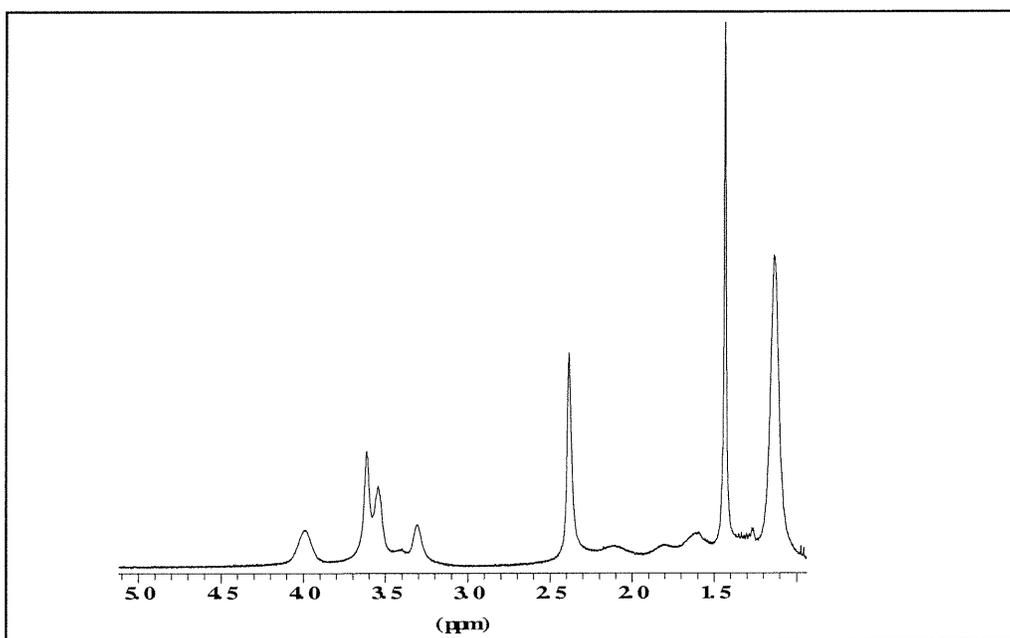


Figure A.4: Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-BOC (**5**, CDCl_3):

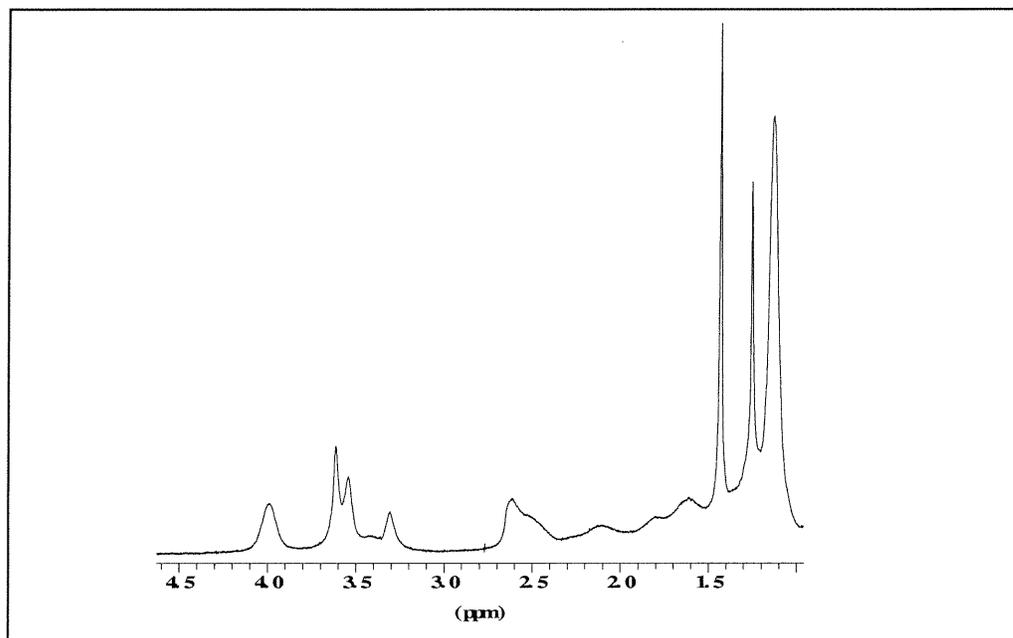


Figure A.5: Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-BOC (**6**, CDCl_3):

