

50376
1993
121

50376
1993
121

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN CHIMIE

Spécialité : Chimie Organique et Macromoléculaire

par

Bernard MARTEL

**ESTEROLYSE CATALYSEE PAR LA CYCLODEXTRINE ASSOCIEE A
LA POLY(VINYLAMINE) ET SES DERIVES BENZYLES**

Soutenue le 29 Juin 1993 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :



Mr	L. LECLERCQ	Professeur	Président
Mme	E. DELLACHERIE	Directeur de Recherches CNRS	Rapporteur
Mr	G. MULLER	Directeur de Recherches CNRS	Rapporteur
Mr	C. LOUCHEUX	Professeur	Examinateur
Mr	A. POLLET	Maître de Conférence	Examinateur
Mr	M. MORCELLET	Professeur	Examinateur

A Anne-Michèle

A mes parents

A mon frère

A ma famille

A tous mes amis

SOLDIGNAC - Mais qu'est-ce que vous avez à être agité comme ça ?
VATELIN , *remontant à soldignac* - Moi ! agité ! pas du tout ! j'ai l'air agité ?
SOLDIGNAC - Oui, vous êtes malade ?
VATELIN, *les pouces dans les poches de son gilet.* - Non, oui, oh ! un peu, très peu !
SOLDIGNAC - Colique ?
VATELIN, *distrain* - Hein ?
SOLDIGNAC - Mais il ne comprend rien du tout ! (*se frottant le ventre.*) Colique ?
VATELIN - Hein ? Non, oui ! Vous savez, entre les deux !
SOLDIGNAC - " Entre les deux " ! Alors c'est l'état normal.
VATELIN - Voilà, c'est plutôt ça ! Un peu d'état normal ! Ce ne sera rien (*remontant , tandis que Soldignac va s'asseoir sur le canapé.*) Ah ! mon dieu ! mon dieu !
A ce moment, sur la porte de droite qui s'est entre baillée, on voit le bras de Maggy qui dépose son corsage sur la chaise à côté de la porte.
SOLDIGNAC , *qui a vu le bras* - Aoh ! joli ! très joli !
VATELIN - Sapristi ! Le bras de Maggy !... (Haut.) Vous avez vu ? C'est... c'est un bras.
SOLDIGNAC, *s'asseyant dans le canapé* -. Aoh ! Je vois ! Très joli. Té, le coquinasse ! A qui ce bras ?
VATELIN - Je ne sais pas ! C'est pas d'ici ! C'est un bras qui est là... Alors, il est venu !... Il est venu sans venir !... C'est le bras du voisin !...
SOLDIGNAC - Blagueur ! C'est le bras de votre femme.
VATELIN - Voilà Vous l'avez dit, c'est le bras de votre femme... de ma femme... du voisin qui est ma femme !...

"Le Dindon", GEORGES FEYDEAU

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Claude LOUCHEUX, Directeur du Laboratoire qui a bien voulu m'accueillir. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde et respectueuse gratitude.

Monsieur le professeur Michel MORCELLET, Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille m'a initié à la recherche et a veillé sur ma formation de Chercheur. Ses conseils, son aide, ses encouragements et le climat détendu qu'il sait entretenir ont été pour moi une source de motivation continue. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mes plus vifs remerciements.

Monsieur Lucien LÉCLERCQ, Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille, a bien voulu me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je tiens à lui exprimer mes sentiments respectueux.

Je suis très honoré de la présence dans ce jury de Madame Edith DELLACHERIE, Directeur de Recherches au C.N.R.S., du Laboratoire de Physico-chimie des Macromolécules à Nancy. Je lui suis très reconnaissant d'avoir bien voulu juger ce travail et de participer au jury.

Je remercie Monsieur Guy MULLER, Directeur de Recherches au C.N.R.S., de l'Université de Rouen à Mont Saint Aignan, pour l'intérêt qu'il a porté à ce mémoire en acceptant d'en être l'un des rapporteurs.

Je suis très heureux que Monsieur Alain POLLET, Maître de Conférences à l'Université des Sciences et Technologies de Lille ait accepté de participer à ce jury. Je tiens à lui exprimer mes remerciements les plus sincères pour ses judicieux conseils et pour la disponibilité qu'il m'a réservée au cours de mon apprentissage de la technique de fluorescence.

Je remercie également Madame Joëlle MORCELLET, Professeur à l'École Universitaire des Ingénieurs de Lille pour son aide et ses conseils ainsi que Madame Anne Marie CAZE, Technicienne, pour sa participation active et polyvalente dans diverses phases de la réalisation de cette thèse.

C'est aussi un plaisir pour moi d'associer en une même pensée tous mes camarades du Laboratoire, sans lesquels les pauses-café pluri-quotidiennes n'auraient été que des temps morts venant nous perturber dans notre quête perpétuelle et existentielle du Savoir.

SOMMAIRE

GLOSSAIRE

INTRODUCTION GENERALE I

CHAPITRE I : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE POLYMERES

A BASE DE VINYLAMINE 1

A/SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DU MONOMÈRE 4

I SYNTHÈSE DU NVTBC 4

1 Protocole expérimental..... 4

1.1 Synthèse de l'azide d'acryloyle..... 4

1.2 Conversion de l'azide en NVTBC..... 5

2 Caractérisation du NVTBC 6

3 Conclusion 9

B/ POLYMERISATION ET COPOLYMERISATION. OBTENTION DE LA PVAm..... 10.

I POLYMERÉ HYDROSOLUBLE = PVAm..... 10

1 Synthèse du PNVTBC..... 10

1.1 Mode opératoire..... 10

1.2 Caractérisation du PNVTBC..... 11

2 Solvolysé du PNVTBC. Obtention de la PVAm,HCl..... 12

2.1 Protocole expérimental 13

2.2 Caractérisation de la PVAm,HCl 13

2.3 Conclusion 14

3 Déchlorhydratation de la PVAm,HCl..... 14

3.1 Mode opératoire..... 15

3.2 Caractérisation de la PVAm..... 15

3.2.1 Caractérisation IR..... 15

3.2.2 Analyse élémentaire..... 15

3.2.3 RMN..... 15

3.2.4 Potentiométrie 17

II SYNTHÈSE DE LA PVAm BENZYLÉE..... 19

1 Mode opératoire..... 19

2 Caractérisation..... 19

2.1 Mesure du degré de substitution 19

2.2 RMN 20

2.3 Viscosimétrie..... 21

2.4 Potentiométrie..... 23

III SYNTHÈSE DE COPOLYMERES MACROPOREUX A BASE DE VINYLAMINE.....	23
C/ CONCLUSION DU CHAPITRE I.....	24
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE I.....	25

CHAPITRE II : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE POLYMERES CATALYSEURS

HYDROSOLUBLES SUPPORTS DE CYCLODEXTRINE A BASE DE POLYVINYLAMINE.....	27
A/ LES CYCLODEXTRINES : GENERALITES	29
I HISTORIQUE.....	29
II OBTENTION DES CYCLODEXTRINES.....	30
III PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA β CD.....	31
1 Structure	31
2 les complexes d'inclusion.....	32
IV LES APPLICATIONS DES CYCLODEXTRINES.....	33
1 Applications industrielles.....	34
2 Applications pharmaceutiques.....	35
3 Chimie fine.....	36
3.1 Modèle d'enzyme et activité catalytique.....	36
3.2 Chromatographie	36
B/ FIXATION DE LA CYCLODEXTRINE SUR LES POLYMERES SUPPORTS	37
I TOSYLATION DE LA β CD.....	37
1 Mode opératoire.....	37
2 Caractérisation du β CD OTs.....	38
II GREFFAGE DE LA β -CD SUR LA PVAm	41
III GREFFAGE DE LA β CD SUR LES MACROPOREUX.....	41
C/ CARACTÉRISATION DES POLYMERES GREFFES.....	43
I METHODES DE DOSAGE DE LA β CD	43
1 Introduction.....	43
2 Oxydation périodique.....	43
3 Complexation de la phénol phtaléine.....	44
4 Polarimétrie	45
5 Dosage des sucres réducteurs par le bleu tétrazolium.....	46
II CARACTÉRISATION	47
1 RMN, spectro UV	47
2 Dosage de la β CD fixée sur les polymères.....	50
3 Etude viscosimétrique de la série PVACD et des mélanges PVAm/ β CD.....	51
3.1 Conditions opératoires	51

3.2 Résultats.....	51
3.3 Interprétations	53
4 Mise en évidence d'interactions entre la PVAm et la β CD par potentiométrie.....	54
4.1 Principe	54
4.2 Résultats.....	55
4.3 Interprétations	56
D/ CONCLUSION DU CHAPITRE II	59
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE II.....	60

CHAPITRE III : RAPPELS THEORIQUES SUR LA CINETIQUE ENZYMATIQUE ET SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE A PROPOS DES REACTIONS

D'ESTEROLYSE.....	62
A/ LA CINETIQUE ENZYMATIQUE- GENERALITES.....	64
I RAPPELS DE CINETIQUE.....	64
II ENERGIE LIBRE D'ACTIVATION ET EFFET DES CATALYSEURS.....	66
III EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN.....	67
IV TRANSFORMATION DE L'EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN.....	72
B/ ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE CONCERNANT LES REACTIONS D'ESTEROLYSE CATALYSEES PAR LA CYCLODEXTRINE ET DIVERS POLYMERES FONCTIONNELS.....	74
I LES ESTERS DE NITROPHENOL.....	74
II ACTIVITE CATALYTIQUE DE LA CYCLODEXTRINE	76
1 Mécanisme de la réaction	76
2 Compatibilité cavité/substrat.....	77
3 Effet stéréo sélectif de la cyclodextrine.....	80
III AMELIORATION DES PROPRIETES CATALYTIQUES DE LA CYCLODEXTRINE PAR MODIFICATION COVALENTE ET NON COVALENTE	81
1 Accélération de l'étape de désacétylation	81
2 Cyclodextrines modifiées.....	82
2.1 Cyclodextrines supports de fonctions aminées	83
2.2 Autres types de modifications.....	84
IV ACTIVITE CATALYTIQUE DES POLYMERES EN PHASE HOMOGENE.....	85
1 Mise en évidence de phénomènes coopératifs	85
2 Activité des polyamines non modifiées.....	86
2.1 Réactivité des polyamines	86
2.2 PKa et degré de polymérisation de la PVAm.....	87
3 Influence du pH sur la conformation de la PVAm.....	88

4 Polyamines modifiées	89
V ETUDES DES SYSTEMES POLYMERES-CYCLODEXTRINE	91
1 Diffusion de la cyclodextrine en solution aqueuse de polymère	91
2 Etude de systèmes catalytiques polymères/cyclodextrine	92
2.1 Polyélectrolytes	92
2.2 Systèmes PAA/ β CD.....	94
3 Conclusion	94
VI ETUDE DE POLYMERES CATALYSEURS SUPPORTS DE CYCLODEXTRINE.....	95
1 Cyclodextrine polymérisée.....	95
2 Polyallylamines porteuses de β -cyclodextrine.....	97
C/ CONCLUSION DU CHAPITRE III.....	98
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE III.....	99

CHAPITRE IV : PROPRIETES CATALYTIQUES ET ORGANISATION DE SYSTEMES

COMPOSES DE β -CYCLODEXTRINE ET DE PVAm	105
A/ METHODE EXPERIMENTALE DU SUIVI DE LA REACTION D'HYDROLYSE D'ESTERS DE NITROPHENOL.....	107
I PRINCIPE ET MESURE DES CONSTANTES DE VITESSE.....	107
1 Méthode d'exploitation des données expérimentales	107
2 Réactions catalysées	108
2.1 Réactions du second ordre.....	108
2.2 Réaction de type enzymatique.....	108
II EXPERIMENTATION DU SUIVI CINETIQUE	108
1 Le substrat	108
2 Le solvant.....	109
3 Instrumentation-Mode opératoire.....	109
B/ ETUDE CINETIQUE DES SYSTEMES PVAm/ β CD NON GREFFES	110
I ACTIVITE CATALYTIQUE DES AMINES ET POLYAMINES	110
II INFLUENCE DES FONCTIONS AMINES SUR LES PROPRIETES CATALYTIQUES DE LA β CD - ASSOCIATION AMINE/ β CD	112
1 Valeurs expérimentales.....	112
2 Etude du complexe β CD-p-nitrophénolate.....	114
3 Interprétation.....	115
III ETUDE DES MODIFICATIONS DES PROPRIETES CATALYTIQUES DE LA PVAm PAR AJOUT DE β CD.....	116
1 Données cinétiques expérimentales.....	116
2 Interprétations.....	117

IV CONCLUSION.....	117
C/ APPROCHE EXPERIMENTALE DE LA THERMODYNAMIQUE DE L'HYDROLYSE DU PNPA PAR LE MELANGE β CD/PVAm.....	119
I APPROCHE THEORIQUE.....	119
1 Mécanisme et explication thermodynamique de l'inclusion....	119
2 L'inclusion.....	119
2.1 Mécanisme.....	120
2.2 Règles thermodynamiques de l'inclusion	121
3 Manifestations moléculaires de l'énergie d'activation du complexe.....	123
4 Transformation mathématique des données cinétiques.....	123
II RESULTATS EXPERIMENTAUX	124
1 Données cinétiques.....	124
2 Influence de la PVAm sur la formation du complexe.....	125
3 Influence de la PVAm sur l'activation du complexe	126
4 Bilan des deux étapes précédentes	127
5 Mesure de l'énergie d'activation de la réaction par la loi d'Arrhénius.....	128
D/ ETUDE CINETIQUE DES SYSTEMES PVAm- β CD GREFFES.....	131
I MESURES ET EXPLOITATION DES MESURES	131
II RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	131
III INTERPRETATION DES RESULTATS.....	133
E/ INTERACTIONS DES SYSTEMES PVACD AVEC UN COMPOSE FLUORESCENT..	136
I PRINCIPE FONDAMENTAL DE LA PHOTOLUMINESCENCE.....	136
II APPAREILLAGE...136	
III ORIGINE DE LA FLUORESCENCE DU TNS.....	136
IV EXPLOITATION DE LA TECHNIQUE DE FLUORESCENCE.....	139
1 Stoechiométrie.....	139
2 Observation des complexes 1-1 et 2-1	139
2.1 Méthode de la variation continue.....	139
2.2 Détermination des constantes de dissociation.....	140
V APPLICATION DE LA FLUORESCENCE SUR LES POLYMERES GREFFE	141
1 Mise au point des paramètres de mesure.....	141
1.1 Spectre d'absorption du TNS.....	141
1.2 Spectres d'émission et d'excitation.....	143
1.3 Autres réglages du fluorimètre.....	144

2 Détermination de la stoechiométrie des complexes.....	145
2.1 Diagramme de JOB.....	145
2.2 Interprétations.....	146
3 Mesure des constantes de dissociation.....	147
3.1 Conditions opératoires.....	147
3.2 Résultats.....	147
3.3 Discussion et interprétation des résultats.....	151
4 Conclusion.....	155
F/ CONCLUSION DU CHAPITRE IV.....	157
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE IV.....	158
CHAPITRE V : UTILISATION DES PVAm BENZYLEES DANS LA CATALYSE	
DE L'HYDROLYSE DU PNPA.....	161
A/ CATALYSE.....	164
I CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	164
II RESULTATS ET DISCUSSION.....	164
1 Résultats expérimentaux.....	164
2 Interprétations.....	166
B/ MESURE DU POUVOIR SOLUBILISANT PAR FLUORESCENCE.....	168
I CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	168
II CALCUL DE Kd A PARTIR DES MESURES.....	168
III RESULTATS.....	169
IV INTERPRETATION DES RESULTATS.....	170
C/ CONCLUSION DU CHAPITRE V.....	174
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE V.....	175
CONCLUSION GENERALE.....	177
ANNEXES.....	180

GLOSSAIRE

POLYMERES

NaPSS	polystyrène sulfonate de sodium
PMA	acide polyméthacrylique
poly-CD-A	polyacryloyle- β -cyclodextrine
PVAm	polyvinylamine
PVAm,HCl	chlorhydrate de polyvinylamine
PAA	polyallylamine
PAA-CD	polyallylamine porteuse de β CD
l-PEI	polyéthylèneimine linéaire
b-PEI	polyéthylèneimine branchée
PNVTBC	poly-N-vinyl-tertio-butylcarbamate
PVAB22	polyvinylamine benzylée DS = 22%
PVAB34	polyvinylamine benzylée DS = 34%
PVAB46	polyvinylamine benzylée DS = 46%
PVAB52	polyvinylamine benzylée DS = 52%
PVACD05	polyvinylamine porteuse de β -cyclodextrine DS = 0,2%
PVACD06	polyvinylamine porteuse de β -cyclodextrine DS = 0,3%
PVACD18	polyvinylamine porteuse de β -cyclodextrine DS = 0,9%
PVACD24	polyvinylamine porteuse de β -cyclodextrine DS = 1,2%
PVACD28	polyvinylamine porteuse de β -cyclodextrine DS = 1,5%
PVACD35	polyvinylamine porteuse de β -cyclodextrine DS = 2,0%
PVACD57	polyvinylamine porteuse de β -cyclodextrine DS = 5,0%

MONOMERES

NVTBC	N-Vinyl-tertio-butylcarbamate
DVB	divinyl benzène
DMG	diméthacrylate d'éthylène glycole

TECHNIQUES

RMN ^1H OU ^{13}C	résonance magnétique nucléaire du proton ou du carbone 13
IR	spectroscopie infra-rouge
CPG	chromatographie par perméation de gel
HPLC (CHLP)	chromatographie liquide haute performance

FAB	spectrométrie de masse en "fast atom bombardment"
UV	spectroscopie ultra-violet

SYNTHESES

AIBN	azo-bis-isobutyronitrile
CD	cyclodextrine
α, β, γ CD	α, β, γ -cyclodextrine
β CD OTs	mono-6-p-toluènesulfonyle- β -cyclodextrine
(β CD) ₂ G	glutarate de (bis)- β -cyclodextrine
(β CD) ₂ S	succinate de (bis)- β -cyclodextrine
K _d	constante de dissociation
K _m	constante de <i>Michaelis-Menten</i>
TsOH	acide p-toluène sulfonique
β CD-en	mono-6-éthylènediamine- β -cyclodextrine

GRANDEURS

DS	degré de substitution (% des motifs substitués)
ppm	partie par million
DO	densité optique
DP	degré de polymérisation
$(\alpha)_D^{25}$	pouvoir rotatoire spécifique à 25°C
ϵ	coefficient d'extinction molaire

CINETIQUE/FLUORESCENCE

Tris	tampon tris-hydroxyméthylaminoéthane
MNPA	acétate de méta-nitrophényl
PNPA	acétate de para-nitrophényl
PNPH	hexanoate de para-nitrophényl
PNPB	benzoate de p-nitrophényl
pNP-pNB	p-nitrobenzoate de p-nitrophényl
TNS	2-p-toluidinylnaphtalène-6-sulfonate de potassium

INTRODUCTION GENERALE

Les poly(alkylamines) suscitent depuis quelques années un grand intérêt tant sur le plan fondamental qu'industriel. Cet intérêt repose, en grande partie, sur la forte réactivité des fonctions amines primaires ou secondaires qu'elles portent et qui permet par des réactions chimiques appropriées, d'aboutir à de nouveaux polymères extrêmement variés utilisés dans les domaines d'application très diversifiés. Parmi ces polyamines, les plus connues sont : la poly(allyl)amine (PAA) et les poly(éthylèneimines) (PEI) linéaire (l-PEI) ou branchée (b-PEI) qui sont commerciales.

En raison du caractère nucléophile de la fonction amine, ces polyalkylamines présentent une activité catalytique plus ou moins importante, en particulier dans les réactions d'estérolyse^{1,2,3}. On trouve dans la littérature de nombreux exemples de modifications chimiques de ces polyamines qui consistent à leur greffer différents groupes fonctionnels afin d'en faire des modèles synthétiques pour copier le comportement des enzymes naturelles^{4,5,6,7,8}. C'est ainsi que des polymères fonctionnalisés par l'imidazole^{9,10,11} ou la cyclodextrine^{12,13,14}, par exemple, ont été décrits. Dans la majorité des cas, ces modifications apportent une forte augmentation de l'activité catalytique qui a pour origine l'accumulation de sites actifs dans l'environnement hydrophobe apporté par la chaîne polymère. Des résidus hydrophobes ont également été greffés en chaîne latérale sur ces polyamines, conduisant à des modifications de conformation (passage à des conformations compactes analogues à celles des protéines globulaires) et à une augmentation de l'activité catalytique.

En comparaison avec les polyamines mentionnées ci-dessus, la polyvinylamine (PVAm) a été relativement peu étudiée dans la littérature, sans doute en raison de son caractère non commercial et des problèmes de synthèse qu'elle présente. Par contre, cette polyamine et ses copolymères ont été assez largement étudiés dans notre Laboratoire. L'un des avantages de l'utilisation du NVTBC est que celui-ci est copolymérisable et peut fournir une gamme de copolymères très variée : l'utilisation de comonomères tels que la vinylpyrrolidone ou le méthacrylate de méthyle¹⁵ ou la synthèse de macroporeux à base de styrène¹⁶ ont été publiées. Ces billes macroporeuses ont été utilisées comme agents adsorbants de métaux lourds^{17,18} ou de composés aromatiques en solution¹⁹ et ont également été greffées par la β -cyclodextrine pour la dépollution d'eaux contaminées par des composés aromatiques²⁰ (Annexe 1) ou encore, utilisées comme phases stationnaires en HPLC²¹. Dans le même domaine, la silice a été passivée par la PVAm pour la séparation d'isomères du nitrophénol ou la chromatographie d'affinité²². La PVAm a également été utilisée comme polymère de base pour l'élaboration de polymères photosensibles.

Dans le domaine de la catalyse évoqué ci-dessus, la PVAm a une activité assez faible comparée à celle de la l-PEI ou de la b-PEI et voisine de celle de la l-PEI. Il nous a

paru intéressant d'étudier l'effet de diverses modifications de la PVAm, consistant en particulier à greffer la β -cyclodextrine sur la chaîne polymère ou à augmenter son caractère hydrophobe par l'introduction de groupes benzyles, dans l'espoir d'augmenter son activité catalytique. Nous avons choisi comme substrat l'acétate de para-nitrophénol, pour lequel de nombreux points de comparaison sont disponibles dans la bibliographie.

Le Chapitre I sera consacré à la synthèse et à la caractérisation de la polyvinylamine ainsi qu'à sa modification par le greffage de groupements benzyles et les effets sur la conformation des polymères.

Le Chapitre II décrit les propriétés générales des cyclodextrines et en particulier leur aptitude à former des complexes d'inclusion avec des composés hydrophobes ainsi que leur activité catalytique, qui est de type enzymatique et obéit à la loi de Michaelis-Menten. La modification de la PVAm par greffage de la β CD est également décrite dans ce chapitre.

Une revue bibliographique consacrée à l'hydrolyse des esters de nitrophénol est présente dans le Chapitre III. Nous y recenserons les travaux déjà effectués en ce qui concerne l'influence de la présence de polymères synthétiques (et notamment les polyamines) sur la cinétique du deuxième ordre de ces réactions. L'effet de la modification chimique de ces polyamines sur leur pouvoir catalytique sera également évoqué. Les travaux consacrés aux propriétés catalytiques des cyclodextrines sous forme native, modifiée, greffée ou polymérisée seront également rappelés. La littérature ne mentionne que deux exemples d'activité catalytique de polymères greffés par la cyclodextrine (acryloyl-cyclodextrine polymérisée et PAA greffée par la β CD) malgré l'intérêt présenté par de tels systèmes.

L'essentiel de nos résultats expérimentaux est présenté dans le Chapitre IV qui présente l'activité catalytique de la PVAm greffée par la β CD. Les aspects thermodynamiques de la réaction de formation du complexe catalyseur-substrat et de la réaction de coupure de l'ester y sont également décrits ainsi que les aspects conformationnels abordés par la technique de fluorescence.

Le Chapitre V est consacré aux dérivés benzylés et permet de mieux comprendre l'influence de la conformation du polymère support du catalyseur sur la cinétique de réaction.

L'une des annexes (Annexe 1) décrit un travail réalisé parallèlement aux études ci-dessus et qui concerne l'utilisation de polymères réticulés macroporeux, greffés par la β CD, pour l'extraction de composés organiques à partir de solutions aqueuses.

- 1 G. P. ROYER, I. M. KOLTZ
J. Am. Chem. Soc. (1969), 91 , 5885
- 2 I.M. KOLTZ, V.H. STRYKER
J. Am. Chem. Soc. (1968), 90 , 2717
- 3 A. EVERAERTS, C. SAMYN, G. SMETS
Makromol. Chem. (1984), 185 , 1881
- 4 J. A. PAVLISKO, G. C. OVERBERGER
J. Polym. Sci. ; Polym. Chem. Ed. (1981), 19 , 1621
- 5 W. M. BROUWER, P. PIET, A.L. GERMAN
Makromol. Chem. (1984), 185 , 363
- 6 V. S. PSHEZHETSKII, G. A. MURTAZAEVA, V. A. KABANOV
Eur. Polym. J. (1974), 10 , 581
- 7 V. S. PSHEZHETSKII, A.P. LUKYANOVA, V. A. KABANOV
J. Molec. Catal. (1977), 2 , 49
- 8 V. S. PSHEZHETSKII, G. M. NIKOLAEV, A. P. LUKJANOVA
Eur. Polym. J., (1977), 13 , 423
- 9 R. TOMKO, G. C. OVERBERGER
J. Polym. Sci. ; Polym. Chem. Ed. (1985), 23 , 265
- 10 G.C. OVERBERGER, T. S^T PIERRE, N. VORCHEIMER, J. LEE, S. YAROSLAVSKY
J. Am. Chem. Soc. (1964), 87 , 296
- 11 C.G. OVERBERGER, J. C. SALAMONE, Y. YAROSLAVSKY
J. Am. Chem. Soc. (1967), 89 , 6231
- 12 T. SEO, T. KAJIHARA, K. MIWA, T. IIJIMA
Makromol. Chem. (1991), 192 , 2357
- 13 M. FURUE, A. HARADA, S. NOZAKURA
J. Polym. Sci. , Polym. lett. (1975), 13 , 357
- 14 A. HARADA, M. FURUE, S. NOZAKURA
Macromolecules (1976), 9 , 701
- 15 L. JANUS, J. MORCELLET, M. DELPORTE, M. MORCELLET
Eur. polym. J. (1992), 28 , 1185
- 16 L. JANUS, H. TBAL, M. DELPORTE, J. MORCELLET, M. MORCELLET
Polymer bulletin (1990), 23 , 13
- 17 H. TBAL, J. MORCELLET, M. DELPORTE, M. MORCELLET
J. Macromol. Sci. (1992), A29 , 699

-
- 18 H. TBAL, J. MORCELLET, M. DELPORTE, M. MORCELLET
Eur. Polym. J. (1992), 28 , 671
- 19 B. MARTEL, M. MORCELLET
J. Appl. Polym. Sci. sous presse.
- 20 B.MARTEL, M.DELPORTE, Y.LEKCHIRI, J.MORCELLET, M. MORCELLET
Bull. Soc. Belges, (1990), 191 , 1633
- 21 L. JANUS
Thèse de Doctorat Université de Lille I, (1991)
- 22 Y. LECKCHIRI
Thèse, Faculté des Sciences d'Oujda (1992)

CHAPITRE I

SYNTHESE ET CARACTERISATION DE POLYMERES A BASE DE VINYLAMINE

INTRODUCTION

Dans le but de préparer une polyvinylamine d'une grande pureté, différents polymères précurseurs ont fait l'objet de nombreuses recherches.

La dégradation d'HOFMANN appliquée au polyacrylamide est la méthode la moins onéreuse pour synthétiser la PVAm¹. Le mécanisme mis en jeu est assez complexe donnant ainsi lieu à des réactions secondaires dont principalement, la formation de groupements carboxyliques et imides. Récemment, une étude visant à optimiser cette méthode a été menée dans notre Laboratoire² par un meilleur contrôle des conditions opératoires.

Une autre méthode mettant en oeuvre la réaction de SCHMIDT qui consiste à transformer un groupement carboxylique en un groupement amine, a été réalisée sur l'acide polyacrylique³. Cette réaction est également incomplète et aboutit à un copolymère de vinylamine et d'acide acrylique.

Ces deux méthodes qui utilisent des réactions complexes ne peuvent être retenues pour préparer la PVAm avec la pureté recherchée. Le recours aux polymères précurseurs comportant une fonction amine masquée s'est donc imposé.

En effet, ces polymères à amine masquée sont facilement transformés en polyvinylamine par simple clivage ou hydrolyse. Ainsi, quatre polymères précurseurs ont été étudiés :

- le poly (N-Vinylphtalimide)^{4,5},
- le poly (N-Vinylsuccinimide)⁶,
- le poly (N-Vinylacétamide)⁷,
- et le poly (N-Vinyl-tertio-butylcarbamate)^{8,9}.

La pureté de la PVAm est supérieure à 95 % pour les trois premières méthodes et elle est quasiment de 100 % pour la dernière méthode.

Nous avons donc choisi la méthode de HART⁸, revue par VAN TRESLONG et MORRA⁹ puis adaptée par HUGUES et ST PIERRE¹⁰.