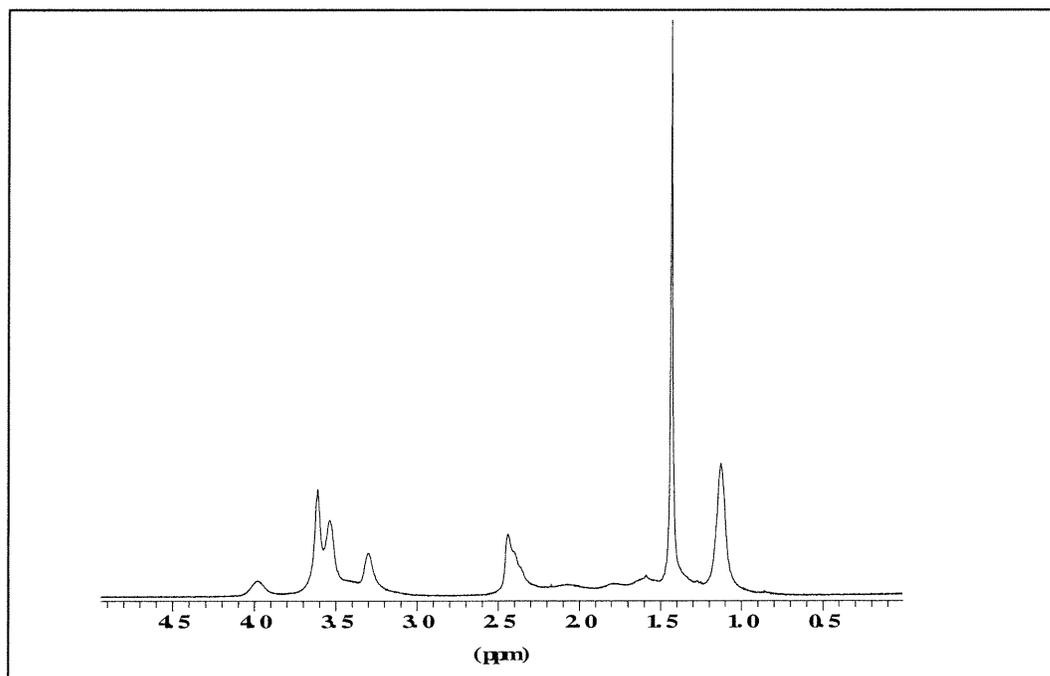
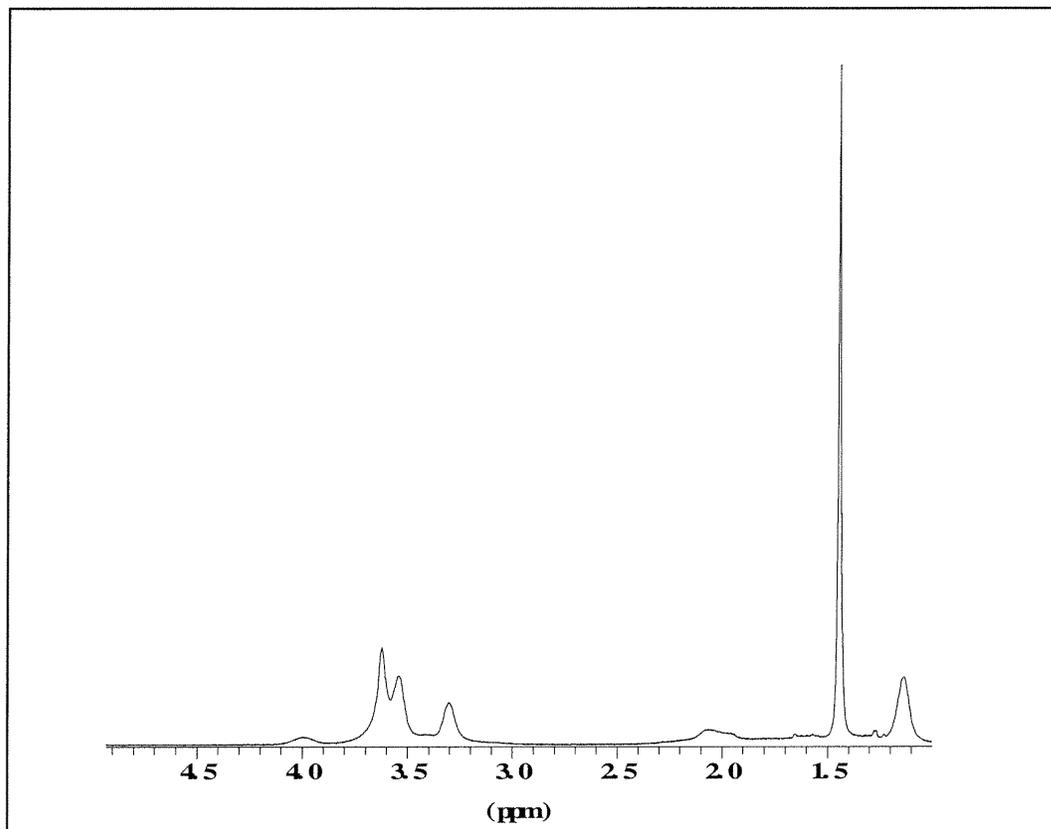