La méthode consiste à préparer un précurseur de la vinylamine, en l'occurrence le N-Vinyl-t-butylcarbamate (NVTBC) qui par polymérisation radicalaire conduit au poly (N-Vinyl-t-butylcarbamate) lequel est hydrolysé pour donner la polyvinylamine. De plus, on peut remarquer, que le fait de disposer du monomère NVTBC permet d'accéder à une grande variété de copolymères.

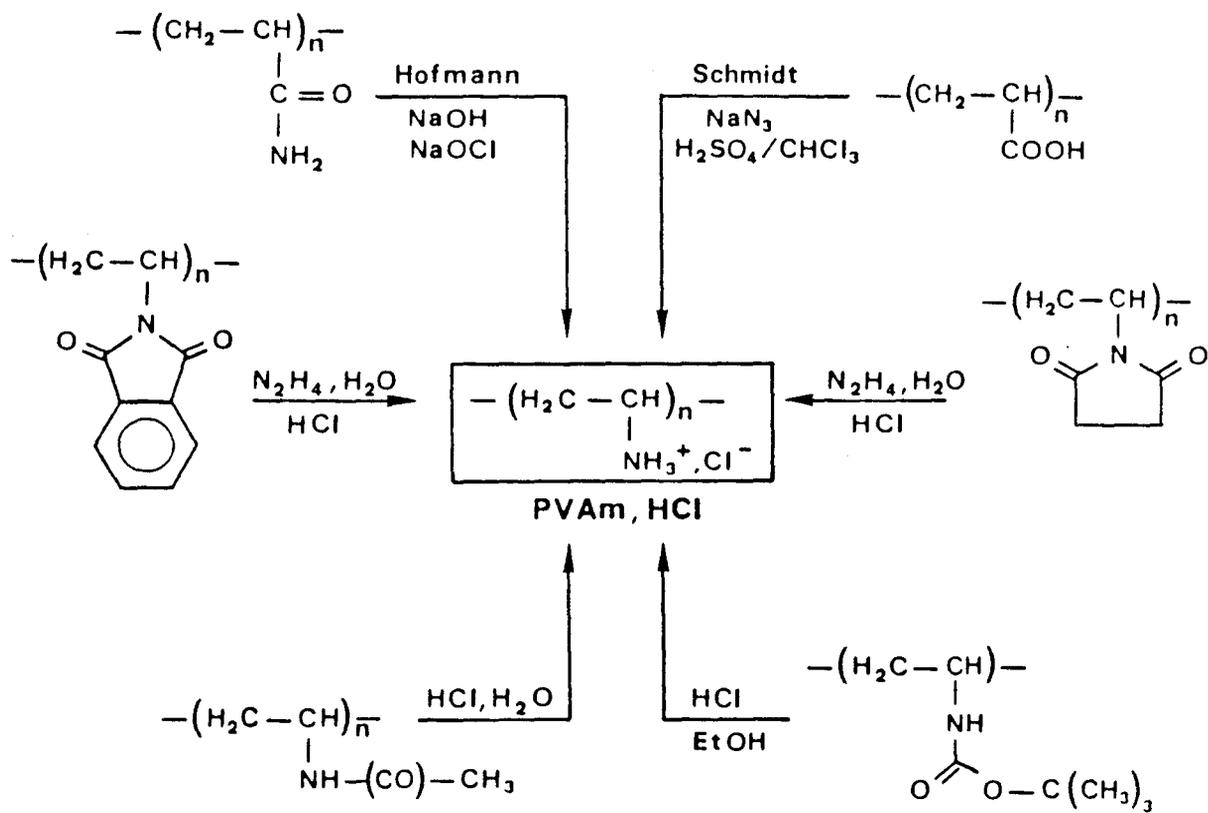


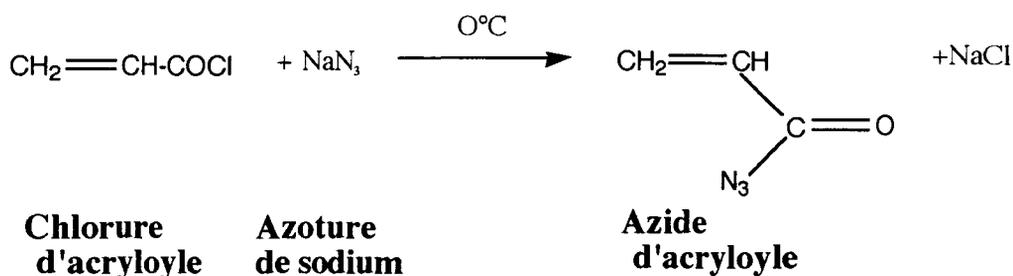
Figure 1.1 : Polymères précurseurs de la polyvinylamine

A/ SYNTHESE ET CARACTERISATION DU MONOMERE

I SYNTHESE DU NVTBC

La synthèse du NVTBC se fait en deux étapes à partir du chlorure d'acryloyle qui est dans une première étape transformé en azide correspondant, lequel azide permet dans une seconde étape d'accéder au NVTBC recherché via un intermédiaire isocyanate.

Le chlorure d'acryloyle comme tous les chlorures d'acides, réagit facilement à froid avec l'azoture de sodium pour donner l'azide d'acryloyle :



1 Protocole expérimental

1.1 Synthèse de l'azide d'acryloyle

Dans un ballon tricol muni d'un agitateur à pales, d'un thermomètre et d'une ampoule à brome, on introduit de l'azoture de sodium (125 g ; 1,923 moles) qu'on dissout dans 300 ml d'eau distillée glacée.

A cette solution maintenue dans un bain de glace, on ajoute goutte à goutte un mélange froid de chlorure d'acryloyle (125 ml ; 1,508 moles) et de toluène sec (350 ml).

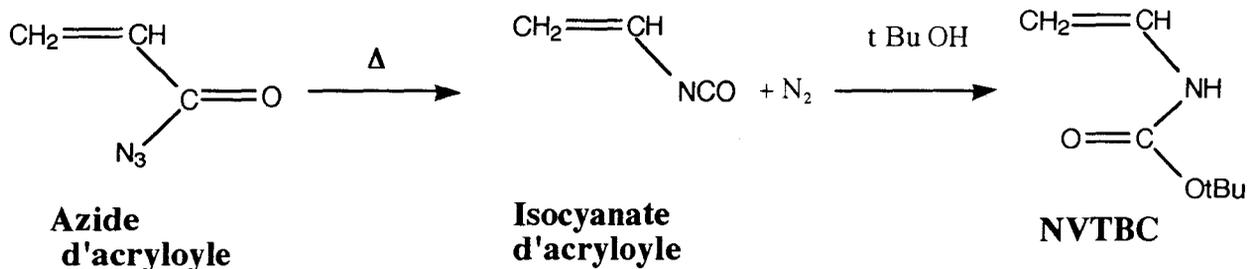
L'addition terminée, l'agitation est poursuivie pendant une heure puis la solution est laissée au repos pendant trois heures à une température comprise entre 0 et 5°C.

Après décantation, la phase organique est récupérée, lavée deux fois avec 250 ml d'une solution froide de Na₂CO₃ à 10 %, puis avec de l'eau froide jusqu'à pH neutre.

La solution toluénique est ensuite séchée sur du chlorure de calcium et stockée à une température inférieure à 5°C.

1.2 Conversion de l'azide d'acryloyle en NVTBC

Le traitement thermique de l'azide d'acryloyle dans un solvant inerte lui fait perdre une molécule d'azote et le transforme en isocyanate d'acryloyle. Cette réaction connue sous le nom de transposition de CURTIUS passe par la migration du groupe vinyle.



* Protocole expérimental

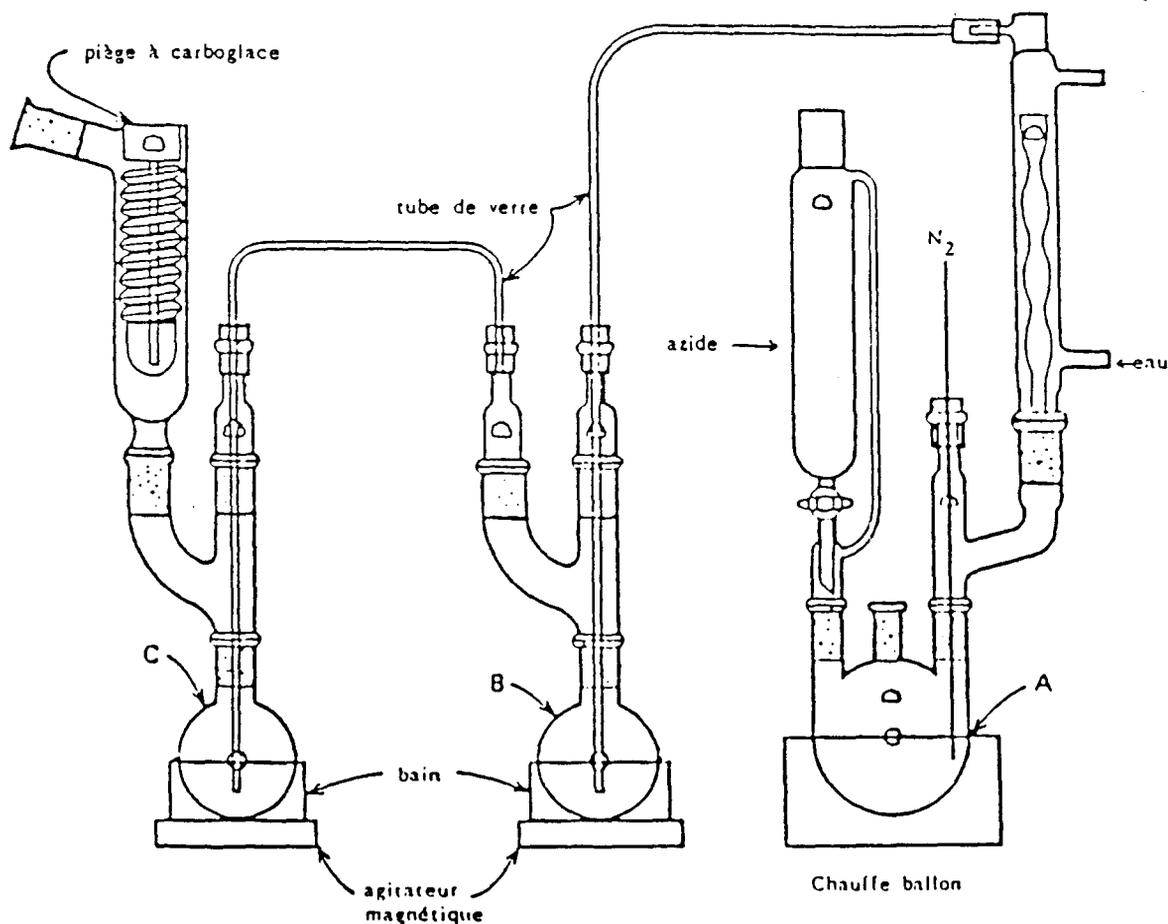


Figure 2.1 : Montage expérimental pour la conversion de l'azide d'acryloyle en NVTBC. Référence 10

Toutes les pièces de verrerie de ce montage doivent être parfaitement sèches (séjour en étuve à 160°C).

Lorsque le montage est réalisé, il est mis sous courant d'azote sec avant et après introduction des réactifs ci-après :

Ballon A : 25 ml de toluène sec + 3,5 g de méta-dinitrobenzène

Ballon B : 250 ml de t-butanol + 3,5 ml de pyridine

Ballon C : 125 ml de t-butanol + 2,5 ml de pyridine

La solution froide d'azide d'acryloyle est ajoutée goutte à goutte dans le ballon A en chauffant légèrement ce dernier. Lorsque le débit d'azote produit par la décomposition de l'azide est suffisant, on arrête le chauffage et l'envoi du courant d'azote. La réaction s'entretiendra d'elle-même puisqu'elle est exothermique, de plus elle dégage de l'azote.

La réaction terminée, l'agitation dans les ballons B et C est maintenue pendant deux heures. On laisse reposer ensuite toute une nuit à température ambiante.

La solution alcoolique est ajoutée goutte à goutte à un mélange de 1 kg de glace pilée et 2,5 litres d'eau froide sous forte agitation. Le précipité blanc de NVTBC est filtré, lavé plusieurs fois à l'eau froide et séché sous vide à température ambiante : (87,7 g ; 0,613 moles ; 40,7 % à partir du chlorure d'acryloyle).

2 Caractérisation du NVTBC

Le point de fusion du produit brut mesuré à l'aide d'un appareil Buchi SMP-20 est de 65°C, il est tout-à-fait comparable à celui de la littérature¹⁰ : 63-65°C. La purification par sublimation a été accomplie à l'aide d'une rampe à vide munie d'un piège à glace. La pompe est branchée par intermittence pour éviter la propagation et le dépôt du NVTBC dans les tubulures de celle-ci. La température du ballon contenant le NVTBC est maintenue à 50°C grâce à un bain d'huile.

Sur les spectres de RMN ¹H et ¹³C, on retrouve tous les protons et tous les carbones avec les déplacements chimiques attendus (Figures 3.I et 4.I). Les tableaux 1.I et 2.I en résument les caractéristiques.

Le spectre de masse en impact électronique montre l'ion moléculaire M⁺ : m/e = 143, de même que les principaux fragments : m/e = 86 ((M-tbu)⁺) et m/e = 57 (tbu)⁺.

Sur le spectre infrarouge (Figure 5.I), on relève les bandes caractéristiques qui sont à : 3326 (ν N - H), 1687 (ν C = O), 1644 (ν C = C) et 1365, 1394 cm⁻¹ (doublet caractéristique du groupement t-butyle).

L'analyse élémentaire a donné des résultats tout-à-fait comparables aux valeurs théoriques :

Elément dosé	C	H	N
Calc. %	58,72	9,15	9,78
Trouv. %	57,99	9,00	9,50

Tableau 1.1 : Analyse élémentaire du NVTBC

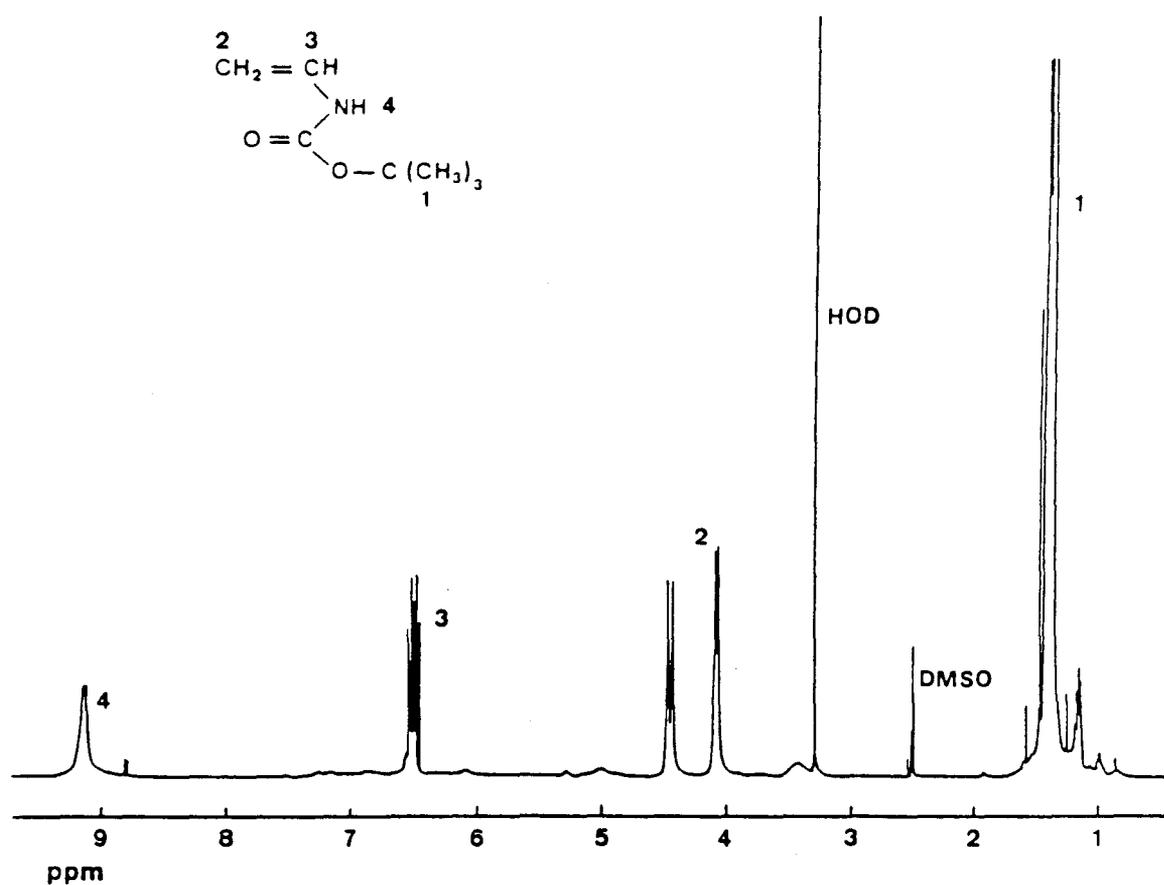


Figure 3.1 : Spectre de RMN ¹H (400 MHz, DMSO d₆) du NVTBC

Protons	1	2	3	4
δ (ppm)	1,37	4,46	6,51	9,15
Intensité	9	2	1	1
Nature	s	dd J1 = 15,85 Hz J2 = 8,7 Hz	m	large

Tableau 2.1 : Déplacement chimique en RMN ¹H (400 MHz, DMSO d₆) du NVTBC

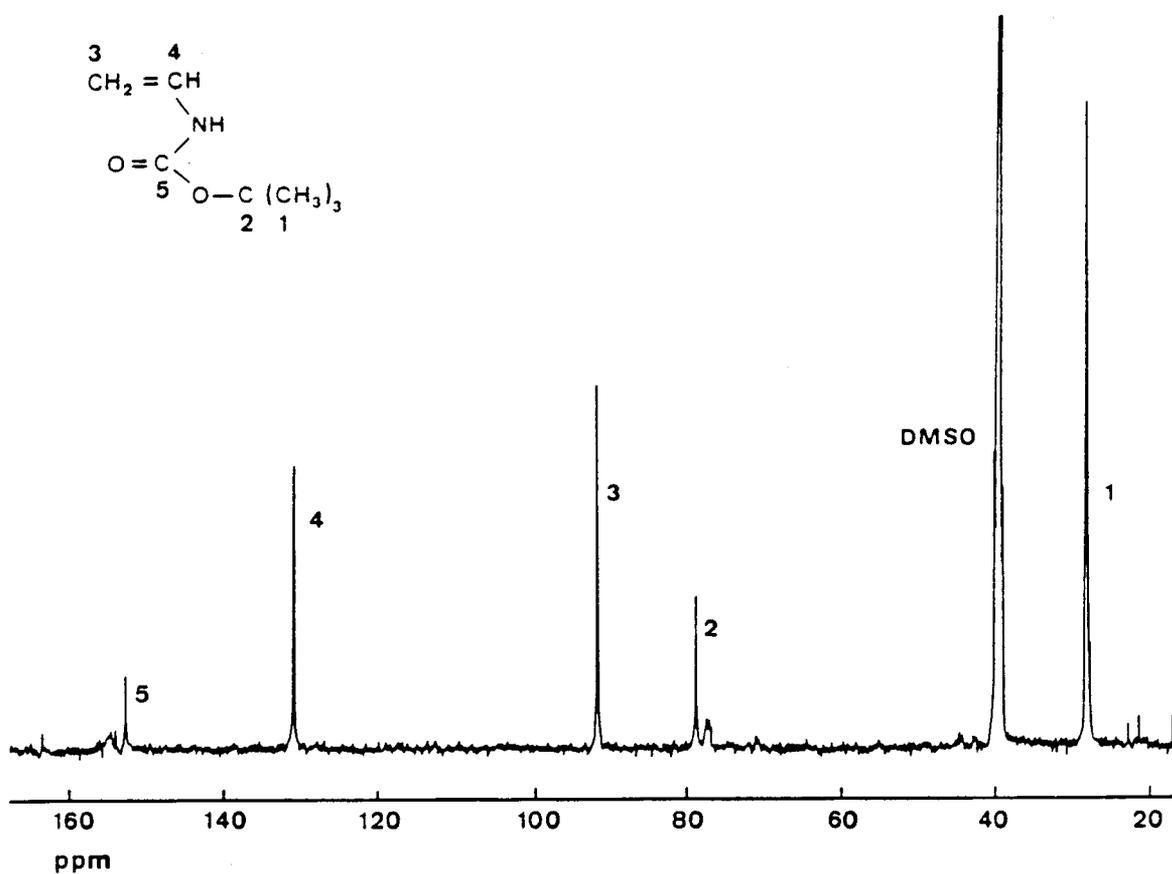


Figure 4.1 : Spectre de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO d_6) du NVTBC

Carbones	1	2	3	4	5
δ (ppm)	27,95	78,91	91,91	130,75	152,78

Tableau 3.1 : Déplacements chimiques en RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO d_6) du NVTBC

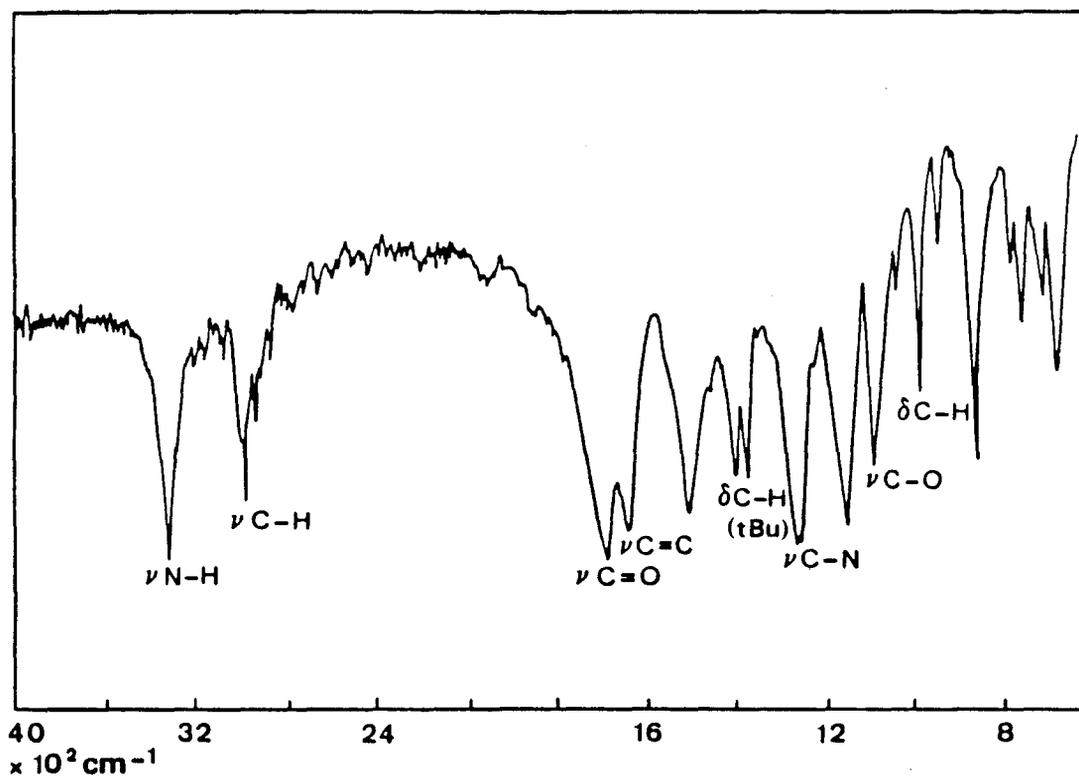


Figure 5.1 : Spectre IR (disque de KBr) du NVTBC

3 Conclusion

La synthèse du NVTBC a été réalisée et sa structure a été confirmée par les méthodes physico-chimiques précitées. Il peut donc, à présent, être utilisé comme monomère précurseur de la vinylamine dans la préparation des polymères supports.

B/POLYMERISATION ET COPOLYMERISATION - OBTENTION DE LA PVAm

Le NVTBC synthétisé précédemment, dans la préparation des polymères supports recherchés peut être utilisé de deux manières selon le type de support désiré.

L'homopolymérisation du NVTBC suivie d'une solvololyse donne la PVAm, polymère hydrosoluble, qui sera à la base de la préparation des polymères catalyseurs supports de cyclodextrine (Chapitre II) ou qui sera modifiée par benzylation, pour être également appliquée en catalyse.

La copolymérisation du NVTBC avec le styrène, en présence du divinylbenzène (DVB) et du diméthacrylate d'éthylène glycole (DMG) comme agents réticulants, conduit aux polymères supports insolubles dits macroporeux (Annexe 1).

I POLYMERE HYDROSOLUBLE = PVAm

Comme nous l'avions précisé au début de ce chapitre, nous avons utilisé la méthode de HART⁸ adaptée par HUGUES et ST PIERRE¹⁰ pour préparer une PVAm de grande pureté. Cette méthode se résume en trois étapes :

- * Etape 1 : polymérisation radicalaire du NVTBC, obtention du PNVTBC
- * Etape 2 : hydrolyse acide du PNVTBC, obtention du chlorhydrate de PVAm
- * Etape 3 : neutralisation du chlorhydrate de PVAm, obtention de PVAm base

1 Synthèse du PNVTBC

La polymérisation du NVTBC se fait dans de l'hexane en présence de l'AIBN comme initiateur. La réaction est très sensible à l'oxygène d'où la nécessité de travailler dans des conditions exemptes d'oxygène. Un dégazage préalable de la solution et son maintien sous atmosphère d'azote est donc nécessaire.

1.1 Mode opératoire :

Dans un ballon, on introduit du NVTBC (20 g : 0,140 moles), qu'on dissout dans 100 ml d'hexane puis on ajoute de l'azo-bis-isobutyronitrile AIBN (103 mg ; 0,5 % en poids par rapport au NVTBC). La solution est ensuite dégazée sous ultrasons et sous vide puis portée à la température de 60°C, sous courant d'azote pendant 30 heures.

Le produit obtenu (gelée) est dissout dans de l'acétone (100 à 120 ml) puis précipité dans de l'hexane (2 x 1,5 litres). Le PNVTCB précipite sous forme de fibres qui sont filtrées, lavées à l'hexane puis séchées sous vide (19 g ; 0,133 moles ; 95 %).

1.2 Caractérisation du PNVTCB :

La caractérisation du PNVTCB par RMN ^1H (400 MHz, Acétone d_6) montre un blindage des protons du CH et du CH_2 , ce qui confirme la saturation de la double liaison. Les déplacements chimiques obtenus sont regroupés dans le Tableau 4.I :

Protons	CH_3	CH_2	CH	NH
δ (ppm)	1,44	1,64	3,68	5,75
δ (ppm) (a)	1,46	1,60	3,70	5,80
Intensité	9	2	1	1
Nature	S	large	large	large

Tableau 4.I : RMN ^1H (400 MHz, Acétone d_6) du PNVTCB. (a) : Référence 10

La RMN ^{13}C (400 MHz, Acétone d_6) montre également un blindage affectant principalement CH et CH_2 . Le Tableau 5.I résume les déplacements qui sont comparés à ceux observés pour le NVTBC.

Carbones	CH_3	CH_2	CH	O-C-	C=O
δ (ppm) PNVTBC	30,20	42,08	46,69	78,99	156,71
δ (ppm) NVTBC	27,95	91,91	130,75	78,91	152,78

Tableau 5.I : Comparaison des déplacements chimiques en RMN ^{13}C 400 MHz du PNVTCB dans l'acétone d_6 et du NVTBC dans DMSO d_6

Sur le spectre infrarouge (KBr), on note la disparition de la bande correspondant à la vibration de valence ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$) à 1644 cm^{-1} . Les autres bandes observées sont similaires à celles qui caractérisent le NVTBC.

L'analyse élémentaire a donné des résultats quasi-identiques aux valeurs calculées :

Élément dosé	C	H	N
Calc. %	58,72	9,15	9,78
Trouv. %	58,85	9,27	9,78

Tableau 6.1 : Analyse élémentaire du PNVTBC

Le chromatogramme obtenu en chromatographie de perméation de gel (GPC), réalisé selon les conditions de la littérature¹¹ montre une dispersité de 3,66 du PNVTBC synthétisé (Figure 6.1), ce qui est assez faible pour une polymérisation radicalaire.

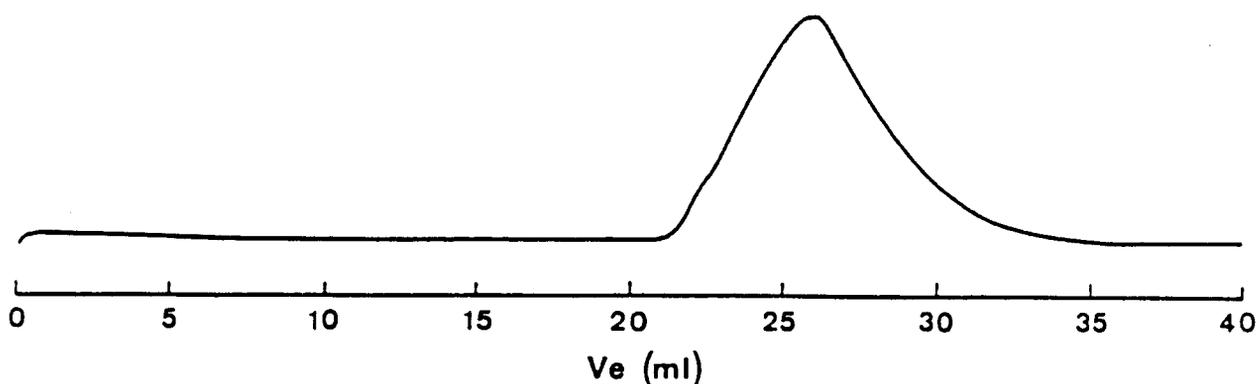


Figure 6.1 : Chromatogramme GPC du PNVTBC . Elution THF 1 ml/mn ; Colonnes ultrastyrigel : 10^5 , 10^4 , 10^3 , $0,5 \cdot 10^3$ Angstroms

La calibration au polystyrène, polymère de nature différente du PNVTBC étudié ne permet pas d'apprécier la masse moléculaire moyenne en nombre \overline{M}_n . Nous procéderons à la mesure de \overline{M}_n par viscosimétrie capillaire par la suite.