Figure A.6: Spectre RMN ^1H du PNIPAM-NH-BOC (7, CDCl_3):



Annexe B: Spectres IR

Figure B.1: Spectre IR du dextran T40

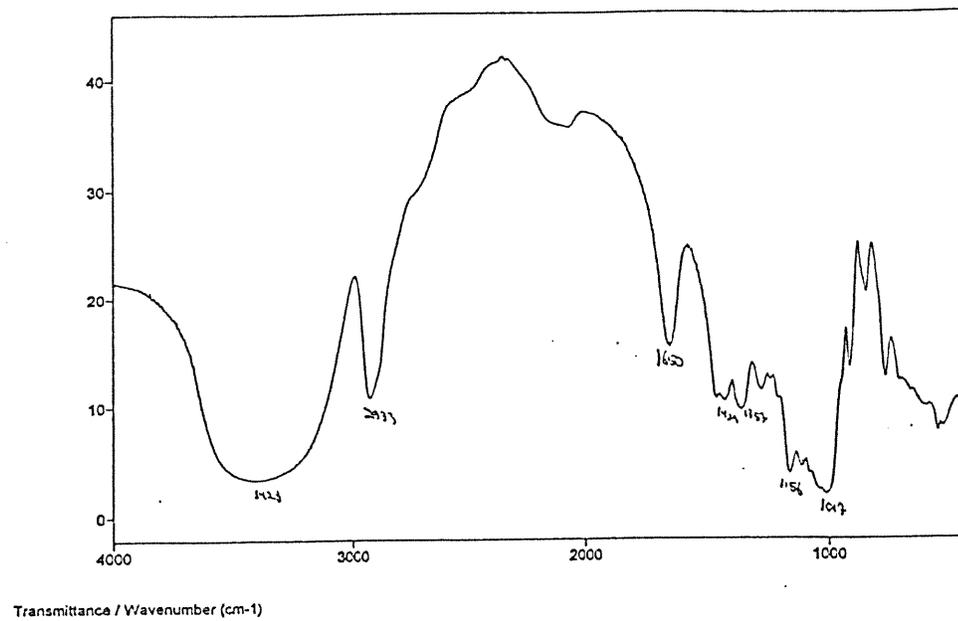


Figure B.2: Spectre IR du CMD (Dellacherie)