2 Solvolyse du PNVTBC : Obtention de PVAm, HCl

Nous avons utilisé les conditions de la littérature⁴ pour hydrolyser le t-butylcarbamate. Ces conditions utilisent l'acide chlorhydrique concentré à 50 % dans l'éthanol. L'éthanol ayant deux rôles, solubilisant du PNVTBC de départ et précipitant de la PVAm,HCl obtenue. La récupération de la PVAm,HCl se fait donc à la fin de la réaction par simple filtration.

La réaction est totale et ne présente pratiquement pas de réactions secondaires. C'est pour cette raison que le PNVTBC a été choisi comme polymère précurseur de la PVAm au détriment des autres polymères précurseurs¹⁻⁷.

2.1 Protocole expérimental

Dans un ballon tricol équipé d'un agitateur à pales et de deux ampoules à coulée, on introduit 200 ml d'un mélange (50:50) d'acide chlorhydrique concentré et d'éthanol (95 %).

Dans les deux ampoules, on place respectivement 100 ml d'acide chlorhydrique concentré et 100 ml d'une solution éthanolique de PNVTBC (9 g ; 63.10^{-3} moles).

Le contenu des deux ampoules est additionné simultanément (goutte à goutte) dans le ballon. L'addition terminée, l'agitation est maintenue pendant une nuit à température ambiante.

Le produit blanc obtenu est filtré, lavé abondamment à l'acétone et séché à 60°C sous vide (4,87 g ; $61,3.10^{-3}$ moles ; 97 %).

2.2 Caractérisation de la PVAm,HCl

Sur le spectre de RMN ^{13}C (400 MHz, D₂O), on trouve 2 pics à 38,35 ppm (C H -CH₂) et 45,97 ppm (CH -CH₂). Il y a disparition des pics du carbonyle à 156,71 ppm et des carbones du tertibutyle à 30,2 et 78,99 ppm. Ceci témoigne donc d'une hydrolyse totale du PNVTBC.

Le spectre de RMN ^1H (400 MHz, D₂O) montre 2 massifs (Figure 7.I). Les déplacements chimiques sont tout-à-fait comparables à ceux de la littérature¹⁰ (Tableau 7.I).

Protons	CH ₂	CH
δ (ppm)	2,37	3,95
δ (ppm) (a)	2,35	3,90
Nature et intensité	massif, 2	massif, 1

Tableau 7.I : RMN ^1H (400 MHz, D₂O) de PVAm, HCl. (a) : Référence 10.

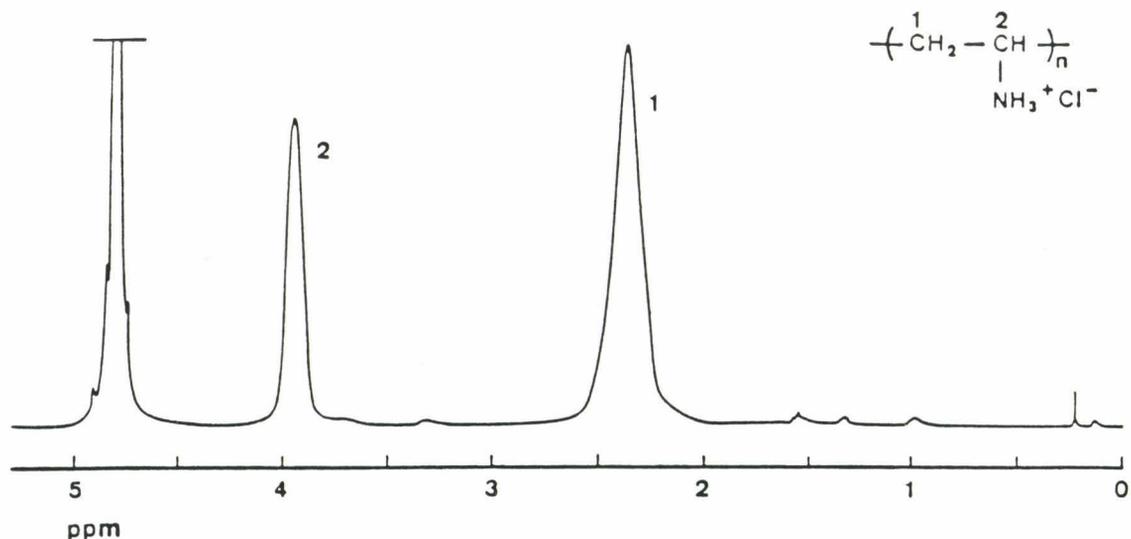


Figure 7.1 : Spectre de RMN ^1H (400 MHz, D_2O) de PVAm, HCl

Le spectre infrarouge (disque de KBr) révèle les principales bandes qui sont similaires à celles données par la littérature¹⁰. Les plus caractéristiques sont à : 3420 (N - H), 2925 (amine de HCl), 1601 (N - H) et 1506 cm^{-1} (N - H_3^+).

L'analyse élémentaire a donné des résultats conformes aux valeurs calculées (Tableau 8.1)

Element dosé	C	H	N	Cl
Calc. %	30,20	7,60	17,61	44,58
Trouv. %	30,80	7,40	17,19	43,49

Tableau 8.1 : Analyse élémentaire de la PVAm,HCl

2.3 Conclusion

Le chlorhydrate de PVAm obtenu par solvolysse du PNVTCB selon les conditions décrites dans la littérature¹⁰ a été caractérisé par RMN, infrarouge et analyse élémentaire. Les résultats montrent que le produit synthétisé est quasiment pur, il peut donc être utilisé pour les applications envisagées.

3 Déchlorhydratation de la PVAm, HCl

La déchlorhydratation de la PVAm peut être réalisée de deux manières : la première rapportée par la littérature¹¹ consiste en un passage d'une solution aqueuse de PVAm, HCl à 3 % sur une résine échangeuse d'anions (Amberlite IRA

401). L'autre méthode revient à une neutralisation directe par une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium. Nous avons donc choisi cette deuxième méthode car elle permet le traitement de quantités importantes de produit, bien que la première soit plus élégante.

3.1 Mode opératoire :

A une solution de potasse aqueuse (6 g dans 250 ml), on ajoute par petites fractions de la PVAm,HCl (7 g ; 88.10^{-3} moles). L'addition terminée, l'agitation est maintenue pendant 24 heures à température ambiante. La solution est ensuite dialysée (membrane 6-8000) contre de l'eau distillée pendant 2 à 3 jours en changeant l'eau chaque jour.

La solution dialysée est congelée puis lyophilisée pendant 48 heures. La polyvinylamine est ainsi obtenue sous forme d'une gomme collante très hygroscopique (3,33 g ; $77,5.10^{-3}$ moles ; 88 %).

3.2 Caractérisation de la PVAm

3.2.1 Caractérisation IR

Le spectre infrarouge (disque de KBr) révèle les bandes caractéristiques de la PVAm. On note en particulier à 3400 (N - H), 2920 (C - H), 1600 (N - H)). L'analyse élémentaire a donné les résultats figurant dans le Tableau 9.I :

3.2.2 Analyse élémentaire

Elément dosé	C	H	N	Cl
Calc. %	55,77	11,70	32,52	0
Trouv. %	55,51	11,10	30,53	3,59

Tableau 9.I : Analyse élémentaire de la PVAm.

3.2.3 RMN

Le spectre de RMN ^1H (400 MHz, D_2O) montre 2 massifs (Figure. 8.I) à 1,49 (2 H, $\text{CH}_2 - \text{CH}$) et 3,09 ppm (1 H, $\text{CH}_2 - \text{CH}$). Nous remarquons un blindage d'environ 0,88 ppm pour les 2 groupes de protons par rapport aux déplacements observés pour la PVAm,HCl (Figure 7.I, Tableau 7.I).

Sur le spectre de RMN ^{13}C (400 MHz, D_2O), on relève la présence de plusieurs pics entre 44 et 48 ppm (Figure. 9.I(a)). Une étude en RMN ^{13}C dans D_2O montrant l'influence du pH sur la configuration de la PVAm a été rapportée dans la littérature⁶, (Figure 9.I(b)).

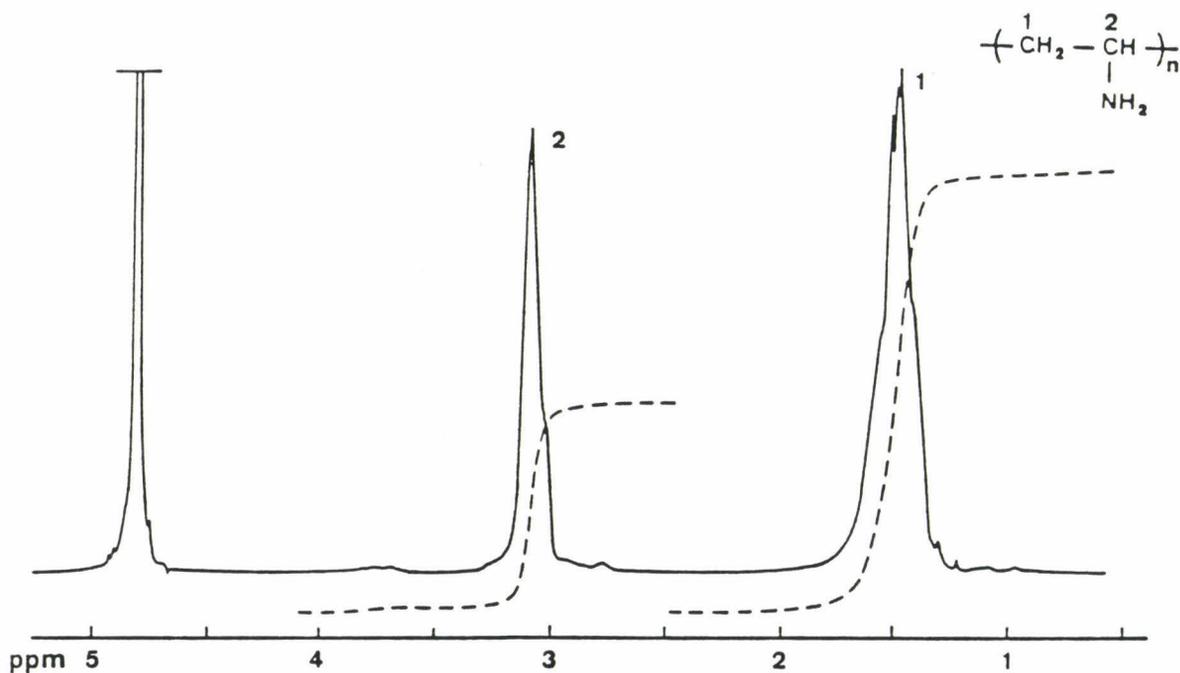


Figure 8.I : Spectre de RMN ^1H (400 MHz, D_2O) de la PVAm.

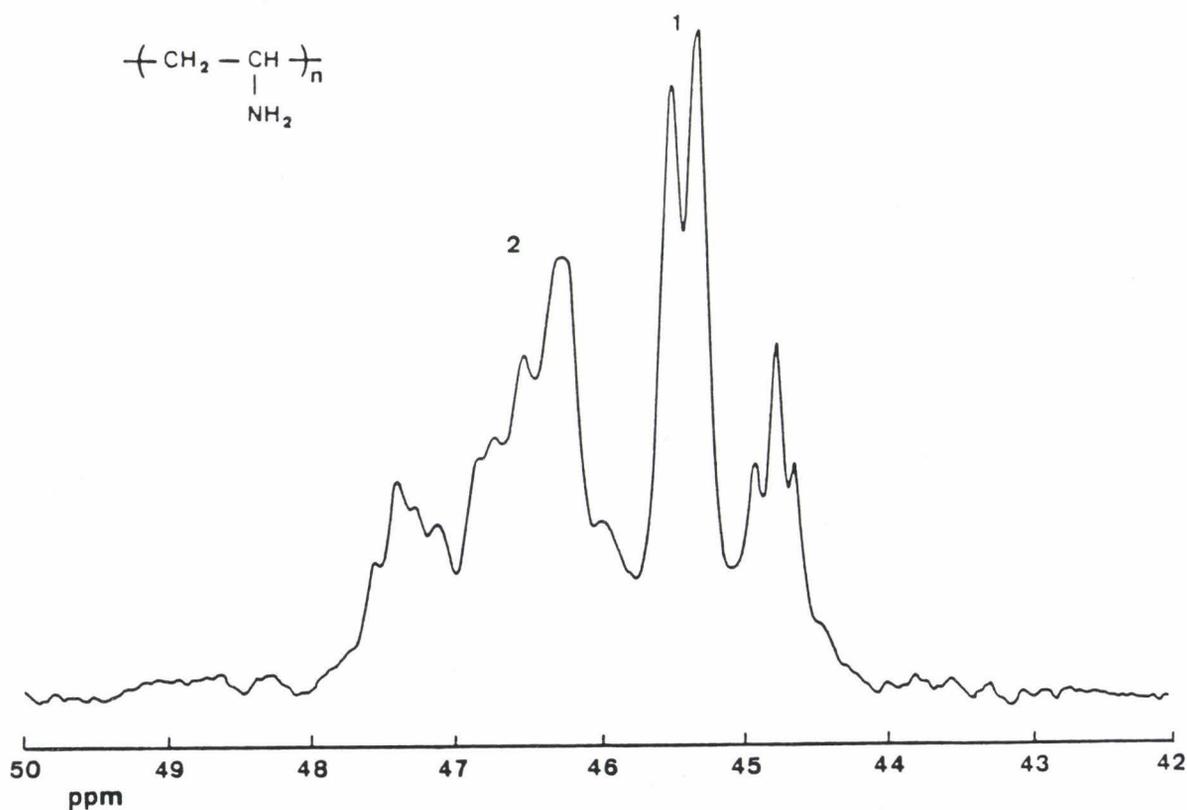


Figure 9.I(a) : Spectre de RMN ^{13}C (400 MHz, D_2O) de la PVAm.

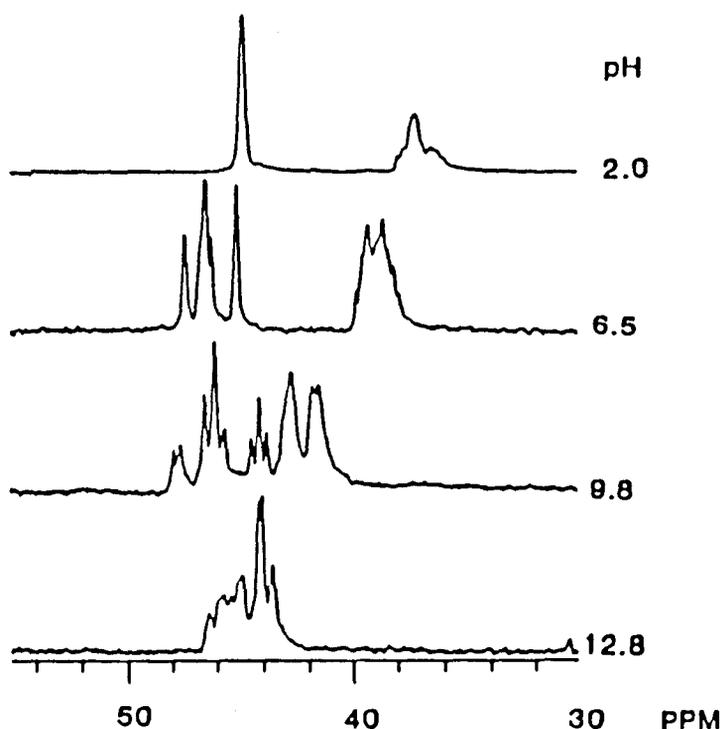


Figure 9.I(b) : Spectres de RMN ^{13}C dans D_2O aux pH indiqués. Référence: 12 .

La présence du chlore montre que la neutralisation n'est pas totale. La pureté en PVAm base dépasse 95 %, elle peut donc être utilisée sans que cela entrave les réactions envisagées.

Nous avons effectué une étude viscosimétrique de la PVAm à $0,01 \text{ g/cm}^3$ dans l'eau en présence de NaCl 0,1 M et de NaOH 0,01 N. La viscosité intrinsèque $[\eta]$ est égale à 67,4 ml/g.

L'équation de MARK-HOUWINK $[\eta] = K M^\alpha$ permet d'accéder à la masse moléculaire moyenne en nombre, avec $K = 6,2 \cdot 10^{-3}$ et $\alpha = 0,88$ pour l'eau³, on trouve : $M_n \# 38600 \text{ g.mole}^{-1}$

3.2.4 Potentiométrie

Nous avons effectué un dosage potentiométrique de la PVAm,HCl (0,02M) en présence de KCl (1M) par de la soude (0,098M), la courbe de titration est représentée sur la Figure 10.I.

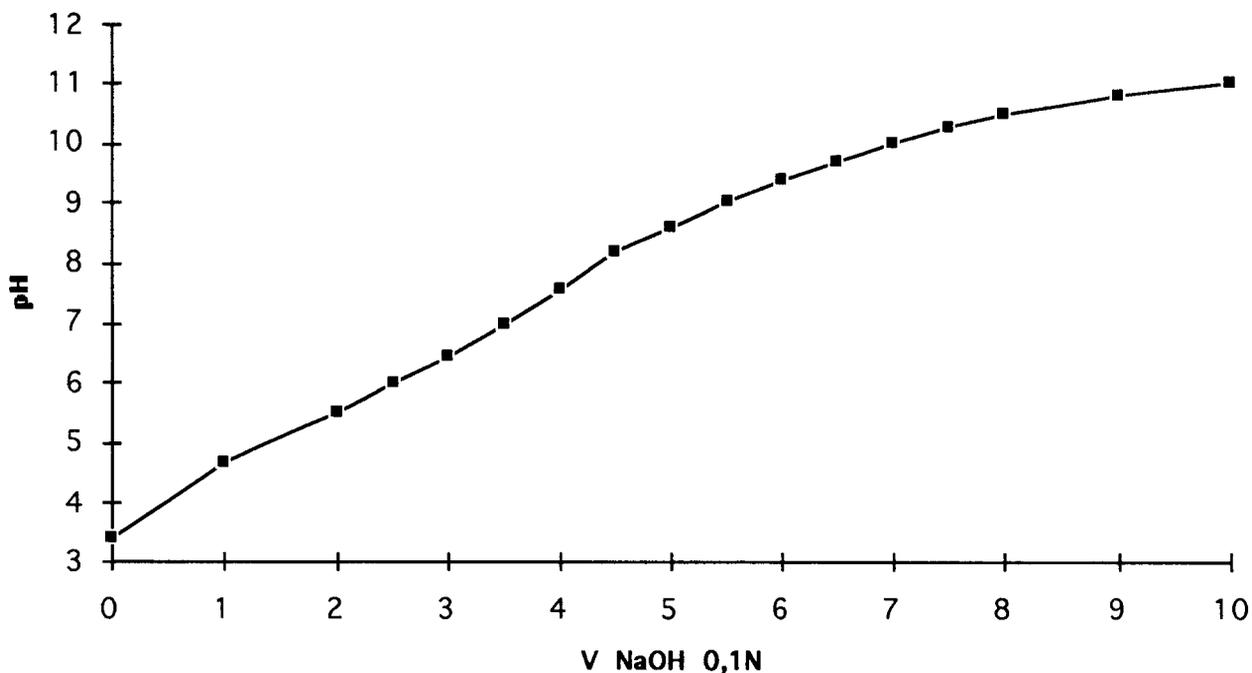


Figure 10.I : Courbe de neutralisation de la PVAm, HCl 0,02M, 50ml de KCl 1M à 25°C par NaOH 0,098N.

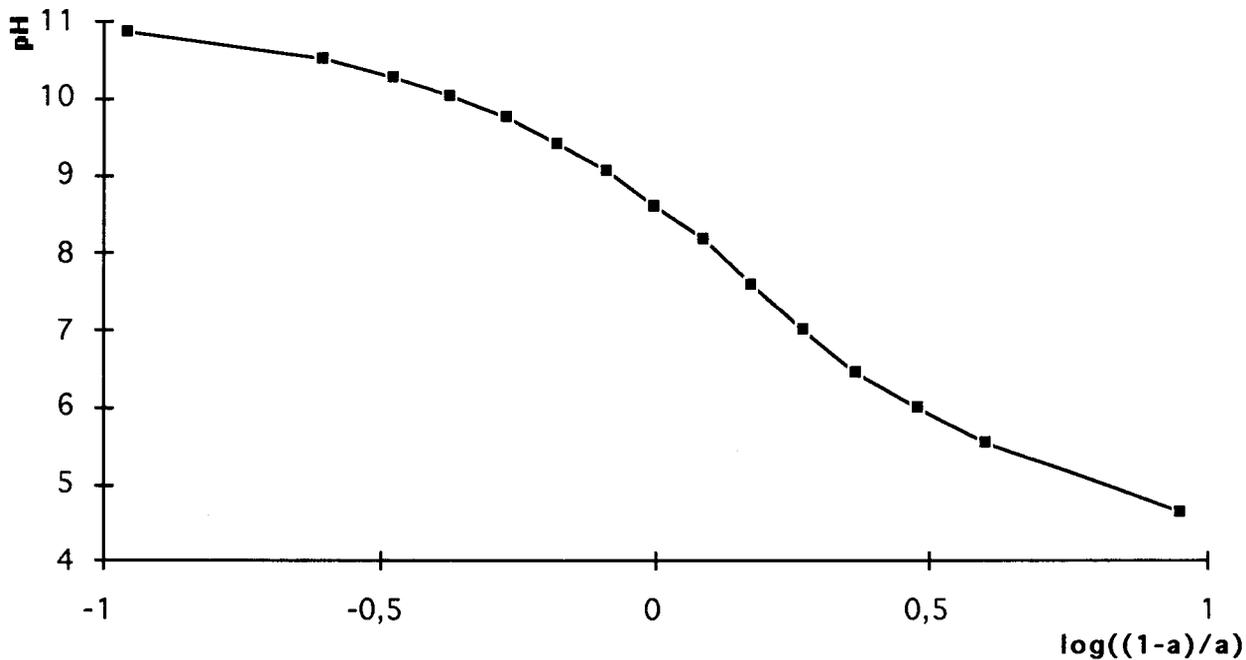


Figure 11.I : Courbe de HENDERSON-HASSELBALCH relative à la neutralisation de la PVAm,HCl.

On peut tracer la courbe de HENDERSON-HASSELBALCH (Figure 11.I) à partir de cette dernière courbe dont l'expression suit la loi suivante :

$$\text{pH} = \text{pKa} - m \log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) \quad (1)$$

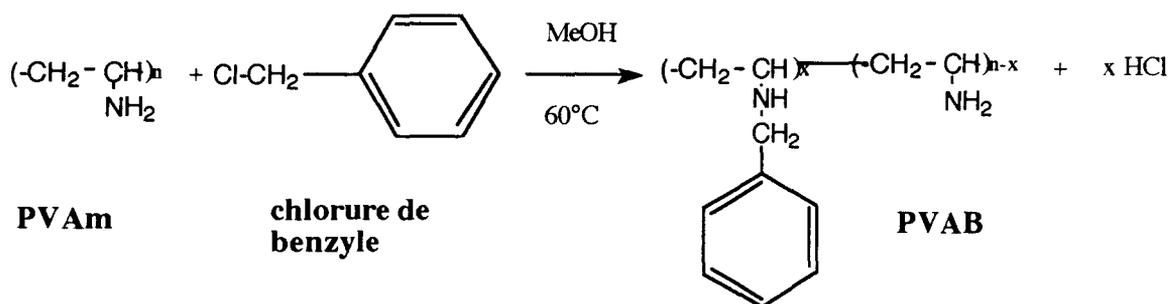
α est le degré de neutralisation, K_a est la constante de dissociation moyenne et m est une constante. La valeur de m peut être obtenue à partir de la pente de la courbe pour une valeur de α comprise entre 0,2 et 0,6.

Le pK_a que nous obtenons pour notre PVAm à partir de la Figure 11.I est de 8,62, il est proche de ceux mesurés par KOBAYASHI et al.¹³ qui pour des PVAm de masse moléculaire moyenne en nombre de 10000 et 800000 ont mesuré des pK_a de respectivement 8,49 et 8,59.

II SYNTHÈSE DE LA PVAm BENZYLEE

La benzylation de la polyéthylèneimine (PEI) a été mise au point par SAEGUSA et al.¹⁴ et reprise par SMETS et EVERAERTS¹⁵ et PSHEZHESKII et al.¹⁶ ; cette méthode a été adaptée pour la benzylation de la polyallylamine (PAA) par SEO et al.¹⁷.

1 Mode opératoire



Nous avons repris la méthode de benzylation de la PAA suivie par SEO :

- 0,5g de PVAm ($1,16 \cdot 10^{-2}$ eq) sont dissouts dans 23 ml de méthanol
- on ajoute la quantité désirée de chlorure de benzyle (PROLABO)
- le mélange est chauffé à reflux à 60°C
- le polymère est récupéré par précipitation dans l'éther puis lavé avec un mélange éther-hexane
- on récupère les polymères de la série PVAB par lyophilisation.

2 Caractérisation

2.1 Mesure du degré de substitution

Afin de disposer de plusieurs copolymères de degré de substitution différents (DS), nous avons successivement fait varier la durée de réaction puis le rapport des

réactifs. La détermination de la quantité de groupements benzyles a été obtenue par le calcul du rapport C/N mesuré par analyse élémentaire (Tableau 10.I)

Référence	(PVA _m) mol/l	(Φ CH ₂ -Cl) mol/l	durée réaction (h)	DS
PVAB22	0,5	0,3	2	0,22
PVAB34	0,5	0,3	8	0,34
PVAB46	0,5	0,3	70	0,46
PVAB52	0,46	0,5	72	0,52

Tableau 10.I : Conditions de réaction et degré de substitution (DS) des polymères de la série PVAB

Nous pouvons observer que le DS, malgré un temps de réaction prolongé et un rapport des réactifs proche de 1, dépasse à peine 50%. Ce résultat confirme la théorie, puisque le greffage d'un groupement benzylique libère une molécule de HCl qui est immédiatement neutralisée par une fonction vinylamine qui ne pourra plus réagir avec une autre molécule de chlorure de benzyle. Le taux de greffage maximal théorique est donc de 50%. Pour améliorer celui-ci, il suffirait d'ajouter dans le milieu une base plus forte que la vinylamine qui préserverait la réactivité de celle-ci.

2.2 RMN

Les groupements benzyliques apparaissent sur le spectre RMN ¹H (Figure 12.I) du copolymère PVAB46 sous sa forme chlorhydratée. Les protons aromatiques correspondent au pic (large) à 7,6 ppm tandis que les protons du groupement méthylène ont un déplacement chimique de 4,1 ppm.

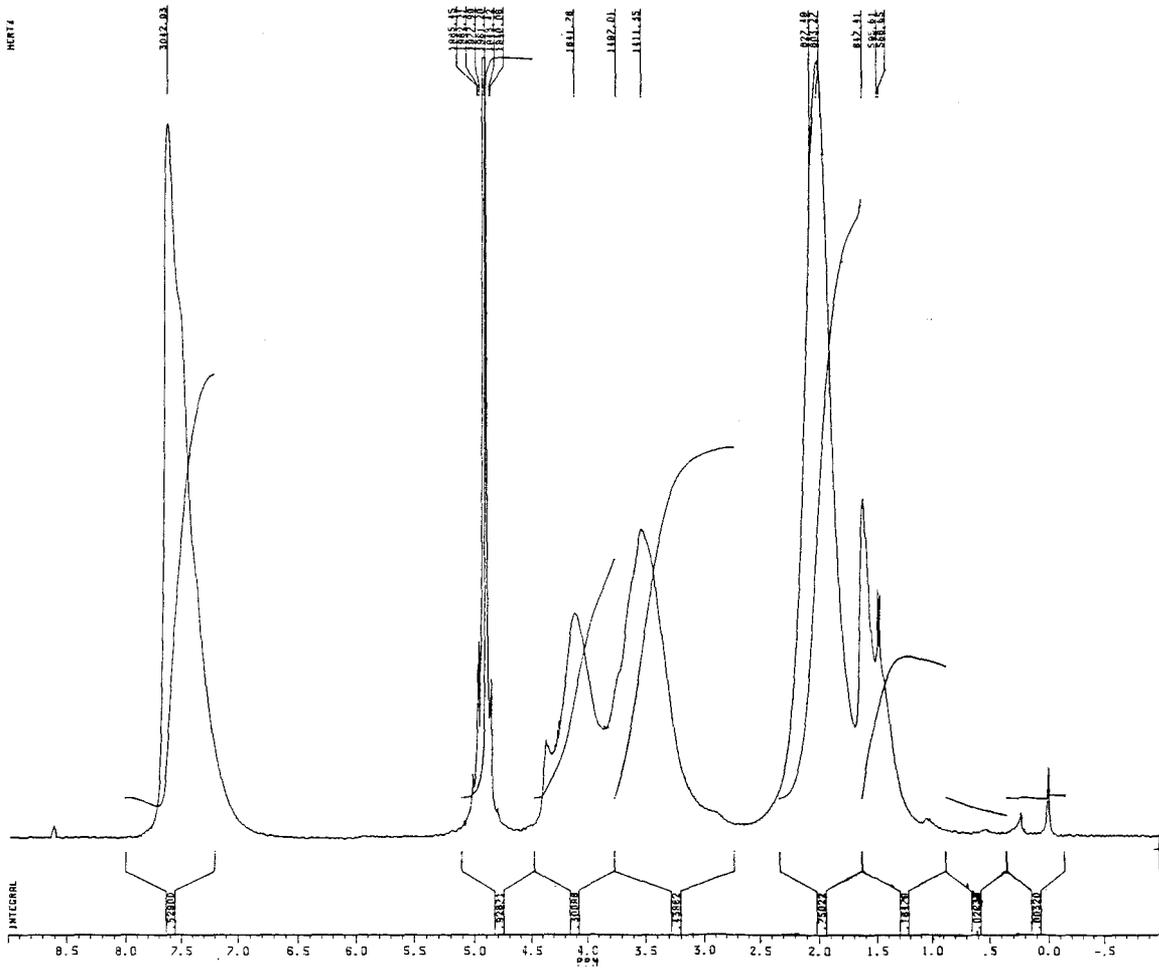


Figure 12.I : Spectre de RMN ^1H (400 MHz, D_2O) de PVAB46 (chlorhydraté).

2.3 Viscosimétrie

Etudions maintenant l'incidence du greffage des groupements benzyles sur la PVAm en ce qui concerne la conformation des chaînes en solution. Les résultats rapportés par la Figure 13.I expriment la viscosité réduite η_{sp}/C en fonction du DS.

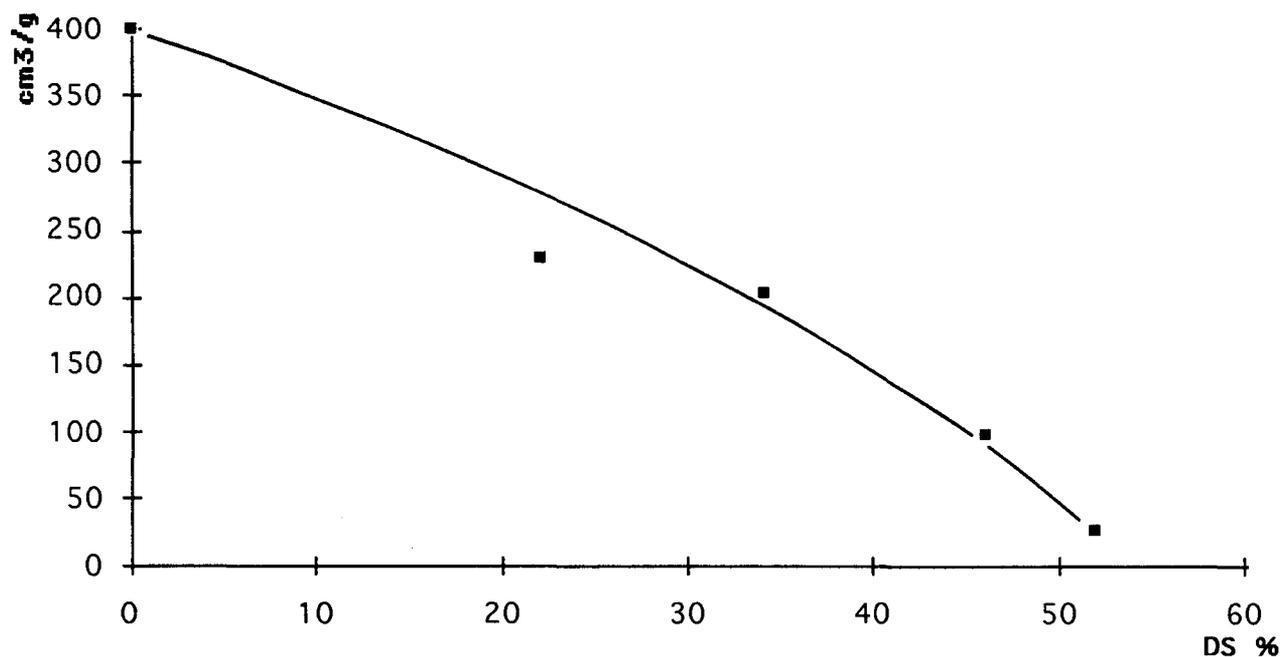


Figure 13.1 : Evolution de la viscosité réduite (η_{sp}/C) en fonction du DS. pH = 8,05 ; Tampon Tris 0,05M

L'introduction de groupements benzyliques sur le polymère induit un repliement des chaînes qui est mis en évidence sur la Figure 13.1 ci-dessus. Ceci provient des interactions hydrophobes qui s'intensifient avec le nombre de groupements benzyliques qui se rapprochent pour former un domaine hydrophobe de plus en plus compact. Le polymère n'atteint une conformation globulaire qu'à partir d'un taux d'environ 50% de motifs benzyliques. La polyallylamine subit elle aussi une forte chute de viscosité pour un DS qui est du même ordre¹⁸. Nous remarquons que la PEI benzylée¹⁶ ne possède pas les mêmes caractéristiques puisque sa viscosité chute brutalement et qu'elle acquiert une conformation globulaire dès 10% de groupements benzyliques.

La viscosité de l'échantillon PVAB52, tout comme celle de la PVAm diminue avec le pH croissant. Au delà de pH = 9, le polymère a une conformation compacte et précipite vers pH = 9,5. La chute de viscosité dans le domaine étudié peut s'expliquer par la diminution progressive des forces de répulsions électrostatiques qui accompagne la neutralisation des fonctions amines du polymère laissant les forces de Van Der Waals imposer la conformation compacte à la chaîne polymère.

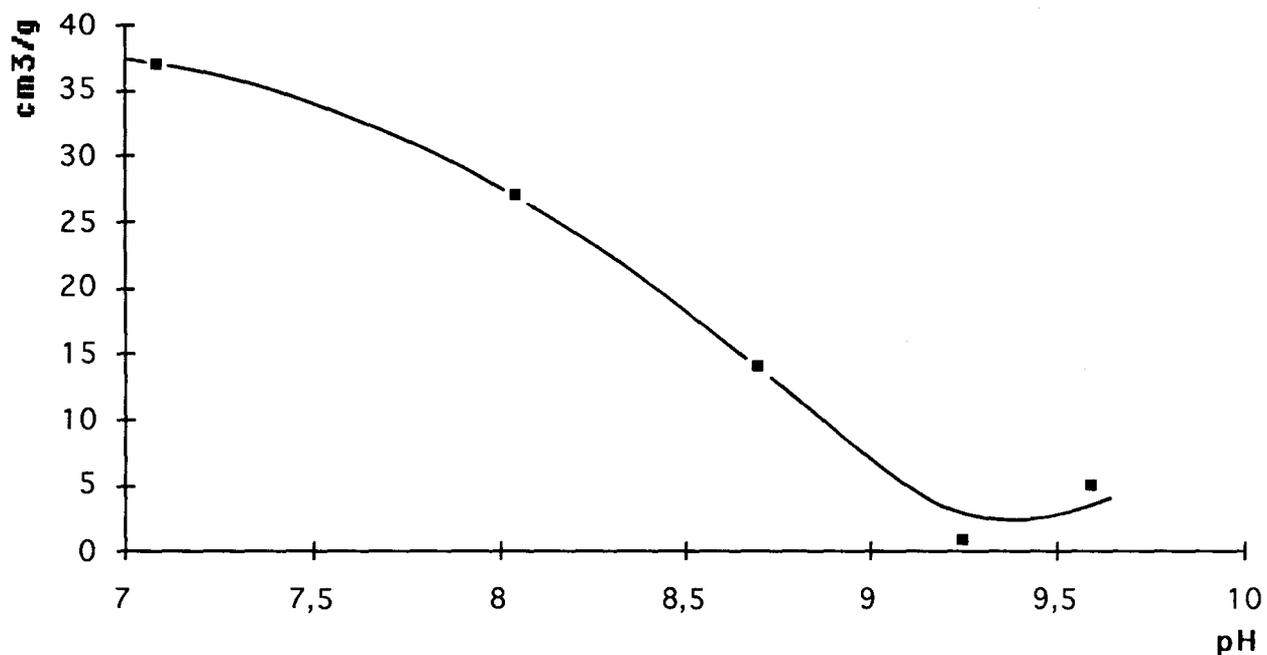


Figure 14.1 : Variation de la viscosité réduite (η_{sp}/C) de PVAB52 en fonction du pH. Tampon Tris à pH 7,1 ; 8,05 et 8,7. Tampon borax à pH 9,25 et 9,6.

2.4 Potentiométrie

Le dosage potentiométrique de PVAB46 (préalablement déchlorhydratée sur résine IRA 402) ainsi que celui de la PVAm ont été accomplis en présence de NaClO_4 ($9 \cdot 10^{-2}\text{M}$) à 25°C sous azote. La transformation de *Henderson-Hasselbach* nous a permis de mesurer les pKa à la demi équivalence qui sont respectivement de 6,78 et 6,32. La présence de groupements benzyles augmente légèrement la basicité des fonctions amines.

III SYNTHÈSE DE COPOLYMERES MACROPOREUX A BASE DE VINYLAMINE

Voir Annexe 1

C/ CONCLUSION DU CHAPITRE I

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la préparation du NVTBC, monomère précurseur de la vinylamine. Son homopolymérisation suivie d'une solvolysé nous a permis d'obtenir une polyvinylamine d'une grande pureté qu'aucune autre méthode ne peut égaler.

L'autre intérêt de passer par le NVTBC est la possibilité de préparer des copolymères très variés. Ces avantages offerts par le NVTBC peuvent toutefois être contrebalancés par le rendement relativement faible de la réaction et un coût de fabrication assez élevé par rapport aux autres méthodes de synthèse présentées au début de ce chapitre.

La PVAm obtenue sera ensuite modifiée par greffage de la β -cyclodextrine (chapitre II) et donnera des copolymères destinés aux études catalytiques (Chapitre IV) ; la PVAm benzylée sera elle aussi utilisée en catalyse (Chapitre V) ce qui nous permettra de mettre en évidence de nouvelles propriétés dues à son caractère hydrophobe.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE I

- 1 H. TANAKA
a) J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed. (1978), 16 ,87
b) J. Polym. Sci. Polym.Chem. Ed. (1979), 17 ,1239
- 2 A. EL ACHARI
Thèse de doctorat, Université de Lille I (1991), n°760
- 3 C. CHANG, D. D. MUCCIO, T. ST PIERRE
J. Polym. Sci. Polym. Symp. (1986), 74 ,17
- 4 D. D. REYNOLDS, W. O. KENYON
J. Am. Chem. Soc. (1947), 69 , 911
- 5 A. KATCHALSKY, J. MASUR, SPITNIK
J. Polym. Sci. (1957), 23 , 513
- 6 E. BAYER, K. GECKLER, K. WEINGARTNER
Makromol. Chem. (1980), 181 ,585
- 7 D. J. DAWSON, R. D. GLESS, R. E. WINGARD Jr
J. Am. Chem. Soc. (1976), 98 ,5996
- 8 R. HART
a) Bull. Soc. Chim. Belg. (1957), 66 ,229
b) J. Polym. Sci. (1958), 29 , 629
c) Makromol. Chem. (1959), 32 ,51
- 9 C. J. BLOYS VAN TRESLONG, C. F. M. MORRA
Recl Trav. Chim. Pays-Bas Belg. (1975), 94 ,101
- 10 A. R. HUGUES, T. ST PIERRE
Macromolec. Synth. (1977), 6 , 31
- 11 W. M. BROUWER, P. PIET, A.L. GERMAN
Makromol. Chem. (1984), 185 , 363
- 12 C.CHANG, D.D.MUCCIO, T.ST PIERRE, C.C.CHEN, C.G. OVERBERGER
Macromolecules, (1986), 19 , 913
- 13 S. KOBAYASHI, K. SUH, Y. SHIHOHURA
Macromolecules (1989), 22 , 2363
- 14 T. SAEGUSA, H. IKEDA, H. FUGII
Polym. J. (1972), 3 , 35
- 15 A. EVERAERTS, C. SAMYN, G. SMETS
Makromol. Chem. (1984), 185 , 1881
- 16 V. S. PSHEZHETSKII, G. A. MURTAZAEVA, V. A. KABANOV
Eur. Polym. J. (1974), 10 , 581

-
- 17 T. SEO, T. KAJIHARA, T. IIJIMA
Makromol. Chem. (1990), 191 , 1665
- 18 T. SEO, S. TAKE, K. MIWA, K. HAMADA, T. IIJIMA
Macromolecules (1991), 24 , 4255

CHAPITRE II

SYNTHESE ET CARACTERISATION DE POLYMERES CATALYSEURS HYDROSOLUBLES SUPPORTS DE CYCLODEXTRINE A BASE DE POLYVINYLAMINE

INTRODUCTION

Nous allons mettre à présent en application nos polymères supports préparés lors du précédent chapitre. Ils seront tout d'abord fonctionnalisés par la β -cyclodextrine.

La cyclodextrine fait partie des molécules dites "cages" car elle comporte au sein de sa structure une cavité lui permettant d'inclure différentes molécules, en particulier des aromatiques.

Cette propriété, comme nous le verrons dans la première partie de ce chapitre, permet de très nombreuses applications pour cette molécule qui possède aussi les qualités non négligeables d'hydrophilie et de non toxicité : multiples applications dans les industries alimentaires et pharmaceutiques, l'analyse chromatographique, la catalyse et la dépollution.

Ces deux dernières applications nous concernent tout particulièrement, car nous allons maintenant mettre au point des supports polymères porteurs de cyclodextrine applicables à la catalyse de la réaction d'hydrolyse d'esters de nitrophénol et à la dépollution des eaux.

Deux types de supports assez différents vont être préparés, utilisant les deux types de polymères synthétisés au premier chapitre : les polymères linéaires hydrosolubles, et les polymères macroporeux.

Dans ce chapitre nous nous limiterons à détailler la fonctionnalisation du polymère hydrosoluble, la synthèse des polymères macroporeux déjà publiée étant détaillée dans l'Annexe 1.

A/ LES CYCLODEXTRINES : GENERALITES

I HISTORIQUE

Les premières informations relatives à la cyclodextrine remontent à 1891, quand VILLIERS rapporte qu'il a isolé une substance cristalline d'une culture de *Bacillus Amylobacter* se développant sur un milieu contenant de l'amidon .

VILLIERS nomme ce produit cristallisé "cellulosine" en raison de légères similitudes avec la cellulose (relative stabilité envers l'hydrolyse par exemple) et observe même l'existence de deux différentes sortes de "cellulosines"¹ ; cette publication "historique" est rapportée en Annexe 3.

SCHARDINGER entre 1903 et 1911, au cours de ses études sur des micro-organismes résistant à la chaleur et responsables d'empoisonnements alimentaires, observe que la cellulosine de VILLIERS se forme fréquemment sur des milieux à base d'amidon contenant des micro-organismes putréfiants^{2,3} . Il arrive à isoler un bacille, qu'il nomme *Bacillus Macérans*, et qui reste toujours à l'heure actuelle, le moyen de production de la cyclodextrine le plus employé.

Au cours des 24 années suivantes, c'est PRINGSHEIM qui joue le premier rôle dans les recherches sur la cyclodextrine. Il publie abondamment, et bien que ses écrits contiennent quelques contradictions et erreurs, on lui doit la découverte des propriétés complexantes de la cyclodextrine.

De 1934 aux années 70, la structure de la cyclodextrine fut élucidée par FREUDENBERG, les propriétés complexantes furent étudiées, de nombreux dérivés préparés et les propriétés de modélisation des enzymes découvertes. Durant cette période, deux noms émergent plus particulièrement parmi les nombreux scientifiques concernés par ces découvertes : CRAMER et FRENCH.

La période actuelle est caractérisée par la seconde génération des cyclodextrines : la production et l'utilisation industrielle des cyclodextrines modifiées.

Les nombreux dérivés de la β -cyclodextrine notamment (alkylés, hydroxyalkylés, polymérisés ...) ouvrent de nombreux horizons et possibilités.

Le premier brevet fut déposé en 1953 par FREUDENBERG, CRAMER et PLIENINGER. Jusqu'à la fin des années 60, le rythme des brevets et publications fut assez lent, passa à une dizaine par an au début des années 70 et augmente régulièrement depuis (100 en 1979, plus de 400 en 1987...).

II OBTENTION DES CYCLODEXTRINES

Les cyclodextrines sont des oligomères cycliques du glucose issus de la dégradation enzymatique de l'amidon (plus précisément de l'amylose) par la cycloglucosyltransférase (CGTase) produite par *Bacillus Macérans*.

Les cyclodextrines sont composées d'un nombre bien défini d'unités glucopyranose reliées par des liaisons α , 1 - 4. La lettre grecque qui précède leur nom indique le nombre d'unités glucose qui composent le cycle : α pour 6, β pour 7 et γ pour 8 qui sont les trois plus connues et utilisées d'entre elles (Figure. 1.II(a)).

La dégradation de l'amidon par la CGTase mène majoritairement à ces trois dernières et à des cycles à nombre de glucoses pouvant aller jusqu'à 12, en plus petite quantité. Après traitement du mélange obtenu, les différentes cyclodextrines sont isolées.

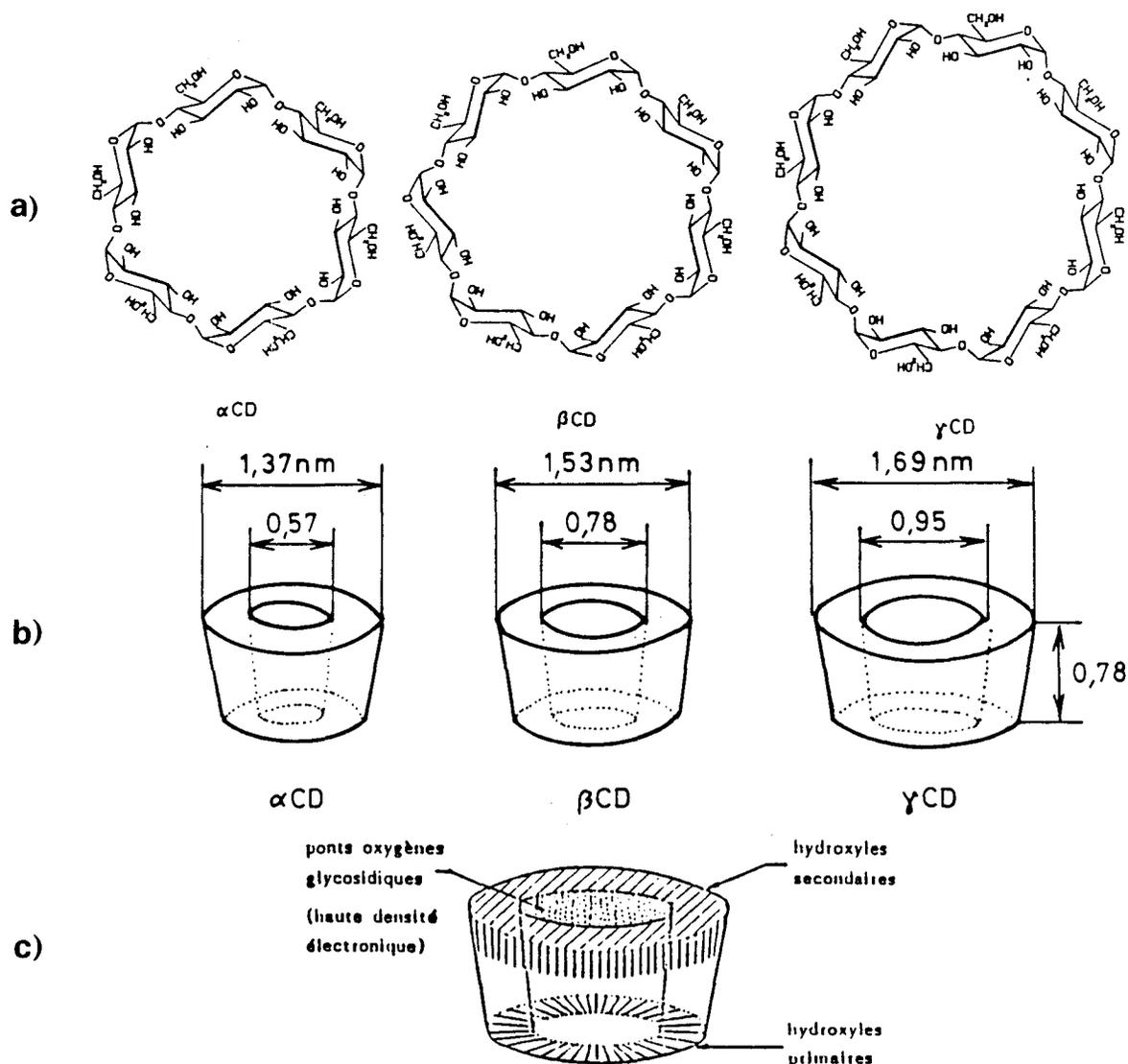


Figure 1.II : a) les trois principales cyclodextrines
b) dimensions des cyclodextrines
c) vue schématique de la cyclodextrine

III PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA β CD

1 Structure

La Figure 1.II(c) met en évidence la forme conique tronquée de la molécule de β -cyclodextrine.

La structure en perspective de la vue latérale de la β CD, permet de se rendre compte de la rigidité de la molécule, les unités glucose étant figées dans leur conformation chaise. Il permet aussi de situer la répartition des fonctions hydroxyles sur la molécule.

On peut donc représenter schématiquement la β CD sous la forme d'un godet ou d'un abat-jour dont la partie supérieure est garnie de fonctions hydroxyles secondaires et dont la base est constituée de fonctions hydroxyles primaires.

L'intérieur de la cavité, tapissé d'atomes d'hydrogène, et d'atomes d'oxygène constituant les ponts glycosidiques, est relativement apolaire comparativement à l'eau.

La Figure 1.II(b) donne les dimensions approximatives des α , β , et γ -cyclodextrines, et le Tableau 1.II leurs principales caractéristiques.

Cyclodextrine	α	β	γ
Nombre d'unités glucose	6	7	8
Masses molaires	972	1135	1297
Solubilité dans l'eau à 25°C (g/100 ml)	14,5	1,85	23,2
$(\alpha)^{25}_D$	150 \pm 0,5	162,5 \pm 0,5	177,4 \pm 0,5
Volume approximatif de la cavité (Å ³)	174	262	427

Tableau 1.II : principales caractéristiques des cyclodextrines

On remarque la faible solubilité dans l'eau de la β CD par rapport aux deux autres. Ceci peut être expliqué par l'établissement d'une ceinture de liaisons hydrogènes qui unit les hydroxyles secondaires de chaque unité glucose deux à deux. Cette ceinture secondaire de liaisons hydrogènes n'est pas, ou moins observable,

dans les α et γ -cyclodextrines, car la taille des cycles de ces deux dernières est soit trop petite (α), soit trop grande (γ), pour pouvoir observer ce phénomène⁴.

2 Les complexes d'inclusion

Les cyclodextrines sont capables d'interagir avec toute une variété d'espèces ioniques et moléculaires pour donner des composés d'inclusion type "host-guest" dont la stoechiométrie est généralement 1-1, mais aussi 2-1 pour certains substrats encombrants (voir l'étude de fluorescence Chapitre IV).

Plusieurs conditions influent sur la formation de ces complexes parmi lesquelles :

- * La complémentarité stéréoélectronique des sites de liaison de la cyclodextrine et de la molécule "invitée". Néanmoins, il n'existe pas de liaison covalente entre cyclodextrine et substrat et l'équilibre dissociation-association en solution est une des principales caractéristiques de cette association.

- * La compatibilité géométrique : le substrat doit avoir une taille compatible avec les dimensions de la cavité. Les facteurs géométriques sont beaucoup plus décisifs que les facteurs chimiques dans la détermination de la capacité des cyclodextrines à complexer les différents types de substrats qui peuvent se présenter (Tableau 2.II).

Le Naphtalène est trop gros pour l' α CD et l'anthracène n'entre que dans la γ CD par exemple.

- * La polarité du substrat : les molécules fortement hydrophiles et les groupements fortement hydratés ou ionisés ne sont pas ou peu complexables. Seules les molécules moins polaires que l'eau sont complexables (ceci est dû, bien entendu, à la faible polarité de l'intérieur de la cavité par rapport à l'eau, comme nous l'avons précisé dans le paragraphe précédent).

- * Solvant : la formation des complexes cyclodextrine/substrat en solution aqueuse est très rapide. Cependant, les substances fortement solubles sont généralement faiblement complexées. Le substrat idéal doit être faiblement soluble dans l'eau.

Si l'obtention de l'équilibre en solution aqueuse demande trop de temps, on peut dissoudre le substrat dans un solvant organique. Mais la gamme des solvants utilisables est plutôt restreinte, car excepté les solvants fortement hydrophiles comme le méthanol, l'éthylène glycol, le diéthylène glycol, la glycérine. La plupart ne peuvent pas être utilisés car ils forment des complexes stables avec la cyclodextrine (ex. : pyridine, toluène).

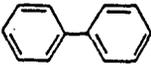
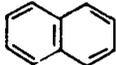
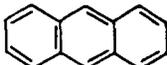
		α -CD	β -CD	γ -CD
Propionic acid	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$	+	-	-
Butyric acid	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	+	+	-
Biphenyl		+	+	+
Cyclohexane		+	+	+
Naphthalene		-	+	+
Anthracene		-	-	+
Cl_2		+	-	-
Br_2		+	+	-
I_2		+	+	+

Tableau 2.II : capacité des cyclodextrines à former des complexes avec quelques substrats. Référence 5

IV APPLICATIONS DES CYCLODEXTRINES^{6,7}

L'inclusion d'une molécule dans la cyclodextrine constitue une micro-encapsulation moléculaire susceptible de modifier considérablement les propriétés physico-chimiques, voir biologiques de la molécule piégée.

Ainsi, la cyclodextrine peut permettre la solubilisation de molécules lipophiles en solution aqueuse, la stabilisation de substances sensibles à la lumière ou à l'oxygène, la fixation de substances très volatiles, etc...

Le potentiel des applications est donc très vaste, et nous allons ici passer en revue succinctement les différentes applications de la cyclodextrine.

1 Applications industrielles

Les cyclodextrines sont utilisées dans l'industrie des produits alimentaires, cosmétiques et hygiéniques, principalement dans le but de préserver les arômes et les parfums lors du stockage ou de leur manipulation (les entités actives sont protégées par la cyclodextrine contre l'oxydation, les réactions photochimiques, la décomposition due à la chaleur, les pertes par volatilité ou par sublimation ...).

La cyclodextrine peut aussi permettre d'envisager l'élimination ou la réduction des odeurs, des goûts indésirables, de la contamination bactériologique. Les avantages de l'utilisation de la cyclodextrine peuvent aussi être simplement technologiques : la stabilité et la standardisation de la composition des produits obtenus, facilitent leur dosage et leur manipulation.

Ainsi, parmi de nombreux exemples :

- * dans l'industrie alimentaire, la cyclodextrine peut aider à la stabilisation et à l'amélioration du goût des plats déshydratés. Elle permet de prolonger la durée gustative des chewing-gum,

- * dans l'industrie des cosmétiques, elle améliore la solubilité dans l'eau de certaines substances qui peuvent alors être plus facilement émulsionnées. Elle permet la stabilisation du goût et de la couleur des dentifrices, la réduction de l'irritation des yeux due aux shampooings,

- * dans l'industrie des tabacs, des additifs sont souvent utilisés afin de parfaire les goûts. Ces arômes artificiels, souvent volatils, sont piégés par la cyclodextrine, et ne sont libérés que lors de la combustion du tabac.

La cyclodextrine peut aussi complexer la nicotine et les goudrons, et donc augmenter notablement l'efficacité des filtres,

- * l'industrie des produits destinés à l'agriculture utilise la cyclodextrine dans les herbicides, fongicides et hormones afin d'améliorer leur temps d'action : un exemple récent⁸ qui concrétise de façon tout à fait explicite l'intérêt des propriétés complexantes de la cyclodextrine est celui qui s'est déroulé en Grèce, à l'automne 1992, époque à laquelle une variété de mouches avait pris l'habitude d'envahir et de détruire la récolte d'olives juste avant leur maturité. On savait qu'une phéromone sexuelle attire irrésistiblement les représentants de l'autre sexe à un degré tel qu'une seule molécule suffit à déclencher la chasse au partenaire. La volatilité extrême de cette molécule faisait que cet appât ne pouvait être utilisé en milieu naturel, mais ce problème a été résolu par l'encapsulation de la phéromone dans la cyclodextrine, qui la libère très lentement en empêchant sa libération et sa dilution immédiate.

2 Applications pharmaceutiques

L'introduction de la cyclodextrine dans la chimie pharmaceutique a permis de réels progrès quant à l'élargissement et à la commodité des applications des médicaments.

A condition d'avoir une taille compatible avec celle de la cavité apolaire de la cyclodextrine, le médicament pourra être complexé par celle-ci.