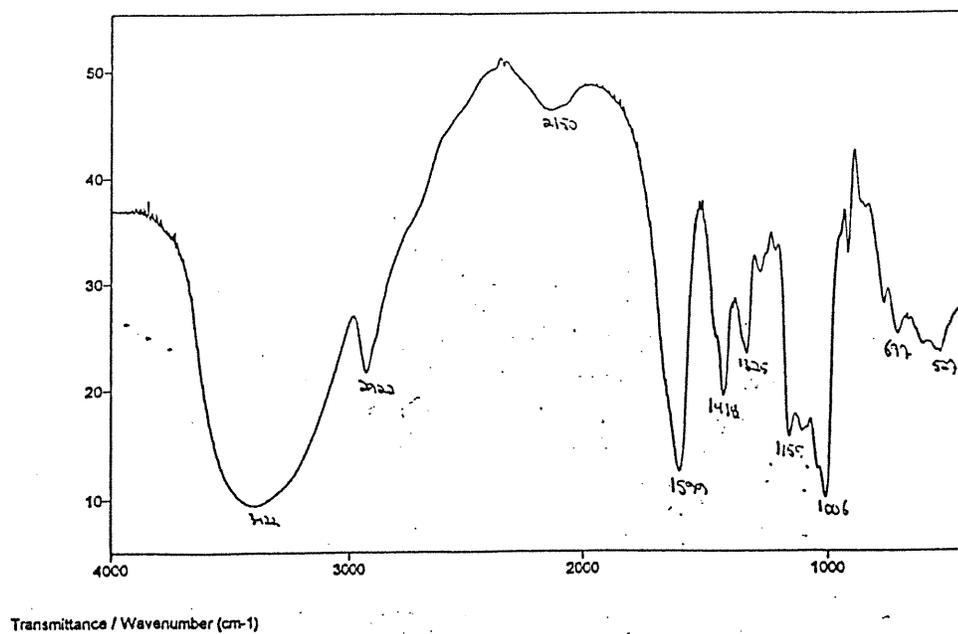
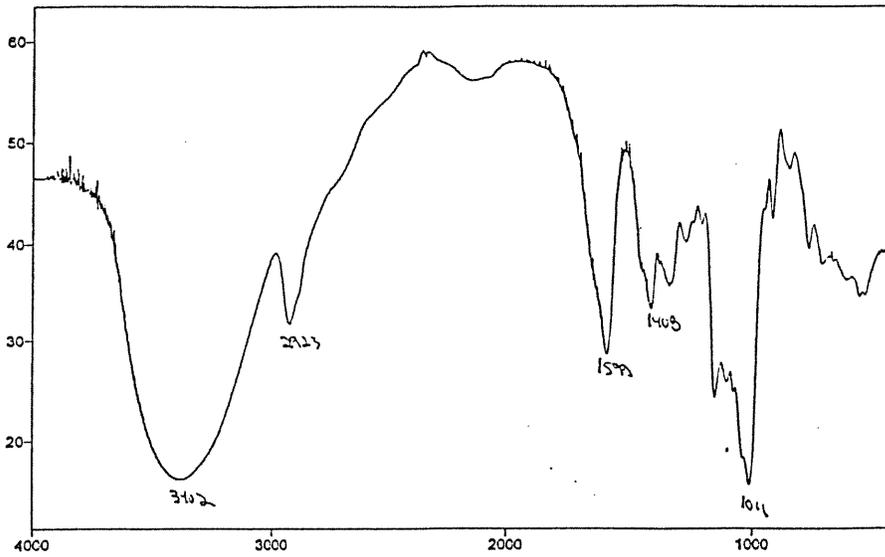
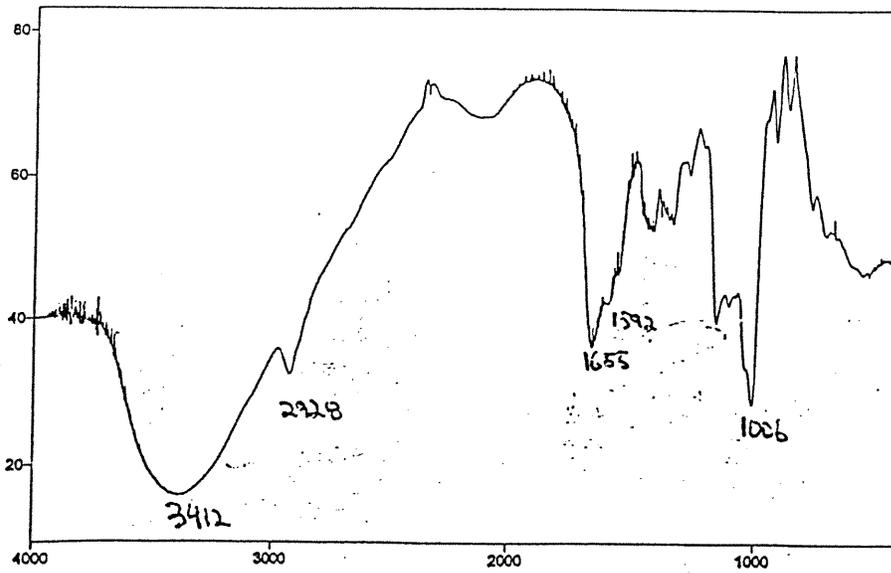


Figure B.3: Spectre IR du CMD (Takeo):



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

Figure B.4: Spectre IR du CMDA 1 :



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

Figure B.5: Spectre IR du CMDA 2 :