Les qualités du complexe formé peuvent apporter des améliorations dans les domaines suivants :

* Médicaments oraux

Certains composés liquides peuvent être transformés, grâce à la complexation par la cyclodextrine, en produit cristallisé plus pratique pour l'élaboration de comprimés.

La complexation par la cyclodextrine peut atténuer la mauvaise odeur ou le goût désagréable de certains médicaments.

Le mélange de composés incompatibles est rendu possible grâce à la complexation de leurs sites réactifs. Les cyclodextrines et leurs complexes ne sont pas hygroscopiques.

* Stabilité physico-chimique des médicaments

La stabilité des complexes à base de cyclodextrine, permet de diminuer la sensibilité de certains médicaments, à la lumière, à l'acidité gastrique et à l'oxydation.

La complexation par la cyclodextrine permet de stabiliser les composés volatiles et de diminuer le taux de dégradation chimique.

* Médicaments peu solubles

La complexation par la cyclodextrine de ces derniers, augmente leur solubilité dans l'eau, ce qui aboutit à un meilleur taux de passage dans le sang de ces médicaments. D'autre part, l'obtention de solutions aqueuses stables, permet d'éviter l'utilisation de solvants organiques.

L'introduction de polymères de cyclodextrine à haut pouvoir gonflant permet une désintégration aisée des comprimés en milieu aqueux par gonflement du polymère.

* Mode d'action des médicaments

La formation de complexes médicaments/cyclodextrine peut permettre d'envisager la libération retardée des médicaments au sein de l'organisme ainsi que la réduction de certains effets secondaires (irritations locales).

3 Chimie fine

Malgré les nombreuses applications très concrètes qui viennent d'être exposées, la cyclodextrine reste un sujet d'étude très sollicité dans le domaine de la recherche.

3.1 Modèle d'enzyme et activité catalytique

Ce domaine de recherche sera particulièrement développé dans le Chapitre III.

3.2 Chromatographie

L'utilisation des cyclodextrines dans les différentes techniques chromatographiques est sans doute l'application qui a reçu le plus d'attention des chercheurs travaillant dans ce domaine. De ce fait, elle a connu au cours des 20 dernières années un développement considérable. On distingue deux modes d'utilisation des cyclodextrines en chromatographie selon que la cyclodextrine est ajoutée à la phase mobile éluante ou qu'elle fait partie de la phase stationnaire.

Dans les deux cas, la séparation d'isomères optiques ou géométriques⁹ est basée sur la stabilité relative des complexes substrat/cyclodextrine.

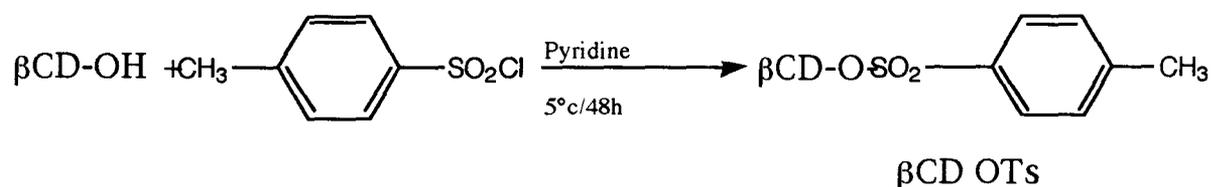
B/ FIXATION DE LA CYCLODEXTRINE SUR LES POLYMERES SUPPORTS

La fixation de la β CD sur les fonctions amines des polymères nécessite de passer par l'intermédiaire d'un dérivé tosylé de celle-ci : le mono-6-p-toluène sulfonyle β -cyclodextrine (β CD OTs). La réaction de greffage se fera par substitution nucléophile des fonctions amines primaires sur la β CD tosylée.

I TOSYLATION DE LA β -CYCLODEXTRINE

A priori, la principale difficulté de l'opération est d'obtenir un dérivé monotosylé de la cyclodextrine, car, l'obtention d'un dérivé di, tri ou poly-substitué mènerait à une réticulation des polymères linéaires lors de la fixation de la β CD sur ces derniers.

La monotosylation de la β -cyclodextrine a été étudiée par différents auteurs^{10,11,12}. Nous avons choisi les conditions de la littérature¹³.



1 Mode opératoire

A une solution de β -cyclodextrine (18 g ; $15,86 \cdot 10^{-3}$ moles) dans la pyridine anhydre (120 ml), maintenue dans un bain de glace, on ajoute du chlorure de paratoluène sulfonyle (1,51 g ; $7,9 \cdot 10^{-3}$ moles). Après dissolution totale, la solution est placée au réfrigérateur pendant 48 heures.

Après addition de 100 ml d'eau, le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif. On obtient une huile visqueuse qui donne un précipité blanc par ajout d'eau (1 litre).

Le précipité est récupéré par filtration, lavé abondamment à l'eau froide puis séché sous vide à 60°C pendant 24 heures. Le produit est recristallisé dans l'eau à raison de 1 g pour 100 ml d'eau (5 g ; $3,5 \cdot 10^{-3}$ moles, 22 %).

2 Caractérisation du β CD OTs

Le point de fusion est de 173°C, il est tout-à-fait comparable à ceux relevés dans la littérature, 173°C¹⁰ et 160-170°C¹¹.

La RMN ¹³C (400 MHz, DMSO_d₆) permet de retrouver les pics caractéristiques de la β CD, et ceux du groupement tosylo (Tableau 3.II).

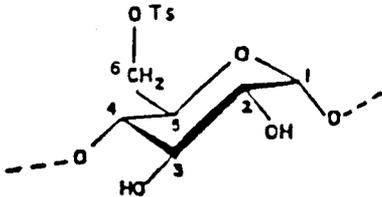
δ (ppm)	101, 8	81, 4	72, 9	72, 3	71, 9	59, 8	144, 6	132, 5	129, 7	127, 4	21, 0
Attribution	C1	C4	C3	C2	C5	C6	C10	C8	C9	C7	C11
											

Tableau 3.II : RMN ¹³C (400 MHz, DMSO _d₆) du β CD OTs, déplacements chimiques par rapport au TMS.

Les conditions opératoires utilisées sont censées mener à une monotosylation de la β CD. Afin de vérifier la monosubstitution du produit, nous avons procédé par les caractérisations ci-après.

L'analyse élémentaire a donné les résultats suivants :

Élément dosé	C	H	S
Calc. %	45,68	5,94	2,49
Trouv. %	46,02	6,06	2,82

Tableau 4.II : Analyse élémentaire du β CD OTs.

Le spectre RMN du proton du β CD OTs dans le DMSO deutéré (Figure 2.II) montre un quadruplet caractéristique des protons du cycle benzénique à 7,53 ppm. Le massif situé à 4,8 ppm est attribué aux protons anomériques C₁H des cycles de glucose. L'intégration de ces pics donne 4 protons benzéniques pour 7 protons anomériques, ce qui caractérise bien la monosubstitution de la β CD²⁵.

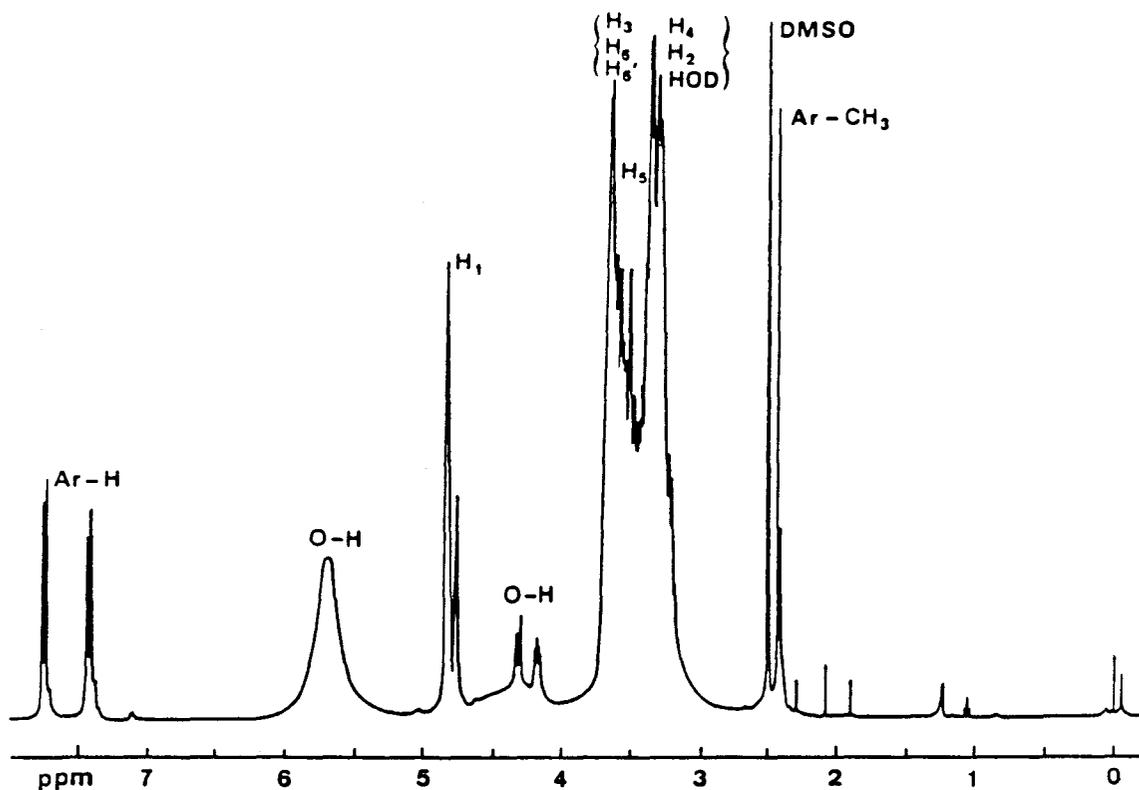


Figure 2.II : Spectre de RMN ^1H (400 MHz, DMSO d_6) de la β -cyclodextrine tosylée.

* Le degré de pureté du β CD OTS a été vérifié par HPLC (Figure 3.II). On observe des traces de disubstitué très minoritaire. Le monosubstitué, majoritaire, représente 91,8 % du mélange.

Les dérivés di et tri substitués ont été également mis en évidence par spectrométrie de masse à haute résolution (FAB). On observe ainsi sur le spectre de masse (Figure 4.II), les pics de l'ion moléculaire $m/e = 1289$, du dérivé disubstitué $m/e = 1443$.

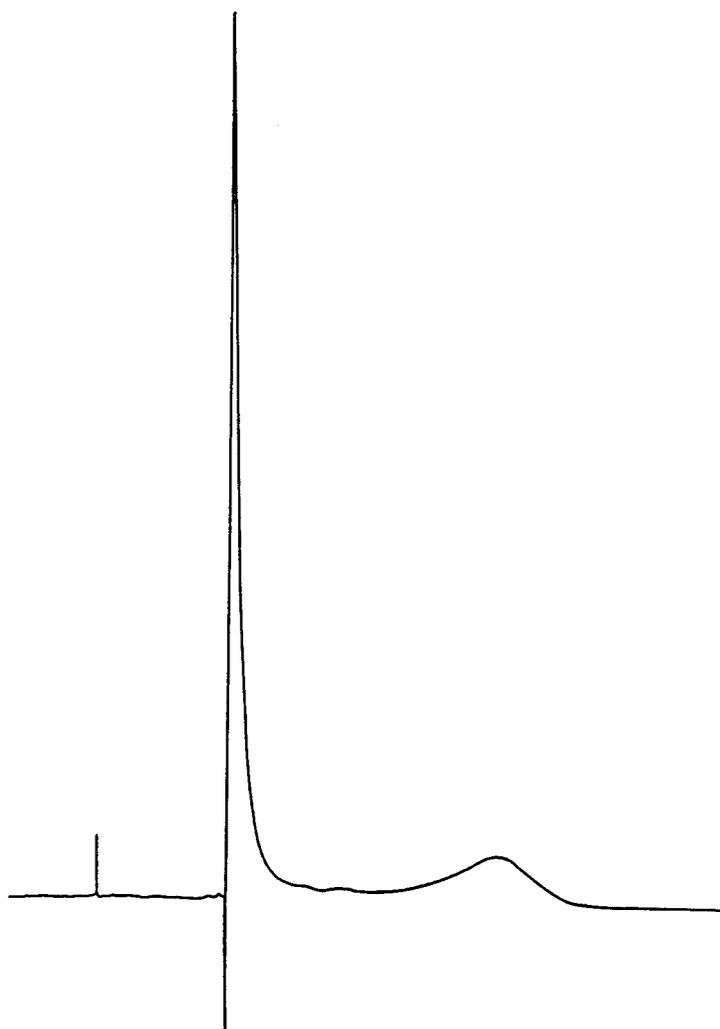


Figure 3.II : Chromatogramme HPLC du β CD OTs à 260 nm sur RP 18 mélange éluant (Méthanol-eau : 50/50).

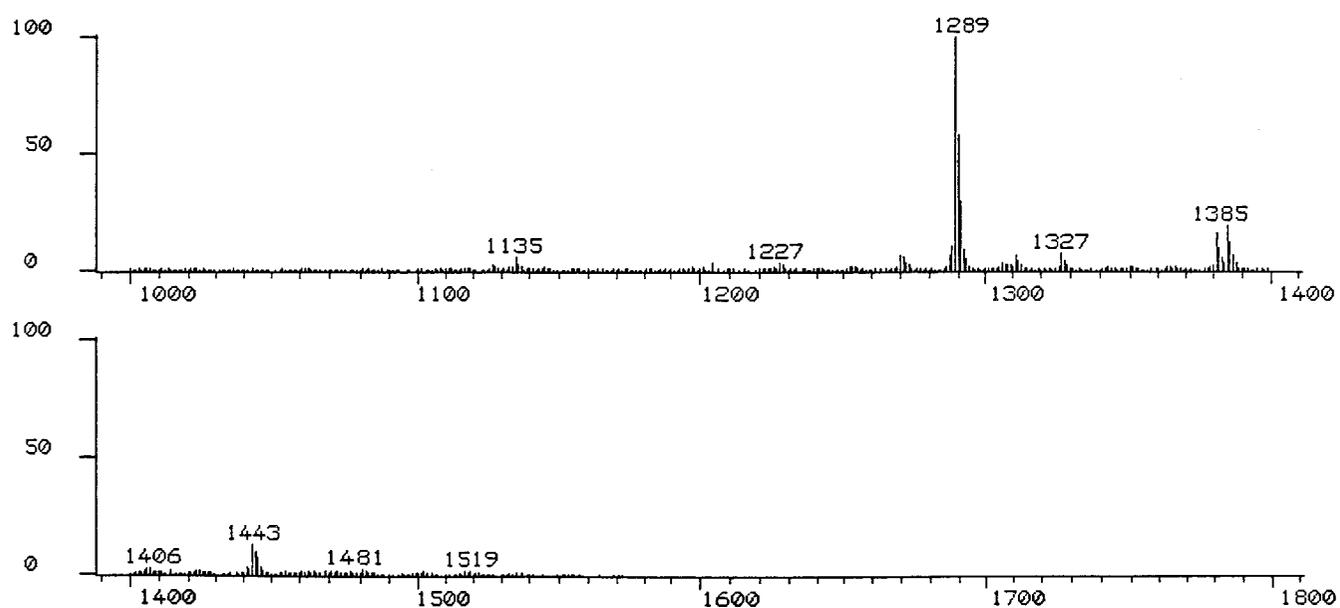


Figure 4. II : Spectre de masse en FAB de la β CD tosylée.

On peut également doser par spectroscopie UV la quantité de groupements tosyloxy attachés à la β CD en déterminant la densité optique d'une solution de β CD OTs de concentration connue, à une longueur d'onde particulière : 263 nm (longueur d'onde d'absorption maximale du tosylate d'éthyle dont le coefficient d'extinction molaire est de 537 l/mole.cm dans l'éthanol à 95°C).

Il nous reste à préciser le type de fonction hydroxyle (primaire ou secondaire) entrant en jeu lors de la tosylation de la β -cyclodextrine.

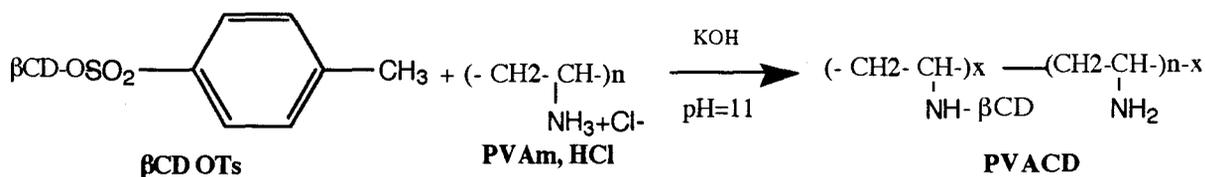
Si en théorie la réactivité des hydroxyles primaires est supérieure à celle des hydroxyles secondaires, cette différence de réactivité peut être modifiée par la nature du solvant utilisé lors de la tosylation : une monotosylation régiospécifique de l'un des hydroxyles secondaires en solution aqueuse à pH 11 avec un rapport de 6 à 10 équivalents de chlorure de paratosyle par équivalent de β CD a été rapportée¹¹. La formation d'un complexe entre le chlorure de paratosyle et la β CD a été rendue responsable de la monotosylation. Par contre, la réaction de 6 à 9 équivalents de chlorure de paratosyle par β CD, dans la pyridine, provoque la tosylation de tous les groupes hydroxyles primaires, sans aucune tosylation des hydroxyles secondaires^{14,15}.

Dans ce cas, le chlorure de tosyloxy se trouve en compétition avec la pyridine pour former des complexes avec la β CD, et de ce fait, il réagit préférentiellement avec les groupes hydroxyles primaires plus réactifs que les secondaires.

Puisque notre mode opératoire de tosylation utilise la pyridine comme solvant, le chlorure de tosyloxy s'attaque aux hydroxyles primaires, mais le fait de ne mettre en présence que 0,5 équivalent de chlorure de tosyloxy par équivalent de cyclodextrine semble suffisant pour obtenir des dérivés monotosylés en majorité, malgré l'absence de la formation de complexes entre le chlorure de tosyloxy et la cyclodextrine.

II GREFFAGE DE β -CYCLODEXTRINE SUR LA PVAm

Dans le cadre de notre étude, la β CD a été fixée sur la PVAm en utilisant les conditions de la littérature¹⁶ :



Sept PVAm porteuses de β CD ont été préparées : elles diffèrent entre elles par le degré de substitution de leurs fonctions amines par la β CD. Pour cela, nous avons mis en présence des quantités de polymère et de cyclodextrine tosylée définies par les rapports molaires nous avons également fait varier la composition du solvant. SEO et al.^{10,17} ont réalisé le greffage de la β CD sur la polyallylamine (PAA) en utilisant également le β CD OTs comme intermédiaire, le solvant étant un mélange MeOH/DMAc ou le méthanol seul. Les synthèses que nous avons tentées dans ces conditions ont donné des polymères insolubles en milieu aqueux. Nous avons effectué le greffage en milieu aqueux (SEBILLE et al.¹⁸) ou dans des mélanges H₂O/MeOH à pH = 11.

* Mode opératoire

La PVAm chlorhydratée ou non est dissoute dans le volume correspondant d'eau distillée (50 ml de solvant/1g de PVAm). Le β CD OTs est ensuite ajouté par petites portions. Le pH du milieu est ajusté à 11 avec une solution d'hydroxyde de potassium à 1 M. La solution est chauffée à 60°C sur agitation pendant une durée variable.

En fin de réaction, la solution devenue limpide est dialysée (membrane cellulosique 6-8000) contre un mélange H₂O/MeOH (90/10) pendant 3 jours et de l'eau distillée pendant 3 jours afin d'éliminer le β CD OTs en excès, et le polymère porteur de β CD est récupéré par lyophilisation.

III GREFFAGE DE LA β CD SUR LES MACROPOREUX

La publication jointe en Annexe 1 décrit à la fois la préparation et l'application des systèmes macroporeux.

C/ CARACTERISATION DES POLYMERES GREFFES

I METHODES DE DOSAGE DE LA β CD

1 Introduction

Plusieurs méthodes de dosage de la β CD existent, mais dans notre cas, il est nécessaire de mettre au point une méthode de dosage de la β CD fixée sur des polymères solubles ou insolubles.

Les diverses caractéristiques physico-chimiques des cyclodextrines permettent l'utilisation d'un certain nombre de méthodes de dosage parmi lesquelles nous avons testé :

- l'oxydation periodique des α -glycols,
- la complexation de la phénolphtaléine,
- la polarimétrie,
- le dosage des sucres réducteurs issus de l'hydrolyse de la β CD.

Nous verrons que chacune de ces méthodes aura une efficacité plus ou moins grande sur les différents supports.

La plupart de ces méthodes s'appliquent à des solutions de cyclodextrine non modifiée. Les essais préliminaires effectués vérifient leur validité, mais nous nous sommes heurtés à certaines limites lorsque nous avons tenté de les utiliser sur la β CD fixée sur support, soluble ou insoluble, car le polymère interagit soit en subissant les attaques chimiques des réactifs, soit en adsorbant ceux-ci.

2 Oxydation periodique¹⁹

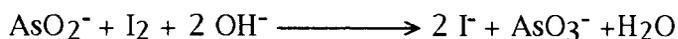
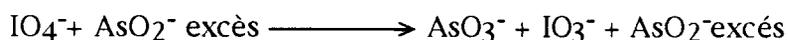
L'oxydation par le periodate est une réaction spécifique aux α -glycols. C'est une méthode de dosage des sucres, mais également un moyen de mise en évidence de la structure des polysaccharides.

L'action du periodate sur la cyclodextrine se caractérise par la coupure de la liaison C₂ - C₃ de chacune des unités glucose. L'oxydation complète de la β CD nécessitera donc 7 équivalents de periodate.

La quantité de periodate en excès est dosée par la méthode de FLEURY-LANGE qui permet le dosage des ions IO₄⁻ en présence des ions IO₃⁻ résultant de la réaction de coupure.



Elle consiste à réduire le periodate en iodate par l'action de l'ion arsénite (AsO_2^-) en excès, en solution à pH 8, avec l'ion iodure comme catalyseur. L'excès d'ions AsO_2^- est dosé en retour par une solution d'iode titrée.



L'action du periodate sur des solutions étalons de cyclodextrine libre donne des résultats quantitatifs satisfaisants ; cependant, lorsque celle-ci est fixée sur polymères, les résultats obtenus deviennent aléatoires, l'ion IO_4^- réagissant également sur les fonctions amines libres voisines du support. Cette méthode a donc dû être abandonnée.

3 Complexation de la Phénolphtaléine²⁰

La phénolphthaléine forme un complexe stable, incolore, de stoechiométrie 1-1 avec les différentes cyclodextrines (α , β et γ), en solution aqueuse à pH 10,5. Pour la β -cyclodextrine, la constante de stabilité du complexe avec la phénolphthaléine dans une solution de Na_2CO_3 10^{-3} M à pH 10,5 est de : $2,16 \cdot 10^{-4} \text{M}^{-1}$.

Il existe un domaine de concentration en cyclodextrine, au sein duquel la diminution de l'intensité de la couleur de la phénol-phtaléine est proportionnelle à la concentration en cyclodextrine, ce domaine va de 0 à $4 \cdot 10^{-5}$ M.

Ceci va nous permettre de mesurer les variations de la densité optique d'une solution de phénolphthaléine en fonction de la concentration en cyclodextrine dans ce domaine de concentration (Figure. 5.II).

Le tracé de $DO_1 - DO_x$ en fonction de la concentration en β -cyclodextrine nous donne une droite pouvant faire office de courbe d'étalonnage.

DO_1 : densité optique à 550 nm de la solution de phénolphtaléine à $2,5 \cdot 10^{-5}$ M initiale (courbe 1).

DO_x : densité optique de la même solution contenant des quantités de β CD croissantes à 550 nm (courbes suivantes) :

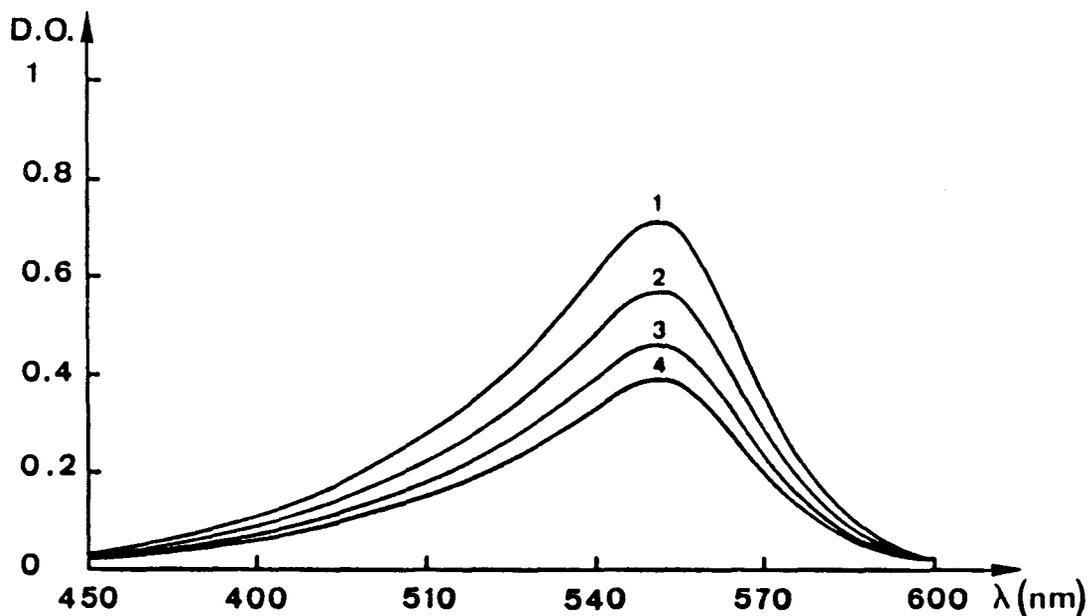


Figure 5.II : Variation de la DO en fonction de la concentration en β CD et de la longueur d'onde. [phénolphtaléine] = $2,5 \cdot 10^{-5}$ M ; (1) : [β CD] = 0M ; (2) : $1,25 \cdot 10^{-5}$ M ; (3) : $2,5 \cdot 10^{-5}$ M ; (4) : $3,75 \cdot 10^{-5}$ M.

Si cette méthode est applicable aux polymères hydrosolubles, elle ne l'est pas sur les macroporeux qui captent la phénolphtaléine par adsorption, ce qui donne des résultats par excès.

4 Polarimétrie

Chaque unité glucose de la β CD possède cinq centres optiques actifs, la β -cyclodextrine est donc chirale. Son angle de rotation spécifique $[\alpha]^{25}_D$ est de $162,5^\circ$.

Ceci permet de déterminer la concentration de solutions de cyclodextrine avec une sensibilité pouvant aller jusqu'à 10^{-4} M.

Grâce à cette méthode qui a l'avantage d'être rapide, nous avons pu mesurer la quantité de polymère nécessaire à l'application de la méthode de dosage suivante qui est la plus fiable.

5 Dosage des sucres réducteurs par le bleu de tétrazolium^{21,22}

Le bleu de tétrazolium est un agent colorimétrique capable d'oxyder les sucres. Sa forme réduite est alors détectable par spectrophotométrie visible.

Lors de nos dosages de cyclodextrine, nous aurons des quantités très faibles de glucose à déterminer. Or, des quantités de sucre de l'ordre de la nanomole peuvent être détectés grâce au bleu de tétrazolium modifié par l'addition de tartrate de sodium et de potassium²¹.

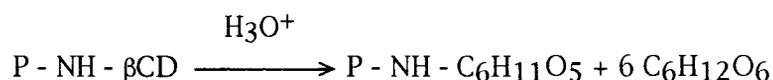
Le réactif est une solution à 0,1 % de Bleu de Tétrazolium dans la soude 0,05 M contenant du tartrate de potassium et de sodium (0,5 M). La présence de ce dernier améliore la sensibilité et la stabilité du réactif, ainsi que la rapidité de la réaction chromogène.

Il est évident que la cyclodextrine des échantillons à doser va devoir être hydrolysée en glucose avant de pouvoir être traitée par le bleu de tétrazolium. Pour ce faire, une quantité de support (le broyage est nécessaire pour les macroporeux) dans 30 ml d'acide sulfurique 0,5 M est mise à reflux pendant 7 heures à 100°C²². Après neutralisation par de la soude et filtration des résidus, on complète à 100 ml ; on prélève alors 1 ml de cette solution, que l'on mélange à 4 ml de réactif et que l'on met au bain-marie à 100°C pendant 3 minutes.

Afin de pouvoir exploiter le résultat du dosage spectrophotométrique, il est nécessaire d'établir une gamme étalon. Celle-ci sera composée de 7 échantillons de glucose dont la concentration va de 0 à 10 µg/ml. On prélève 1 ml de chaque échantillon que l'on mélange à 4 ml de réactif. Cette gamme étalon est ensuite passée au bain-marie à 100°C pendant 3 minutes comme les échantillons à doser.

Le dosage proprement dit est alors effectué en spectrophotométrie visible à 690 nm contre une référence : le témoin blanc de la gamme étalon.

Remarque : pour le dosage de la βCD greffée sur les polymères réticulés, la liaison qui unit la cyclodextrine au support ne subit pas l'hydrolyse. Par conséquent, il reste une entité glucose attachée au polymère que l'on ne retrouve pas en solution :



La formule suivante donne directement la quantité de βCD contenue sur les échantillons de la série PVACD :

$$\frac{\gamma \cdot V \cdot 1135 \cdot 10^6}{180 \cdot M_p \cdot 7} = \frac{\gamma \cdot V \cdot 9 \cdot 10^5}{M_p} = \text{g } \beta\text{CD} / \text{g de polymère}$$

- γ : Quantité de glucose dosée pour 1ml d'hydrolysats obtenue à partir de la mesure de densité optique et de la courbe d'étalonnage (μg de glucose)
- V : Volume d'hydrolysats (après neutralisation)
- M_p : Masse de polymère hydrolysé

Cette dernière méthode constitue le dosage le plus reproductible de toutes les méthodes qui viennent d'être inventoriées. C'est donc à l'aide de celle-ci que nous doserons la βCD contenue dans les échantillons macroporeux et les polymères de la série PVACD.

II CARACTERISATION

1 RMN, spectro UV

Malgré la dialyse prolongée et plusieurs essais de purification, dont une tentative de séparation sur gel SEPHADEX G10 et G50, l'analyse élémentaire révèle la présence de traces de soufre ; d'autre part la spectroscopie UV montre l'existence d'un pic à 263 nm, ces 2 faits rapportent que des groupements tosyles sont restés attachés sur le polymère (Figure 6.II).

La RMN ^{13}C de l'échantillon PVACD18 dans D_2O révèle la présence de βCD sur le polymère ; les pics à 61,5 ; 73,2 ; 73,4 ; 74,6 et 103,3 ppm sont respectivement relatifs aux carbones C_1 ; C_4 ; C_3 ; C_2 ; C_5 et C_6 de la β -cyclodextrine mais on trouve aussi les pics relatifs aux groupements tosyles à 21,9 ; 126,7 ; 130,63 ; 141,32 et 143,51 ppm (Figure 7.II).

La RMN ^1H montre également la persistance des groupements tosyles fixés sur la PVAm ; les 2 doublets à 7,35 et 7,85 ppm et le singulet à 2,4 ppm sont relatifs respectivement aux protons aromatiques et au méthyle du groupement tosyle (Figure 8.II).

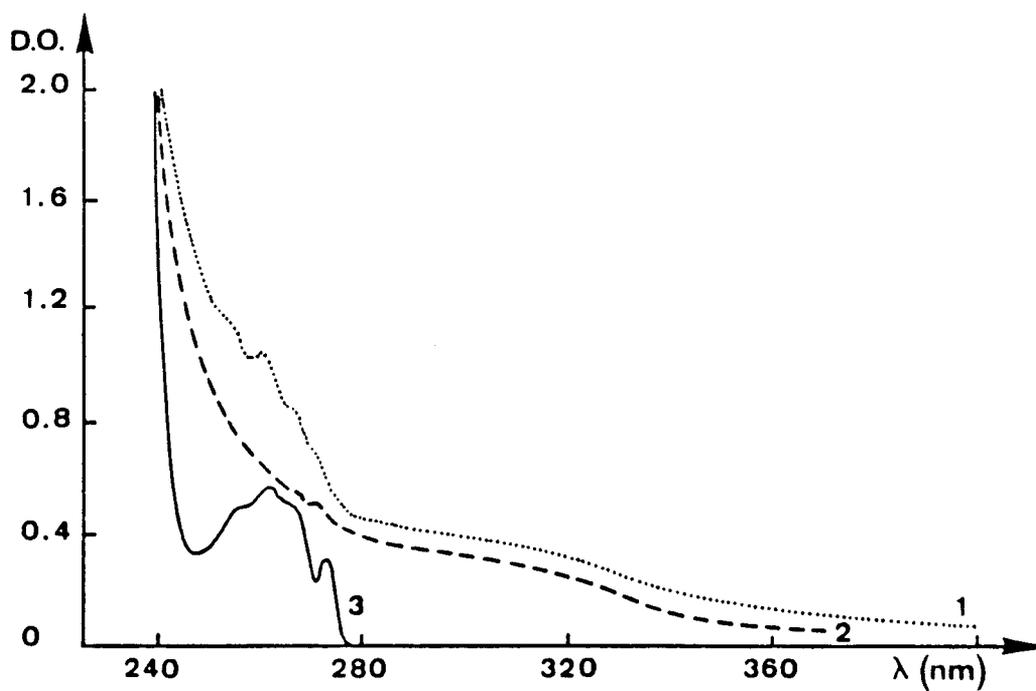


Figure 6.II : Spectres UV de la PVAm porteuse de β CD (1), de la PVAm seule (2) et de la β CD tosylée (3)

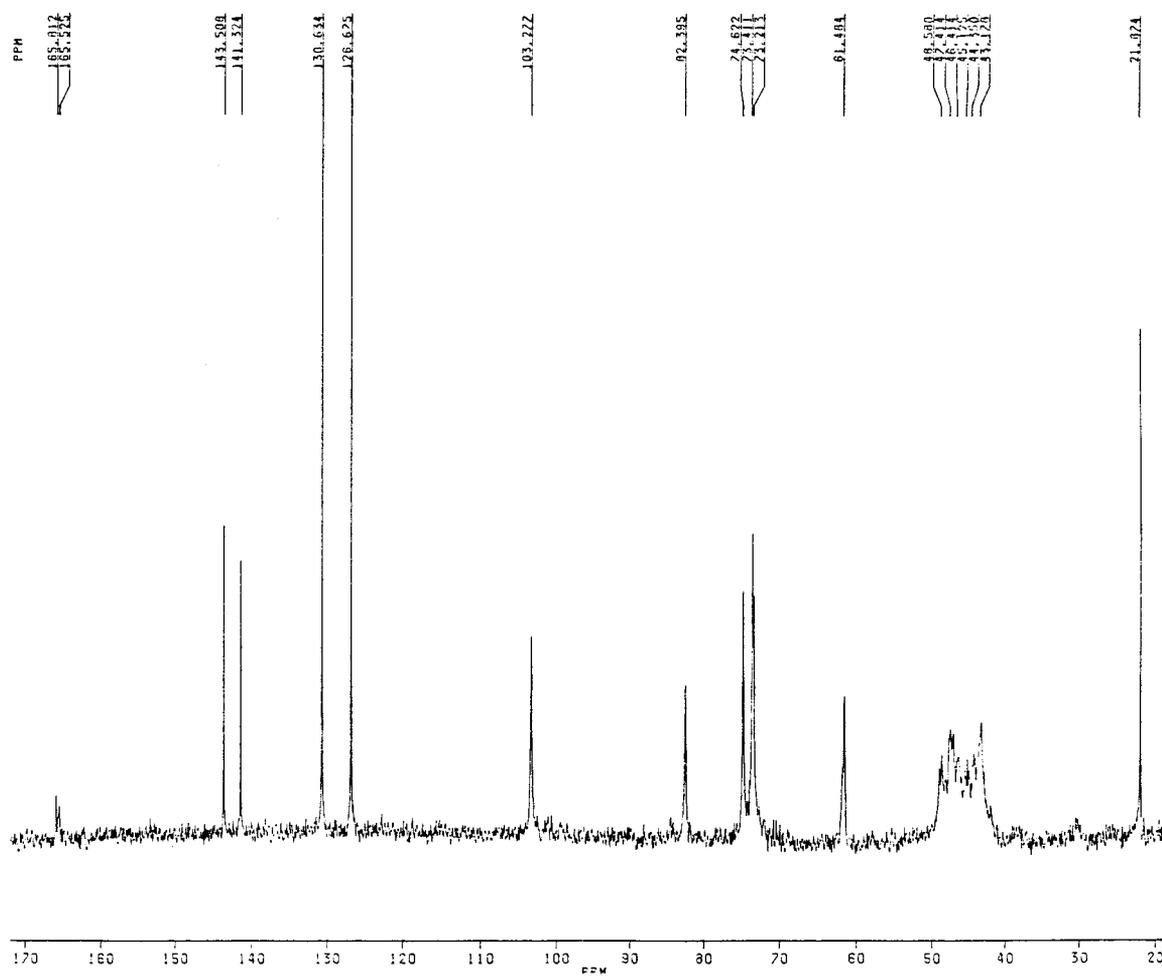


Figure 7.II : Spectre RMN ^{13}C (400 MHz, D_2O) de la PVAm greffée (PVACD18)

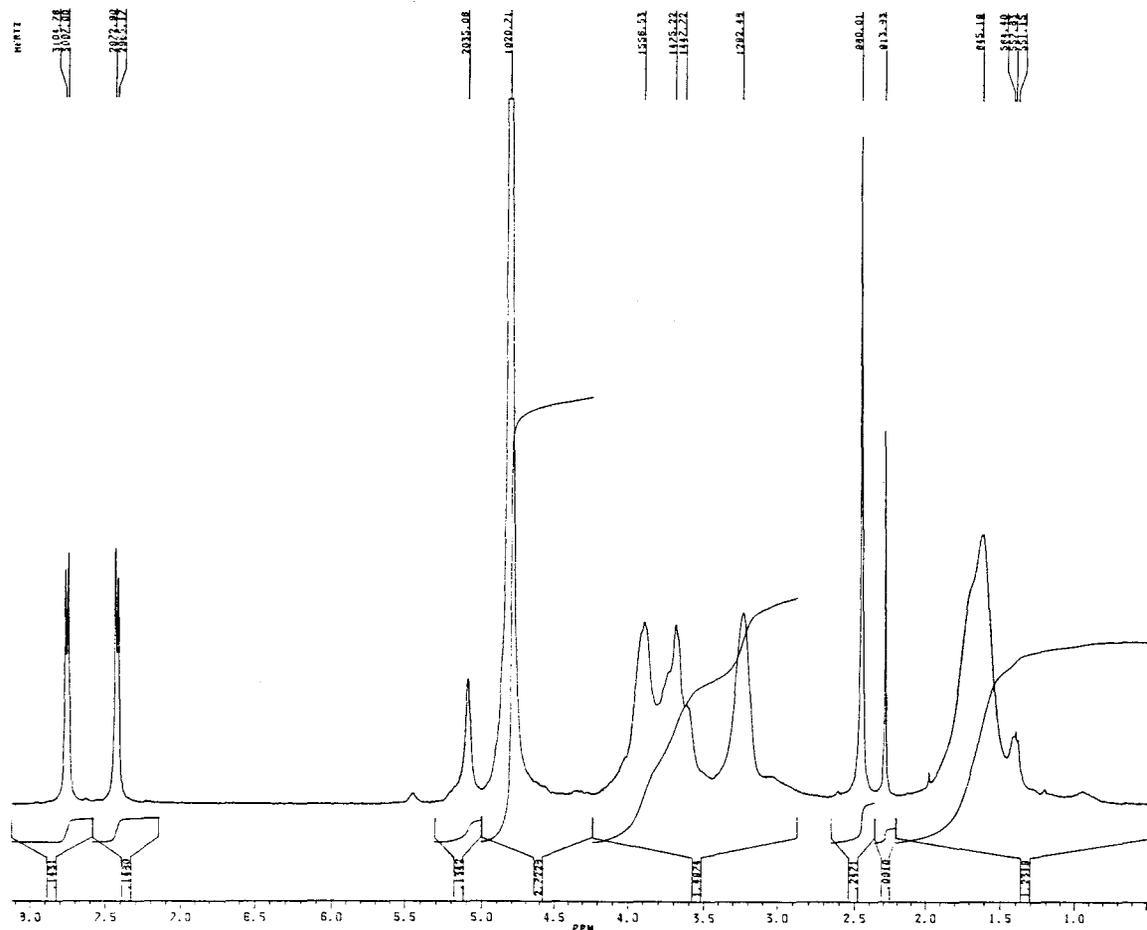


Figure 8.II : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O) de la PVAm greffée.

L'existence de groupements aromatiques révélée par ces trois méthodes spectroscopiques a d'abord été interprétée par la persistance d'acide paratoluène sulfonique (TsOH) (complexe CD-TsOH) ou même de $\beta\text{CD OTs}$ complexés par la βCD greffée. Mais une dialyse prolongée dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (90-10) ou les essais préalables de purification par rinçages au soxhlet auraient dû permettre l'élimination du TsOH ou celle du $\beta\text{CD OTs}$.

Nous avons conclu que ces groupements tosyloxy résiduels proviennent de la petite proportion de dérivé di ou éventuellement tri-tosylé du $\beta\text{CD OTs}$ que nous avons mis en évidence lors de la caractérisation de ce produit.

2 Dosage de la β CD fixée sur les polymères

Référence	%H ₂ O	%MeOH	VA/CDOTs	Durée réaction	BT (a)	Polarimétrie ^(a)
PVACD05	65	35	6	21	-	0,05/0,2
PVACD06	50	50	6	21	-	0,06/0,3
PVACD18	100	0	5	24	0,19/0,9	0,21/1
PVACD24	95	5	4	21	0,24/1,2	0,32/1,8
PVACD28	90	10	4	21	0,28/1,5	0,34/1,9
PVACD35	100	0	2	24	0,35/2	0,31/1,7
PVACD57	100	0	2	48	0,59/5	0,57/5

Tableau 5.II : Conditions de greffage et de dosage de la cyclodextrine par la méthode du Bleu Tétrazolium (BT) et par polarimétrie. (a) Le 1er chiffre est exprimé en g de β CD/g de polymère et le second est le degré de substitution en %.

La quantité de β CD greffée sur la PVAm dépend du rapport VA libre sur le nombre de mol de β CD OTs de départ, mais aussi de la durée de la réaction ; la composition du solvant intervient dans une moindre mesure.

Nous pouvons à présent constater que le greffage de la β CD se fait beaucoup plus difficilement sur la PVAm que sur la PAA si l'on compare nos résultats à ceux de SEO et al.^{10,17}. La différence des conditions de réaction (de solvant), mais aussi la présence d'un méthylène éloignant la fonction amine du squelette du polymère en la rendant plus accessible sont probablement des facteurs qui favorisent l'attaque nucléophile de la PAA sur le β CD OTs mais ce ne sont pas les seules explications, comme nous allons le voir.

Le tableau suivant résume les conditions de la réaction de greffage du β CD OTs sur la PAA, ainsi que le degré de substitution (mesuré d'après le rapport N/C par analyse élémentaire) rapportés par SEO et al.¹⁷.

(PAA) mol/l	(β CDOTs) mol/l	NH ₂ / β CDOTs	solvant	durée de réaction(h)	DS _{max} calc.	DS mesure
0,19	0,075	2,5	MeOH	22	0,4	0,39
0,27	0,11	2,45	MeOH	40	0,41	0,46
0,27	0,15	1,8	MeOH+ DMAc	48	0,55	0,77

Tableau 6.II : Conditions de dosage, DS_{max} calculé et DS mesuré. Référence 17.

Nous avons calculé le DS_{max} , c'est à dire le degré de substitution maximum que l'on pourrait obtenir si la réaction se faisait à 100% à partir des concentrations de départ qui sont données. On peut constater que dans le premier cas (Tableau 6.II), la réaction se ferait à 99% et dans les deux autres cas, la quantité de β CD dosée sur le polymère est supérieure à la quantité de β CD OTs introduite au départ. D'après cette observation, nous pouvons émettre un doute soit sur la méthode de dosage utilisée ou encore sur la purification de la PAA-CD qui est simplement lavée à l'éther et au méthanol. Nous regrettons de ne disposer d'aucune donnée complémentaire telles que spectres RMN, UV ou de résultats de dosages obtenus par une méthode plus précise.

3 Etude viscosimétrique de la série PVACD et des mélanges PVAm/ β CD

Afin de savoir si le greffage de la β CD sur la PVAm provoque quelque modification de la conformation du polymère en milieu aqueux, nous avons procédé à une étude par viscosimétrie capillaire.

3.1 Conditions opératoires

Viscosimètre capillaire automatique SCHOTT GERÄTE AVS 400

Tube capillaire de diamètre 0,84 mm ; $K= 0,03$

$T^{\circ}= 25^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,1$)

Tampon Tris 0,05M +HCl pour les mesures à $\text{pH} = 7,2$ et $8,5$

Tampon Borax 0,0125M + NaOH pour les mesures à $\text{pH} = 9,2$ et $10,5$

3.2 Résultats

L'étude de la viscosité des polymères PVAm en fonction du pH (Figure 9.II) montre que l'on atteint une viscosité maximale autour de $\text{pH} = 8$. BROUWER et al. ont également rapporté ce phénomène attribué à une conformation étendue et rigide qui est stabilisée par liaison Hydrogène entre les groupements ammonium et amines libres voisins^{23,24}.

On observe également une viscosité maximale au même pH dans la série PVACD, cependant l'effet du pH est moins prononcé lorsque le DS augmente ; d'autre part, l'écart des viscosités diminue à pH élevé.

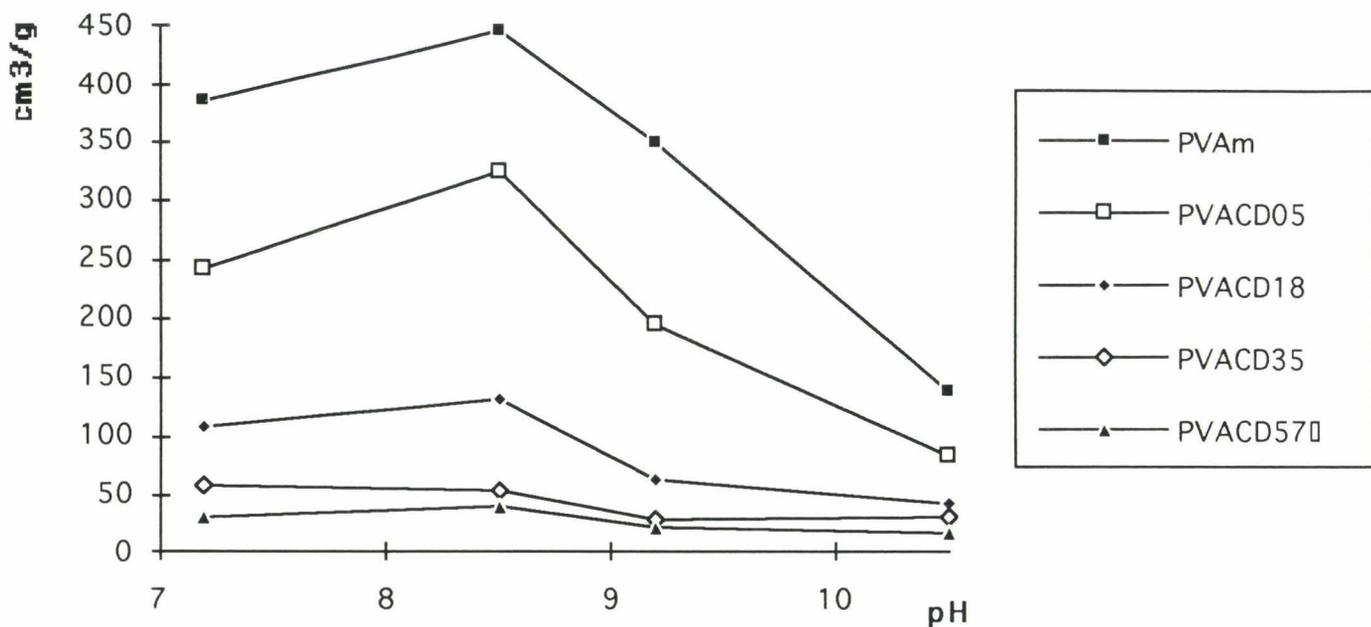


Figure 9.II : Evolution de la viscosité réduite de la PVAm et de la série PVACD en fonction du pH.

La variation conformationnelle induite par l'opération de greffage de la β CD sur la PVAm est nette d'après la Figure 10.II qui exprime la viscosité en fonction du DS : la viscosité chute brutalement pour se stabiliser à une valeur minimale dès que DS atteint 2%

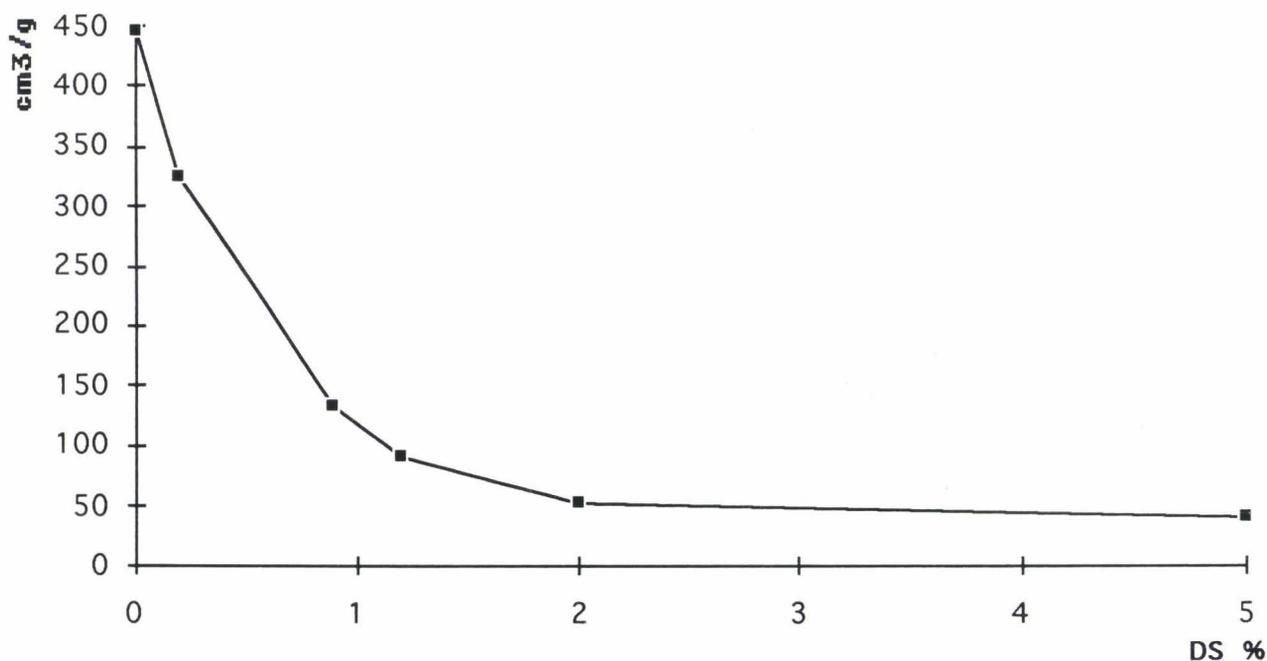


Figure 10.II : Evolution de la viscosité réduite des polymères de la série PVACD en fonction de leur degré de substitution (DS) à pH = 8,5.

3.3 Interprétation

La caractérisation UV et RMN de nos polymères greffés a révélé la présence de groupements tosyloxy résiduels qui pourraient apporter une réponse à cette brutale chute de viscosité : 1) Des groupements cyclodextrine greffés pourraient complexer des tosyloxy d'autres β CD plurisubstituées, ces interactions intramoléculaires provoquant un repliement des chaînes et la diminution de la viscosité. 2) Ces tosyloxy pourraient attribuer au polymère un domaine hydrophobe qui, par le rapprochement des noyaux toluéniques, occasionnerait le repliement de la macromolécule.

Mais des mesures de viscosité approfondies apportent des renseignements qui semblent répondre à ce problème de façon cohérente :

Une mesure de viscosité de PVAm en présence de β CD libre (10^{-2} M), révèle que, contrairement à la β CD greffée, la viscosité augmente de 20% : l'existence de liaisons Hydrogènes entre les fonctions amines et les hydroxyles de la β CD serait un facteur favorable à l'accumulation des molécules de β CD le long de la chaîne polymère et cet encombrement serait la cause de l'augmentation de la viscosité.

Pourquoi la β CD liée au polymère induirait-elle un repliement de celui-ci, alors que la β CD libre aurait l'effet inverse ? Si l'on maintient l'hypothèse des liaisons Hydrogène, il faut tenir compte de la faible teneur en β CD du polymère (< à 5%) ce qui n'autoriserait que des interactions VA/ β CD *intramoléculaires* ; celles-ci seraient alors responsables du repliement des chaînes et seraient dépendantes du taux de greffage comme nous l'avons observé (Figure 10.II).

Pour vérifier cette dernière hypothèse, 2 expériences supplémentaires ont été réalisées et sont résumées dans le Tableau 7.II :

* la viscosité de l'échantillon PVACD57 a été mesurée en présence de cyclodextrine libre (10^{-2} M), et l'on a observé une augmentation de viscosité de près de 80%. On peut traduire ce résultat par une destabilisation des liaisons Hydrogènes intramoléculaires au profit des nouvelles liaisons établies avec la cyclodextrine libre.

* la viscosité de la PVAm a été mesurée en présence d'une quantité très faible de cyclodextrine (rapport molaire 100) et l'on a observé une diminution de viscosité d'environ 20% par rapport au mélange équimolaire. De plus, cette valeur est inférieure de 10% par rapport à celle qui a été mesurée en absence de β CD.

Notre hypothèse est donc bien vérifiée : la PVAm peut former des liaisons hydrogène avec la cyclodextrine et ceci a des conséquences sur la conformation du

polymère. Lorsque le rapport PVAm/ β CD est grand, les interactions auraient tendance à se produire de façon intrachaine et de provoquer le repliement du polymère, ceci a été vérifié à la fois pour des mélanges greffés et (dans une moindre mesure) non greffés ; d'autre part quand le rapport PVAm/ β CD est petit, la cyclodextrine viendrait encombrer le polymère sur toute la longueur de chaîne et faire augmenter la viscosité.

Polymère	β CD ajoutée		
	0M	10^{-4} M	10^{-2} M
PVAm	446	408	523
PVACD57	40	—	72

Tableau 7.II : Viscosité réduite de PVAm et PVACD57 exprimée en cm^3/g en fonction de la concentration en β CD ajoutée. (polymère) = $1,16 \cdot 10^{-2}$ M, pH = 8,5, Tris 0,05M.

4 Mise en évidence d'interactions entre la PVAm et la β CD par potentiométrie

4.1 Principe de la méthode

Les études viscosimétriques ci-dessus mettent en évidence l'existence d'interactions entre la PVAm et la β CD ; afin de vérifier si ce sont effectivement des liaisons hydrogène qui se manifestent, nous avons entrepris des études potentiométriques que nous avons jugées tout à fait adaptées à la révélation de leur existence.

Le principe de cette méthode est d'observer une éventuelle modification du pK apparent (pK_{app}) de la PVAm qui serait induit par la formation de liaisons hydrogènes "parasites" avec la cyclodextrine et qui provoqueraient alors une variation des équilibres de dissociation entre $P\text{-NH}_3^+ \rightleftharpoons P\text{-NH}_2 + \text{H}^+$.

La richesse de la cyclodextrine en groupements hydroxyles (21 OH/ β CD) et leur caractère mixte - ils sont à la fois donneurs et accepteurs de doublets libres - permettent plusieurs types de liaisons hydrogène avec les fonctions amines ou ammoniums de la PVAm qui ont été schématisées dans la Figure 11.II.

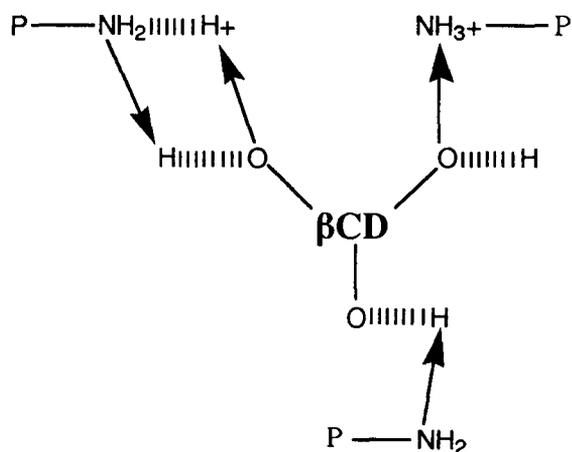


Figure 11.II : Schématisation des différentes liaisons hydrogène entre la PVAm et la β CD

Chacun des types de liaisons hydrogène exposés ci-dessus n'aura pas une fréquence équivalente : en effet, au cours de la neutralisation du polymère, sont d'abord présents en majorité des fonctions amines protonnées qui disparaissent au profit de fonctions amines libres. Le polymère cèdera dans un premier temps des protons aux hydroxyles donneurs de doublets libres de la cyclodextrine, puis dans un deuxième temps, c'est lui qui va progressivement devenir donneur de doublets libres envers les atomes d'hydrogène des fonctions hydroxyles de la β CD.

4.2 Résultats

La PVAm, HCl ($4 \cdot 10^{-3}$ M) est titrée par de la soude 0,05 N sous courant d'azote, la température régulée à 25°C, aucun sel n'a été ajouté dans le milieu.

Plusieurs rapports cyclodextrine/vinylamine ont été expérimentés : $R = 0,05$; 0,5 ; 1 et 2.

Les données potentiométriques ont été exploitées telles quelles ($\text{pH} = f(\alpha)$) ou ont été transformées par la relation de *Hendersson-Hasselbach* et ont alors permises d'exprimer pK_{app} en fonction de α qui est le degré de neutralisation des fonctions amines du polymère (Figure 12.11).

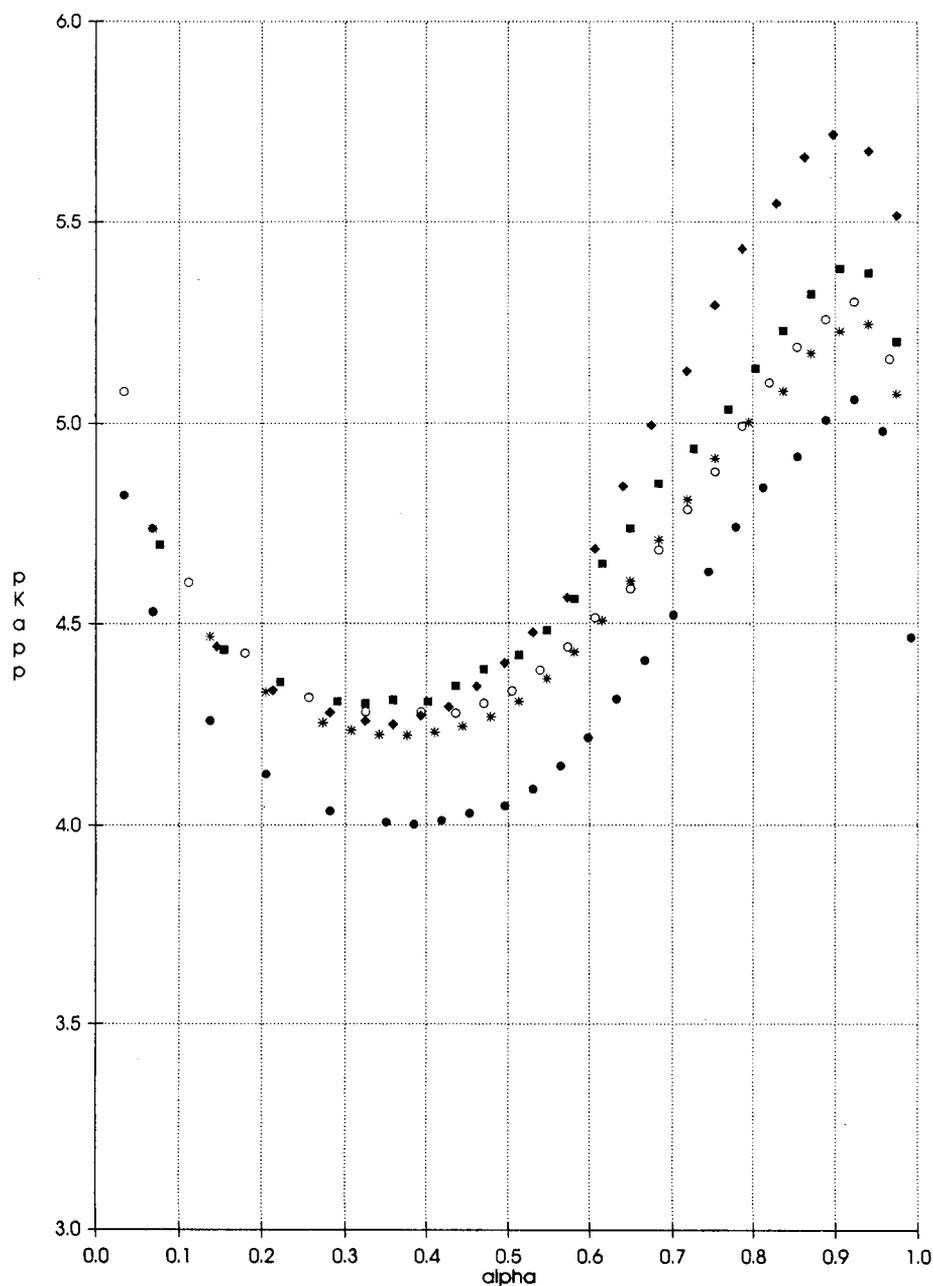


Figure 12.II : Evolution de pK_{app} de la PVAm en fonction de α . Rapports $\beta CD/NH_2$:
 • = 0 ; ■ = 0,05 ; ◆ = 0,5 ; * = 1 ; ○ = 5.

4.3 Interprétation

L'allure générale des courbes de la Figure 12.II est constante : le phénomène classique d'auto-ionisation est d'abord observé (pK_{app} diminue) auquel succède une augmentation régulière de pK_{app} qui est causée tout d'abord par la diminution des

effets répulsifs puis par la stabilisation des groupements ammoniums par les fonctions amines libres (basiques) voisines.

La Figure 12.II nous montre que le pK_{app} de la PVAm seule est inférieur à celui mesuré en présence de β CD, quelque'en soit la proportion, et ceci quelque soit α : le polymère possède donc un caractère plus basique en présence de β CD. La cyclodextrine crée des liaisons hydrogène avec les fonctions amines chargées ou non du polymère, les protons mis en jeu dans celles-ci sont alors moins facilement arrachés à la matrice ce qui fait augmenter le pK_a apparent du polymère.

Bien que notre objectif de démontrer l'existence de liaisons hydrogène semble être atteint, cette étude potentiométrique peut encore être exploitée en tenant compte de l'influence du rapport CD/ NH_2 sur les mesures. La Figure 13.II montre l'évolution du pH mesuré en fonction de α et pour des quantités de cyclodextrine différentes.

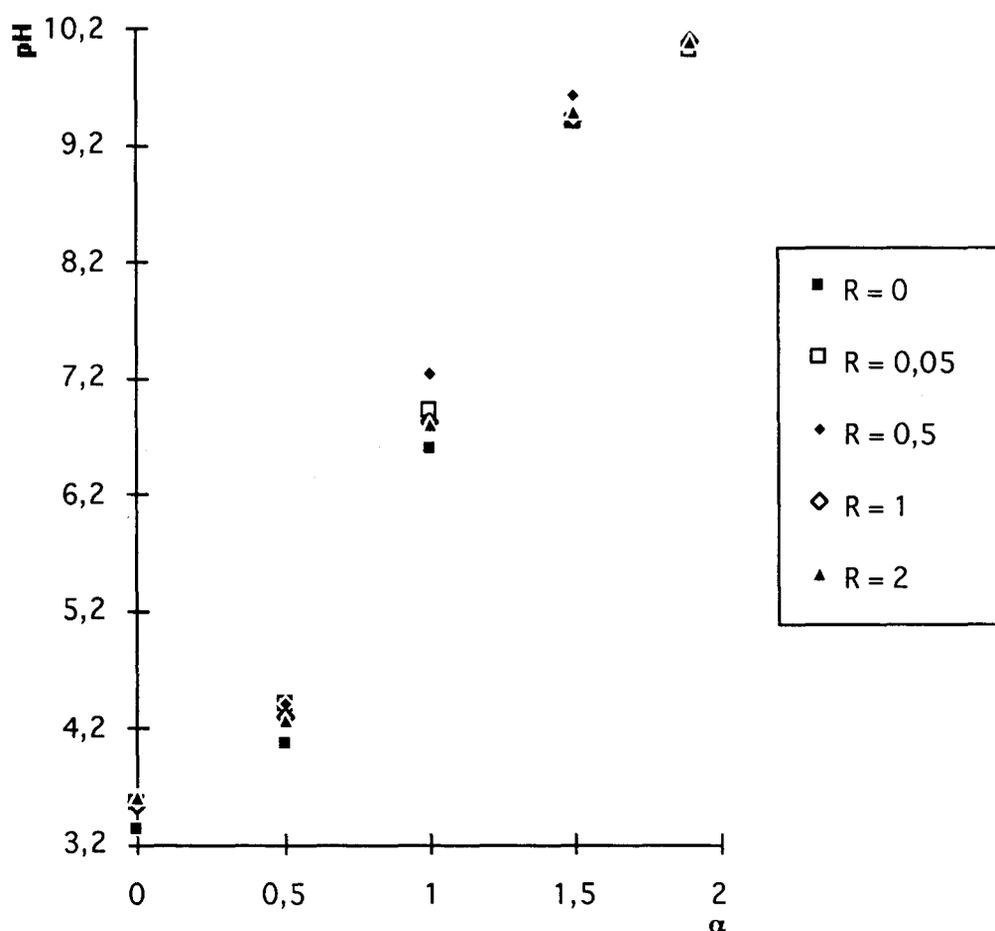


Figure 13.II : Evolution du pH au cours du dosage potentiométrique de la PVAm-HCl pour différents rapports CD/ NH_2 .

La Figure 13.II montre que l'ampleur de l'incidence de la cyclodextrine sur le pH n'est pas en corrélation directe avec sa concentration. En effet, la courbe qui se situe au dessus des autres est celle qui correspond au rapport $R = 0,5$ puis viennent ensuite respectivement les rapports 0,05 puis 1 et 2 qui sont très proches l'un de l'autre tout au long du dosage : on peut considérer que le système est alors saturé en liaisons hydrogène et que l'augmentation de la quantité de cyclodextrine ne peut plus en créer de nouvelles.

Si l'effet de la cyclodextrine est plus visible quand celle-ci est en défaut, cela peut laisser supposer qu'elle forme des liaisons relativement plus stables puisqu'elles font augmenter le pK_{app} plus rapidement. Ce phénomène étant plus accentué lorsque α tend vers 1, le type de liaisons qui se forme est celui pour lequel le polymère est donneur de son doublet libre. Les études viscosimétriques avaient démontré que la PVAm prend une conformation repliée en présence d'un défaut de cyclodextrine mais aussi lorsque la majorité de ses fonctions amines ont été neutralisées, on peut donc concevoir que la cyclodextrine forme dans ces conditions des liaisons hydrogène intrachânes qui sont plus stables que les liaisons interchânes formées quand celle-ci est présente en grande quantité.

D/ CONCLUSION DU CHAPITRE II

Nous venons de mettre en évidence par viscosimétrie puis par potentiométrie qu'il existe des interactions chimiques entre la PVAm et la cyclodextrine en solution ; ces interactions sont capables de modifier les propriétés chimiques (basicité) et conformationnelles de la PVAm.

Le degré de substitution de la PVAm par la β CD dépend des conditions opératoires initiales : rapport des réactifs de départ, durée de la réaction, composition du solvant. Nous avons observé un faible rendement de réaction qui est accompagné d'une modification importante de la conformation des copolymères obtenus.

En dehors de l'accessibilité restreinte ou de la basicité inférieure d'une fonction vinylamine comparée à celle d'une fonction allylamine, les résultats précédents peuvent nous donner certaines explications quant à la faible valeur du DS : d'après les études de viscosité, nous avons observé que la PVAm ainsi que les polymères de la série PVACD prennent une conformation plus ou moins repliée en milieu basique. Or, l'attaque nucléophile des fonctions amines sur le β CD OTs a précisément lieu dans ces conditions qui sont défavorables à la réaction puisque le polymère se replie rapidement sur lui même dès que quelques fonctions amines ont réagi. Le repliement de la chaîne polymère réduit les probabilités de rencontre et de réaction entre les fonctions amines nucléophiles et le β CD OTs, on peut alors parler *d'auto-inhibition* de la réaction.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE II

- 1 A; VILLIERS
Compt. Rend. Acad. PARIS (1891), 112 , 536
- 2 F. SCHARDINGER
Z. Unters. Nahrungs Gembmittel, Gebrauchsgegenstande, (1903), 6 , 865
- 3 F. SCHARDINGER
Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. (1911), 29 , 188
- 4 M. L. BENDER, R. L. VAN ETTEN, G. A. GLOVES, J. F. SEBASTIEN
J. Am. Chem. Soc. (1966), 88 , 2318
- 5 J. SZEJTLI
Cyclodextrin Technology, Kluwer Academic Publ. (1988)
- 6 W. SAENGER
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1980), 19 , 344
- 7 B. DUCHENE
"Cyclodextrins and their Industrial Uses", Editions de Santé (1989)
- 8 Sciences et Avenir (1993), 552 , 76
- 9 W. L. HINZE
Separation and Purification Methods, (1981), 10 , 159
- 10 T. SEO, T. KAJIHARA, T. IJIMA
Makromol. Chem. (1987), 188 , 2071
- 11 S. ONOZUKA, M. KOJIMA, K. HATTORI, F. TODA
Bull. Chem. Soc. Jpn (1980), 53 , 3221
- 12 K. TAKASHI, K. HATTORI, F. TODA
Tetr. Lett. (1984), 25 , 3331
- 13 Y. MATSUI, T. YOKOI, K. MOCHIDA
Chem. Lett., Chem. Soc. Jpn. (1976), 1037
- 14 R. BRESLOW, J. EMERT
J. Am. Chem. Soc. (1975), 97 , 670
- 15 R. BRESLOW, M. F. CZARNIECKI
J. Am. Chem. Soc. (1978), 100 , 7771
- 16 C. CHANG, D. D. MUCCIO, T. ST PIERRE, C. C. CHEN, C. G. OVERBERGER
Macromolecules (1986), 19 , 913

-
- 17 T. SEO, T. KAJIHARA, K. MIWA, T. IIJIMA
Makromol. Chem. (1991), 192 ,2357
- 18 B. SEBILLE, H. THAUD, J. PIQUION, N. BEHAR
J. Chromatogr. (1987), 409 , 61
- 19 R. D. GUTHRIE
"Methods in carbohydrate Chemistry", 1 , 432
- 20 M. VIKMON
Proc. 1st Int. Symp. on cyclodextrins, Budapest, (1982), 69
- 21 C. K. JUE, P. N. LIPKE
J. Biochem. Biophys. Methods (1985), 11 , 109
- 22 Y. KAWAGUCHI, M. TANAKA, M. NAKAE, K. FUNAZO, T. SHONO
Anal. Chem. (1983), 55 , 1852
- 23 E. A. LEWIS, J. BARKLEY, T. S^T PIERRE
Macromolecules (1981), 14 , 546
- 24 P. L. RINALDI, C. YU, G. C. LEVY
Macromolecules (1981), 14 ,551
- 25 Y. MATSUI, T. YOKOI, K. MOCHIDA
Chem. Lett., Chem. Soc. Jpn. (1976), 1037

CHAPITRE III

RAPPELS THEORIQUES SUR LA CINETIQUE ENZYMATIQUE - SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE A PROPOS DES REACTIONS D' ESTEROLYSE

INTRODUCTION

C'est depuis les années 50 que, ayant pour but de reproduire *in vitro* l'action des enzymes, les chercheurs ont tenté de synthétiser des systèmes catalytiques capables d'agir selon le même mécanisme réactionnel bien particulier et ceci avec une réussite assez irrégulière. Comme nous le verrons dans la première partie de ce chapitre, la cinétique enzymatique est soumise à un mécanisme réactionnel à plusieurs étapes dont les deux principaux événements sont : 1) l'étape de fixation du substrat ; 2) l'étape d'hydrolyse ou de coupure de celui-ci. Ainsi, les polymères synthétiques ont du être fonctionnalisés de telle manière qu'ils possèdent à la fois des propriétés complexantes mais aussi réactives vis à vis du substrat à transformer. La cyclodextrine a été très utilisée dans ce domaine car elle possède des qualités qui en font un modèle à la fois facile à obtenir, puisqu'elle est un produit naturel, et en même temps réunit les fonctions de complexant et de site réactif avec une structure moléculaire simple. Celle-ci peut être modifiée à souhait en lui greffant, soit des groupements qui améliorent son pouvoir d'inclusion, soit des groupes fonctionnels accélérant l'attaque du substrat. Enfin, cette étude bibliographique nous permettra de remarquer que l'idée de lier de façon covalente la β -cyclodextrine à une chaîne polymère pour en faire des systèmes catalytiques a été relativement peu exploitée.

A/ LA CINETIQUE ENZYMATIQUE - GENERALITES

I RAPPELS SUR LA CINETIQUE

Avant d'aborder les caractères propres de la catalyse enzymatique, nous devons rappeler les termes et les relations qui permettent de mesurer et d'exprimer la vitesse des réactions chimiques. Les réactions chimiques peuvent être classées en fonction du nombre de molécules qui réagissent entre elles pour former les produits de réaction. Ainsi nous pouvons avoir des réactions *monomoléculaires*, *bimoléculaires*, *trimoléculaires*.

La classification peut aussi être basée sur les caractères cinétiques, d'après l'ordre de la réaction. Ainsi pouvons nous avoir des réactions d'ordre zéro, du premier ordre, du deuxième ordre et du troisième ordre, suivant la nature de la relation entre la vitesse de réaction et la concentration d'un des réactifs dans des conditions données¹.

Les réactions du premier ordre sont celles dont la vitesse est exactement proportionnelle à la concentration d'un réactif. L'exemple le plus simple est celui d'une réaction de type :



La vitesse de disparition de A s'écrit :

$$-d(A)/dt = k(A)$$

Où k est la constante de vitesse du premier ordre dont la dimension est l'inverse du temps c'est à dire s^{-1}

La forme intégrée de cette équation est:

$$\log((A_0)/(A)) = kt/2,303$$

Où (A_0) est la concentration de A au temps 0 et (A) , la concentration au temps t . Le temps de demi réaction s'exprime par la relation :

$$t_{1/2} = 0,693/k$$

Il faut noter que, dans les réactions du premier ordre, le temps de demi réaction est indépendant de la concentration initiale du substrat.

Les réactions de deuxième ordre sont celles dont la vitesse de réaction est proportionnelle au produit des concentrations de deux réactifs différents ou le carré de la concentration d'un seul réactif. Pour une réaction de type :



la vitesse de disparition de A (ou de celle de B) s'exprime sous la forme :

$$-d(\mathbf{A})/dt = k(\mathbf{A})(\mathbf{B})$$

Si la réaction est de la forme :



l'équation de vitesse du deuxième ordre devient :

$$-d(\mathbf{A})/dt = k(\mathbf{A})^2$$

Les constantes de vitesse du 2^{ème} ordre ont pour dimension 1/(concentration X temps) soit M⁻¹s⁻¹. La forme intégrée de l'équation du 2^{ème} ordre s'écrit :

$$t = \frac{2,303}{k(\mathbf{A}_0) - (\mathbf{B}_0)} \log \frac{(\mathbf{B}_0)(\mathbf{A})}{(\mathbf{A}_0)(\mathbf{B})}$$

Où (\mathbf{A}_0) et (\mathbf{B}_0) sont les concentrations initiales et (\mathbf{A}) et (\mathbf{B}) les concentrations au temps t.

Si dans une réaction du deuxième ordre les concentrations des réactifs sont égales entre elles, la demi vie est alors égale à $1/Co.k$ où Co représente la concentration initiale des réactifs et k la constante de vitesse du 2^{ème} ordre. Il est important de noter que la réaction



prise en exemple n'est pas obligatoirement de 2^{ème} ordre dans toutes les circonstances. Dans certaines conditions cette réaction bimoléculaire peut être de premier ordre. Par exemple si la concentration de B est très forte et celle de A très faible, cette réaction devient du premier ordre puisque sa vitesse est proportionnelle à la concentration d'un seul réactif (dans ce cas A). Mais dans ces conditions particulières, la réaction est dite de *pseudo premier ordre* ou de *premier ordre apparent*.

Les réactions du troisième ordre, relativement rares sont celle dont la vitesse est proportionnelle au produit de 3 concentrations.

La vitesse de certaines réactions chimiques est indépendante de la concentration des réactifs : on les appelle réactions d'ordre zéro. Beaucoup de

La vitesse de certaines réactions chimiques est indépendante de la concentration des réactifs : on les appelle réactions d'ordre zéro. Beaucoup de réactions catalysées sont d'ordre zéro vis à vis des réactifs. Dans ces cas, la vitesse de réaction dépend de la concentration en catalyseur ou de divers facteurs autre que la concentration des composés chimiques qui rentrent en réaction. Les vitesses de réaction ne sont pas obligatoirement de premier ou de second ordre; souvent des réactions d'ordre mixtes sont observées dans certaines conditions.

II ENERGIE LIBRE D'ACTIVATION ET EFFETS DES CATALYSEURS

Une réaction chimique telle que $A \longrightarrow P$ se produit lorsqu'une certaine proportion de la population des molécules A possède à un certain moment suffisamment d'énergie pour atteindre un état activé appelé *état de transition*, où la probabilité de créer ou de détruire une liaison chimique pour former le produit P est très grande. Cet état de transition est au sommet de la barrière énergétique séparant les réactifs des produits (Figure 1.III). La vitesse d'une réaction chimique déterminée est proportionnelle à la concentration des molécules ayant atteint cet état de transition. L'énergie libre d'activation $\Delta G^\#$ (le symbole # désigne le processus d'activation) représente la quantité d'énergie nécessaire, à une température donnée, pour amener toutes les molécules d'une mole de substance à l'état de transition, donc au sommet de la barrière d'activation.

Il existe deux méthodes générales pour accélérer la vitesse d'une réaction chimique. En augmentant l'agitation moléculaire et l'énergie thermique, une élévation de température fait passer un plus grand nombre de molécules à l'état de transition et augmente ainsi la vitesse des réactions. La vitesse de nombreuses réactions est doublée pour une élévation thermique de 10°C. Les catalyseurs peuvent également accélérer la vitesse de réaction. Ils se combinent transitoirement avec les réactifs et produisent un état de transition qui possède moins d'énergie libre que celui de la réaction non catalysée. Ainsi ils accélèrent la vitesse de réaction en abaissant l'énergie d'activation. Quand les produits de la réaction sont formés, le catalyseur libre est régénéré.

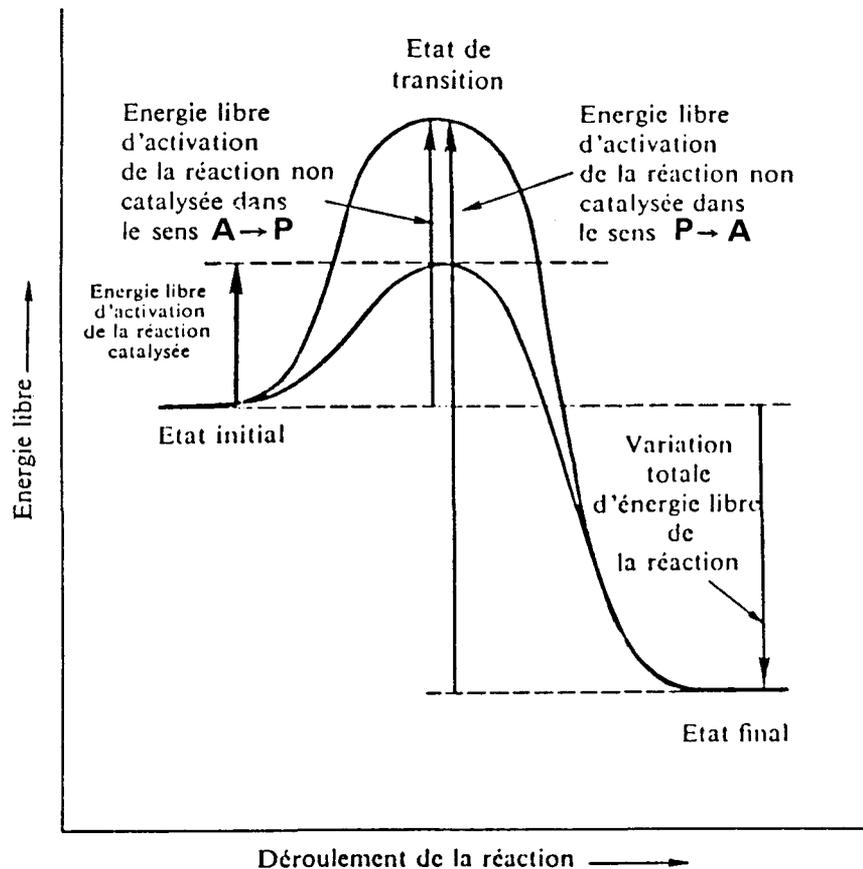


Figure 1.III : Diagramme énergétique d'une réaction chimique, suivant qu'elle est catalysée ou non.

III L'EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN

Les réactions catalysées par des enzymes, si elles suivent les principes généraux de la cinétique chimique, possèdent un caractère particulier, que l'on ne rencontre pas habituellement : c'est le phénomène de *saturation* par le substrat. Sur la Figure 2.III nous voyons les effets de la concentration du substrat sur la vitesse de la réaction enzymatique $A \longrightarrow P$. La vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration du substrat lorsque cette dernière est très basse : la réaction est alors du premier ordre. Lorsque la concentration du substrat augmente, la vitesse ne s'accroît pas dans les mêmes proportions : la réaction est alors d'ordre mixte. Aux fortes concentrations de substrat la vitesse devient constante, indépendante de cette concentration, la réaction est d'ordre zéro : l'enzyme est alors dit saturé par son substrat. Tous les enzymes présentent cet effet de saturation, mais la concentration de substrat qui produit la saturation varie beaucoup d'un enzyme à l'autre. Cet effet de saturation a conduit A. J. BROWN, ainsi que V. HENRI à supposer que la formation réversible entre un enzyme et son substrat constitue une étape essentielle de la réaction catalysée.

En 1913, L. MICHAELIS et M. L. MENTEN ont établi une théorie générale du mécanisme d'action des enzymes et de la cinétique enzymatique. Cette théorie qui fut ensuite développée par G. E. BRIGGS et J. B. S. HALDANE, est fondamentale pour effectuer une analyse quantitative de la cinétique et de l'inhibition enzymatique. Elle est d'une expression particulièrement simple dans le cas de réactions faisant intervenir un seul substrat. La théorie de *Michaelis-Menten* admet que l'enzyme E réagit dans une première étape avec le substrat S pour former un complexe enzyme-substrat ES ; ce dernier se décompose dans une deuxième étape pour régénérer l'enzyme et libérer le produit P :



Ces réactions sont considérées comme réversibles. Les constantes de vitesse aller et retour sont respectivement affectées d'un coefficient positif et d'un coefficient négatif. L'équation de *Michaelis-Menten* est l'équation de vitesse des réactions enzymatiques à un seul substrat. Dans la démonstration de BRIGGS et HALDANE qui suit, **(E)** représente la concentration de l'enzyme libre, **(ES)** la concentration du complexe enzyme-substrat, **(E_T)** la concentration totale d'enzyme (somme des formes libre et liée). **(S)** représente la concentration de substrat qui est souvent beaucoup plus grande que celle de **(E)** (notons que c'est l'inverse pour les réactions catalysées par la cyclodextrine, pour des raisons que nous exposerons plus loin) de telle sorte que la quantité de S liée à E, à un moment quelconque est négligeable devant la concentration totale de S.

Le but de cette démonstration est de définir une expression générale pour v_0 (vitesse initiale de la réaction enzymatique), en admettant que les réactions enzymatiques se déroulent en deux étapes, celles qui ont été décrites dans les réactions (1) et (2). La vitesse initiale est égale à la vitesse de disparition du complexe ES d'après la réaction (2) qui peut être définie par une équation du premier ordre :

$$v_0 = k_2 \text{(ES)} \quad (3)$$

Cependant ni k_2 ni ES ne pouvant être déterminés directement, nous devons trouver pour v_0 une autre expression utilisant d'autres variables plus accessibles à la mesure. Pour ce faire, nous allons exprimer la formation de ES à partir de E et de S

(réaction(1)) par l'équation de vitesse du second ordre suivante où k_{+1} représente la constante de vitesse du second ordre

$$d(\text{ES})/dt = k_{+1} ((\text{E}_T) - (\text{ES})) (\text{S}) \quad (4)$$

Bien que ES puisse aussi être formé à partir de E et de P par réversibilité de l'équation (2), la vitesse de cette réaction de retour peut être négligée car nous nous occupons des étapes initiales de la réaction aller, au moment où (S) est très grand et P nul ou presque nul.

La vitesse de disparition du complexe ES résulte de la somme de 2 réactions : celle qui forme le produit (direction aller) et celle qui fournit E + S (direction retour de l'équation (1)). L'équation en est la suivante :

$$- d(\text{ES})/dt = k_{-1}(\text{ES}) + k_2(\text{ES}) \quad (5)$$

Lorsque la vitesse de formation de ES est égale à la vitesse de disparition, le système atteint l'état stationnaire défini comme l'état dans la concentration de ES reste constante ; dans ces conditions :

$$k_{+1}((\text{E}_T) - (\text{ES}))(\text{S}) = k_{-1}(\text{ES}) + k_2(\text{ES}) \quad (6)$$

La Figure 2.III illustre l'évolution en fonction du temps des différentes espèces chimiques qui participent à la réaction.

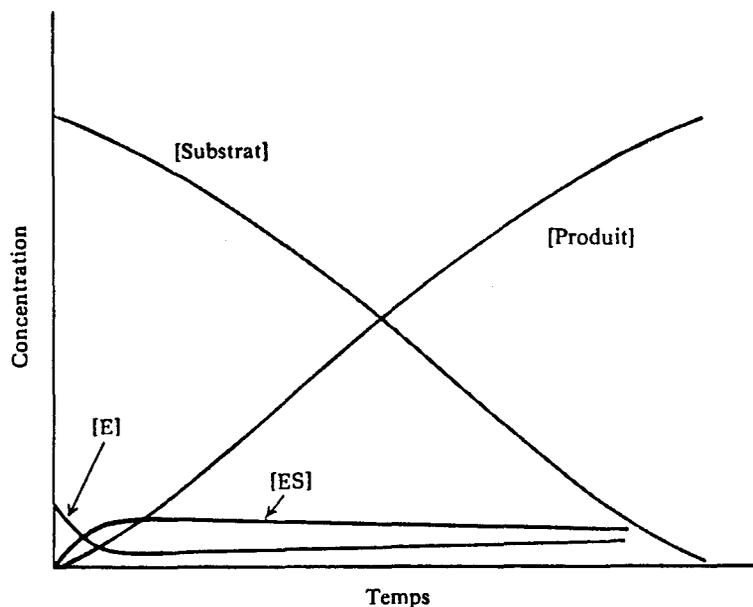


Figure 2.III : Evolution avec le temps de la formation d'un complexe enzyme/substrat et établissement de l'état stationnaire.

Après transformation de l'équation (6), nous pouvons écrire :

$$\frac{(S)(E_T) - (ES)}{(ES)} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{+1}} = K_m \quad (7)$$

Cette constante globale K_m qui remplace le terme $(k_{-1} + k_2)/k_{+1}$ est appelée *constante de Michaelis-Menten*

La concentration de ES à l'état stationnaire peut être déduite de cette équation :

$$(ES) = \frac{(E_T)(S)}{K_m + (S)} \quad (8)$$

Nous avons vu précédemment que la vitesse initiale v_0 d'une réaction enzymatique est :

$$v_0 = k_2 (ES) \quad (3)$$

Nous pouvons maintenant remplacer dans l'équation (3), le terme ES par son expression trouvée dans l'équation (8) :

$$v_0 = \frac{k_2(E_T)(S)}{K_m + (S)} \quad (9)$$

Quand la concentration de substrat est si haute que pratiquement tout l'enzyme du système est présent sous forme de complexe ES, c'est à dire quand l'enzyme est saturé, la vitesse initiale V_{max} est atteinte :

$$V_{max} = k_2 (E_T) \quad (10)$$

Où (E_T) est la concentration totale d'enzyme. Ainsi (9) devient :

$$v_0 = \frac{V_{max} (S)}{K_m + (S)} \quad (11)$$

C'est l'équation de *Michaelis-Menten* : équation de vitesse pour une réaction enzymatique à un substrat. La constante de Michaelis-Menten permet, grâce à cette équation, de relier la vitesse initiale à la vitesse maximale et à la concentration initiale en substrat. Il est important de noter que dans l'équation de *Michaelis-Menten*, la concentration d'enzyme n'apparaît pas mais elle est contenue dans l'expression de la V_{max} égale à $k_2(E_T)$.

Une relation importante peut être déduite de l'équation de *Michaelis-Menten* dans le cas particulier où $v_0 = 1/2 V_{\max}$ (Figure 3.III) . Nous obtenons alors :

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max}(S)}{K_m + (S)}$$

En divisant par V_{\max} , on obtient :

$$1/2 = \frac{(S)}{K_m + (S)}$$

D'où l'on déduit :

$$K_m + (S) = 2(S)$$

$$K_m = (S)$$

Nous pouvons donc conclure que K_m est égal à la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de la réaction est la moitié de la vitesse maximum

Pour les réactions à un substrat, K_m a les dimensions d'une concentration (mol/l) et ne dépend pas de la concentration d'enzyme.

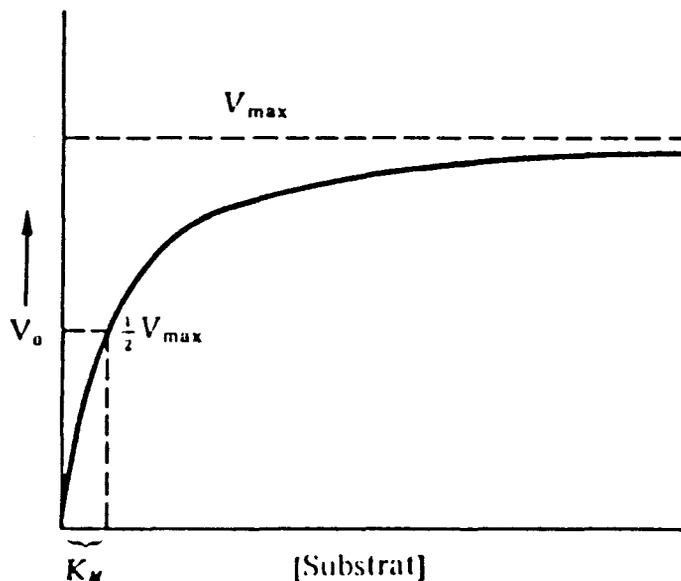


Figure 3.III : Effet de la concentration de substrat sur la vitesse de réaction enzymatique.

IV TRANSFORMATIONS DE L'EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN

L'équation de *Michaelis-Menten* (équation(11)) peut être transformée algébriquement en d'autres relations d'une utilisation plus aisée pour l'exploitation des résultats expérimentaux. L'une des transformations les plus utilisées consiste simplement à prendre l'inverse de l'équation (11) :

$$1/v_0 = \frac{K_m + (S)}{V_{\max}(S)}$$

en effectuant la division :

$$1/v_0 = \frac{K_m}{V_{\max}(S)} + \frac{(S)}{V_{\max}(S)}$$

qui se simplifie en :

$$1/v_0 = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{(S)} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (12)$$

L'équation (12) est la relation de *Lineweaver-Burk*, qui est représentée par une ligne droite de pente K_m/V_{\max} et d'ordonnée à l'origine $1/V_{\max}$ (Figure 4.III). Cette droite est obtenue en reportant $1/v_0$ en fonction de $1/(S)$. Cette représentation en "double inverse" est intéressante dans la mesure où elle permet de connaître simultanément V_{\max} (donc k_2), et K_m .

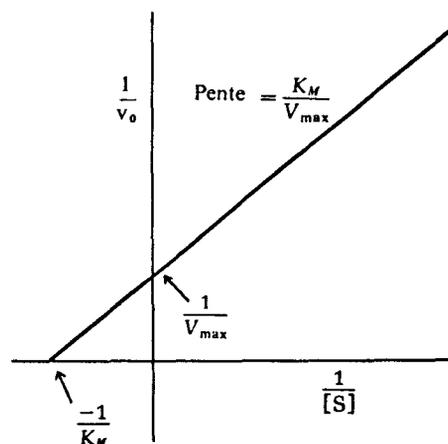
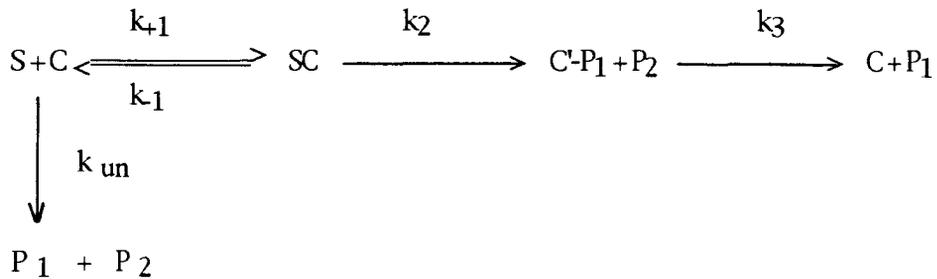


Figure 4.III : Représentation de Lineweaver-Burk (en double inverse).

En pratique, pour les réactions catalysées par la cyclodextrine, le mécanisme est légèrement différent de celui que nous venons d'étudier puisqu'elles se déroulent de la façon suivante :



Nous constatons que la seconde étape ne régénère pas la cyclodextrine de départ mais une cyclodextrine acétylée. Nous verrons dans la partie suivante que l'étape de désacétylation est lente (k_3 est faible), c'est pourquoi pour remédier à cet inconvénient qui fait de la cyclodextrine un "faux enzyme", on travaille en excès de CD par rapport au substrat. De cette manière, ni K_m ni k_2 ne sont affectées. C'est pourquoi l'équation de *Lineweaver-Burk* a été modifiée pour donner les relations qui suivent :

$$\frac{1}{(k_{obs} - k_{un})} = \frac{K_m}{(k_2 - k_{un})(CD)_0} + \frac{1}{(k_2 - k_{un})} \quad (13)$$

Ceci est la relation utilisée par BENDER ET KOMIYAMA² ainsi que HARADA³. Par contre, SEO⁴ propose la formule suivante :

$$\frac{1}{(k_{obs} - k_{un})} = \frac{K_m}{k_2 (CD)_0} + \frac{1}{k_2} \quad (14)$$

Dans ces équations, k_{un} est la valeur de k_{obs} pour une réaction non catalysée. $(CD)_0$ est la concentration initiale en cyclodextrine.

B/ ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE CONCERNANT LES RÉACTIONS D'ESTEROLYSE CATALYSEES PAR LA CYCLODEXTRINE ET DIVERS POLYMERES FONCTIONNELS

La coupure enzymatique d'esters est une réaction courante dans les organismes vivants, en effet des substances sont stockées sous leur forme esterifiées et sont activées au moment de leur intervention par esterolyse enzymatique. L'action de ces enzymes naturelles a été étudiée *in vitro* avec des systèmes simplifiés qui reproduisent ce phénomène de façon assez fidèle .

Le but de cette partie bibliographique consiste à faire une synthèse des travaux effectués dans ce domaine depuis les premières études en cinétique enzymatique qui datent des années 50, époque à laquelle on découvrait la complexité de la structure des enzymes et de leur mécanisme d'action jusqu'à aujourd'hui.

Nous verrons l'opportunité du choix du type de substrat choisi pour ces études, et nous verrons ensuite la diversité des modèles enzymatiques qui ont été conçus, synthétisés et étudiés : les cyclodextrines et leurs dérivés, les polymères hydrosolubles fonctionnalisés, les systèmes réunissant ces derniers soit par simple mélange, soit par association covalente.

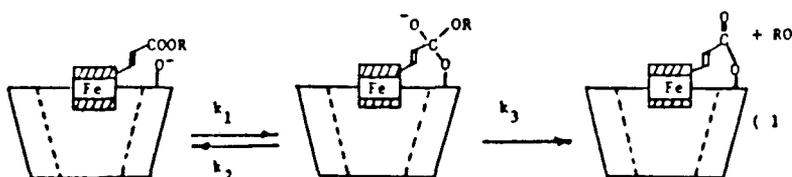
I LES ESTERS DE NITROPHENOL

La conception et la synthèse d'enzymes artificielles modélisant l'action de la Chymotrypsine ont été étudiées à travers le monde et entre autres à Strasbourg (LEHN et al.⁵), New York (BRESLOW et al.⁶), Los Angeles (CRAM et al.⁷), Evanston (HERSCHFIELD et al.⁸), Fukuoka (MURAKAMI et al.⁹, KUNITAKE et al.¹⁰) et Atlanta (MENGER et al.¹¹). Bien que cet enzyme ne soit pas de la catégorie des estérases (elle hydrolyse des fonctions amides), les substrats utilisés sont des esters de nitrophényl. Bien qu'il n'y ait pas de raison fondamentale empêchant l'utilisation de substrats naturels dans les conditions expérimentales utilisées en laboratoire (BENDER et al.¹²), les esters dits activés sont préférés aux amides, qui sont des substrats naturels de ces enzymes : même si celles-ci sont beaucoup moins réactives, elles ne devraient pas apporter de problème majeur puisque les réactions en jeu subissent une accélération enzymatique.

Le premier avantage apporté par les esters de nitrophényl est que leur décomposition peut être facilement suivie par spectrophotométrie, les nitrophénolates absorbant dans le visible, autour de 400 nm.

MENGER et LADIKA¹³ avancent que la réactivité élevée de ces substrats artificiels est liée au faible pKa du groupe partant qui est occasionné par l'effet mésomère attracteur du groupement nitro : l'accélération devient importante dès que le pKa de la partie alcool est inférieur à 9. La vitesse de réaction du ferrocenylacrylate de p-nitrophényl (pKa = 7,2) catalysée par la β -CD est $3,3 \cdot 10^5$ fois supérieure à celle d'un ester d'éthyle (pKa = 15,9) (voir Tableau 1.III).

L'étape déterminante de la réaction est l'attaque d'un hydroxyle secondaire de la CD qui conduit à un intermédiaire tétraédrique (équation suivante) qui est suivi par le départ de l'alcoolate (trans-esterification). Ceci ne peut se produire que si la différence de pKa entre l'alcoolate partant et les OH de la cyclodextrine est suffisante. Ainsi VAN ETTEN et al.¹⁴ rapportent qu'une accélération devient significative lorsque cette différence est supérieure à 3 unités de pKa ; dans le cas contraire, l'intermédiaire tétraédrique a tendance à redonner les produits de départ.



Enfin, il faut également tenir compte de la distance entre la fonction carbonyle et la fonction hydroxyle dans le complexe; celle ci est la même pour tous les esters. Cependant la "distance critique"¹⁵ est inférieure pour les esters non activés. C'est pourquoi le complexe est productif avec les esters de p-nitrophényl et ne l'est pas avec des esters d'alkyle.

R	pKa de ROH	$10^8 k_{un} s^{-1}$	$t_{1/2}$	$k_{complexe} / k_{un}$
éthyle	15,9	0,5	>2ans	< 2
benzyle	15,2	0,7	>1an	< 2
p-nitrobenzyle	14,6	0,9	>1an	< 2
phényl	9,9	7,9	18h	140
m-chlorophényl	9,1	12	3,9min	$0,26 \cdot 10^5$
p-cyanophényl	8,0	20	37s	$0,95 \cdot 10^5$
p-nitrophényl	7,2	28	7,4s	$3,3 \cdot 10^5$

Tableau 1.III : constantes de vitesses pour l'hydrolyse de ferrocenylacrylates ($FCH=CHCOOR$) accélérée par la β -cyclodextrine ($k_{complexe}$) ou non catalysée (k_{un}).
Référence 13

II ACTIVITE CATALYTIQUE DE LA CYCLODEXTRINE

1 Mécanisme de la réaction

Les réactions catalysées par la cyclodextrine sont de type enzymatique, les étapes se décomposent de la façon suivante : dans un premier temps intervient l'inclusion du substrat (complexe CD/S) puis l'attaque des fonctions hydroxyles sur la fonction ester^{16,17,18} (transesterification) suivie de l'étape de décomplexation (CD'+P) et enfin la régénération de la cyclodextrine (CD). Ceci est représenté dans la Figure 5.III ¹⁹ :

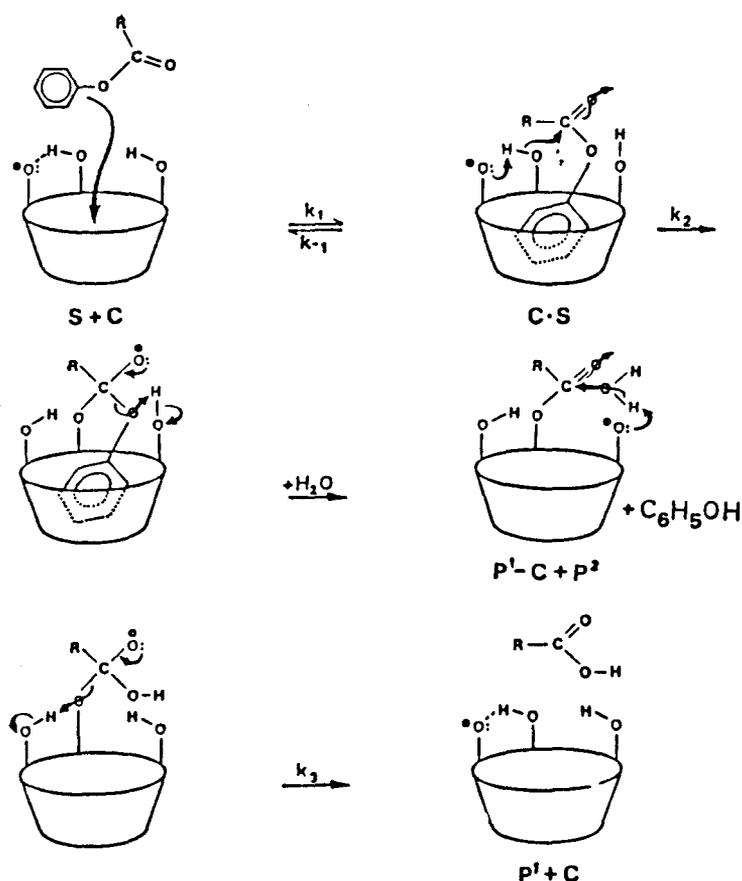


Figure 5.III : Représentation schématique de l'hydrolyse de l'acétate de phényl (S) en acide acétique (P') et en phénol (P²) par la cyclodextrine.

Les acétates de phényl sont hydrolysés le plus efficacement en présence de cyclodextrine à pH=11²⁰ ; ceci indique que le substrat subit l'attaque nucléophile des hydroxyles secondaires qui jouent le rôle de sites actifs. Le pKa de ces fonctions hydroxyles étonnamment bas (12,2) est dû à la stabilisation des charges négatives par effet inductif et par liaisons hydrogène entre les O(2)H et O(3)H voisins. La constante de vitesse pour l'hydrolyse de l'acétate de m-t-butylphényl est 3,2 fois

supérieure à celle mesurée dans D₂O, ceci est attribué à la différence de pKa de la CD dans ces 2 solvants²¹. Il a été démontré que les OH primaires (O(6)H) ne sont pas impliqués dans la réaction par l'utilisation de βCD méthylée dans cette position²², de même que la perméthylation de l'αCD provoque une légère inhibition de la réaction²³.

BENDER et KOMIYAMA²⁰ ont nuancé le concept de catalyseur à propos de la cyclodextrine en évoquant le fait que l'étape de désacétylation de la CD (k₃) est très lente ; ainsi on peut isoler les intermédiaires benzoate, acétate ou trans-cinnamate²⁴ de cyclodextrine. BENDER²⁵ a démontré le mécanisme intramoléculaire de la coupure de l'ester de CD qui fait intervenir une fonction hydroxyle déprotonnée. Le fait que cette étape qui régénère la cyclodextrine soit lente permet de conclure que la CD n'est pas un vrai catalyseur.

Une conséquence de ceci est que l'on travaille en général avec un excès de catalyseur par rapport au substrat.

De nombreux essais ont été tentés pour améliorer l'efficacité de la CD afin d'approcher le plus possible les résultats d'enzymes naturelles (la chymotrypsine est souvent prise comme référence) en greffant des groupes fonctionnels de façon covalente ou non covalente sur la CD. Ceci sera développé plus loin, dans le paragraphe concernant les cyclodextrines modifiées.

2 Compatibilité substrat / cavité

La cavité et les fonctions hydroxyles de la cyclodextrine ont pour fonctions respectives d'encapsuler et d'attaquer le substrat. Si la fonction ester (centre actif) se trouve à l'intérieur de la cavité, la vitesse d'hydrolyse va diminuer ; lorsque celle-ci se trouvera à proximité des fonctions hydroxyles, au bord de la cavité, la réaction sera accélérée²⁶. C'est pourquoi l'effet catalytique de la CD dépendra de la structure de la molécule encapsulée et de son degré de pénétration dans la cavité (voir Tableau 2.III).

Substrat	k_{OH} $\times 10^4 \text{ s}^{-1}$	k_2 $\times 10^2 \text{ s}^{-1}$	k_2/k_{OH}	K_d $\times 10^2 \text{ M}$
Phényl	8,04	2,19	27	22
o-Toluyl	3,8	0,72	19	1,9
m-Toluyl	6,96	6,58	95	1,7
p-Toluyl	6,64	0,22	3,3	1,1
m-t-Butyl Ph	4,9	12,9	260	0,2
p-t-Butyl Ph	6,07	0,067	1,1	0,65
m-Nitro Ph	46,4	42,5	300	1,9
p-Nitro Ph	69,4	2,43	3,4	1,2
m-Carboxy Ph	8,15	5,55	68	10,5
p-Carboxy Ph	12,5	0,67	5,3	15,0

Tableau 2.III : Valeurs de k_{OH} , k_2 , K_d pour le clivage d'acétates de phényl accéléré par l' α -cyclodextrine. Référence 20

k_{OH} : constante de vitesse de l'hydrolyse catalysée par OH^-

k_2 : constante de vitesse de l'hydrolyse catalysée par la CD

K_d : constante de dissociation du complexe CD/Substrat

pH=10,6, T°=25°C, I=0,02

Les fonctions hydroxyles secondaires de la cyclodextrine ont une mobilité restreinte par rapport aux fonctions hydroxyles primaires qui se trouvent sur l'autre bord de la cavité, cette libre rotation crée une gêne stérique qui empêche le substrat de pénétrer à l'intérieur par ce côté. Ainsi, la cavité de la cyclodextrine n'est pas cylindrique mais conique, avec les hydroxyles secondaires du côté le plus large. Ceci explique que le sens par lequel le substrat aborde la cavité est un facteur déterminant. BENDER²⁷ a démontré que si l'acétate de m-t-Butylphenyl pénètre à l'intérieur de la cavité par le côté des hydroxyles secondaires, avec le groupement t-Butyl en avant, la fonction ester sera à proximité de celles-ci, ce qui facilitera son hydrolyse.

D'autre part, si la molécule pénètre dans la cavité en ayant le groupement acétate en avant, la majeure partie du noyau aromatique et le substituant t-Butyl résideront à l'intérieur de celle-ci. Dans ce cas la partie ester est partiellement protégée de l'attaque des OH^- de la solution. C'est pourquoi, par exemple, l'hydrolyse du p-amino benzoate d'éthyle est inhibée par la β CD tandis que les acétates de t-Butylphenyl subissent une accélération de leur vitesse d'hydrolyse de 240 fois par

l' α CD et seulement 1,7 fois par la γ CD²⁸. La cavité de la γ -Cyclodextrine est si large que le groupe t-Butyl de l'isomère para est complètement inclus à l'intérieur de celle-ci. La partie ester dont la rotation est libre, peut s'orienter vers les hydroxyles secondaires, ce qui est impossible dans la cavité de l' α CD.



Figure 6.III : L'hydrolyse de l'acétate de m-t-butylphényl est a) accélérée ; b) inhibée.

L'hydrolyse du PNPA à pH = 7,5 est accélérée d'un facteur 2-3 par l' α CD ; le facteur d'accélération relatif à la β CD est de 5. L'inclusion de l'ester dans la cavité est telle que l'axe de la molécule coïncide avec l'axe de la cyclodextrine. La fonction ester est orientée de façon défavorable par rapport aux fonctions hydroxyles de la CD. Dans la β CD le substrat peut venir plus près des hydroxyles, mais sa mobilité est plus grande que dans l' α CD c'est pourquoi l'effet catalytique augmente modérément²⁹.

L'hydrolyse du MNPA est accélérée environ 70 fois par l' α -cyclodextrine : la fonction acétate se trouvant sur le bord de la CD celle-ci se trouve en contact étroit avec les hydroxyles comme le montre la Figure 7.III. Le cycle formé par la β CD étant plus large, le substrat n'est pas inclus de façon aussi intime et le facteur d'accélération n'est que de 20.

La constante de stabilité d'un complexe d'inclusion dépend de l'intensité des interactions hydrophobes qui lient le substrat à la molécule-hôte. Ainsi, comme nous l'avons vu dans la partie sur la présentation de la cyclodextrine, les substrats de petite taille seront mieux complexés par l' α CD, les substrats de taille moyenne par la β CD et les substrats très encombrants par la γ CD. L'activité catalytique étant liée à la fois à la stabilité du complexe et à la proximité de la fonction ester par rapport aux hydroxyles, il faut donc préalablement choisir le couple qui offre la meilleure complémentarité spatiale.

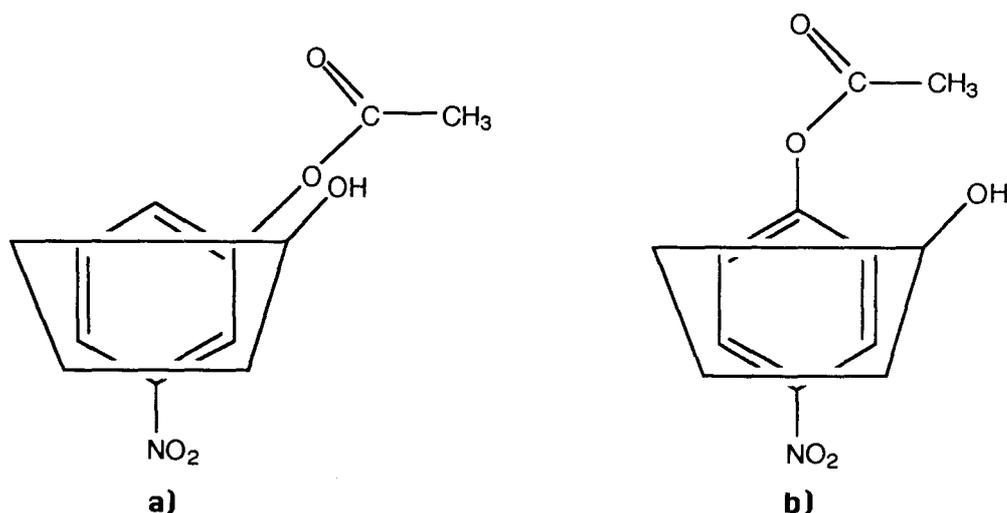


Figure 7.III : complexes de la cyclodextrine avec a) le MNPA ; b) le PNPA.

3 Effet stéréo-sélectif de la cyclodextrine

On a constaté que la proximité de la fonction ester par rapport à la fonction hydroxyle de la CD est déterminante. Comme on le voit sur la Figure 7.III, la fonction ester de l'isomère méta de l'acétate de nitrophénol est dans une position favorable à l'attaque nucléophile comparée à celle de l'isomère para⁴ ainsi, l'hydrolyse du MNPA est plus rapide que celle du PNPA en présence de β CD alors que le contraire est observé pour une réaction non catalysée. BENDER³⁰, dans une étude sur les stéréoisomères d'esters de nitrophénol de la phénylalanine rapporte que l'hydrolyse de l'isomère méta est activée tandis que celle de l'isomère para est inhibée en présence de β CD.

Cet exemple illustre un premier type de sélectivité, distinguant différents isomères. D'autre part la présence d'un carbone asymétrique dans la partie ester provoque également une différenciation de la réactivité des stéréoisomères bien que la partie chirale ne soit pas incluse à l'intérieur de la cavité.

L'étude de l'hydrolyse stéréosélective par la cyclodextrine des esters de nitrophénol *m* et *p* de la N-métoxycarbonyl-D et L-phénylalanine accomplie par IHARA³¹ confirme la réactivité supérieure des isomères méta et rapporte que les constantes de vitesses du pseudo premier ordre sont supérieures pour les stéréoisomères L, mettant ainsi en évidence l'énantiosélectivité de la réaction³². L'origine du phénomène proposée par IHARA est que, bien que les isomères D et L soient inclus identiquement dans la cavité de la cyclodextrine, la complexation de l'isomère D impose une orientation de l'ester défavorable à l'attaque de l'hydroxyle de la CD. BENDER et KOMIYAMA³³ ont découvert un effet stéréosélectif bien plus important pour le clivage d'organophosphates et ont attribué ceci au fait que la

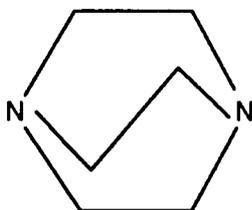
réaction a lieu directement sur le centre asymétrique tandis que le clivage des esters se fait sur la fonction carbonyle, adjacente au centre chiral.

III AMÉLIORATION DES PROPRIÉTÉS CATALYTIQUES DE LA CYCLODEXTRINE PAR MODIFICATION COVALENTE ET NON COVALENTE

1 Accélération de l'étape de désacétylation

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la lenteur de l'étape de coupure de l'ester de CD qui intervient en dernier lieu dans le mécanisme d'esterolyse d'esters de nitrophénol est une condition qui implique que la CD ne peut être considérée comme un vrai catalyseur. Pour accélérer cette étape, l'addition d'amines dans le milieu, agissant comme nucléophile, a été étudiée.

Il a été montré que le 1,4 diazabicyclo(2,2,2)octane (composé (1)), la triéthylamine, la quinuclidine, la pipéridine, la n-butylamine², la 6-nitrobenzimidazole et la 5-nitrobenzimidazole accélèrent l'hydrolyse du trans-cinnamate d' α et β -cyclodextrine et de l'acétate d' α -cyclodextrine (voir Tableau 3.III). La catalyse par ces amines s'accomplit par l'intermédiaire d'un complexe d'inclusion avec l'ester de CD. Il n'y a pas de corrélation entre l'activité catalytique de l'amine et la constante de formation du complexe ni de relation linéaire avec le pKa de l'amine. La géométrie du complexe d'inclusion entre l'acétyl-cyclodextrine et l'amine doit influencer le processus catalytique. L'activité constatée avec (1) peut être attribuée à la présence de 2 centres basiques qui augmente le facteur de fréquence pour la réaction.



1,4-diazabicyclo(2,2,2)octane
composé (1)

Ester de CD	Catalyseur	k_c/k_{un}	$K_d (10^2 M)$	pKa amine
β -CD-trans-cinnamate	composé (1)	6,7	12	8,19
	triéthylamine	24	38	10,78
	quinuclidine	4,7	92	10,95
	piperidine	3,3	94	11,28
	n-butylamine	5,0	43	10,28
	diisobutylamine	0,0		10,91
	6-nitrobenzimidazole	1,93	2,64	
	5-nitrobenzimidazole	1,68	1,63	
α -CD-trans-cinnamate	composé (1)	3,6	35	8,19
	6-nitrobenzimidazole	2,02	2,09	
α -CD-acétate	6-nitrobenzimidazole	3,40		

Tableau 3.III : Accélération de l'hydrolyse d'esters de cyclodextrines par plusieurs amines. Référence 33 page 66.

En présence de (1), la CD peut être considérée comme un véritable catalyseur, puisque la constante de vitesse de l'étape de coupure de l'ester de CD qui est déterminante pour la cinétique est supérieure à celle de l'hydrolyse alcaline du substrat.

2 Cyclodextrines modifiées

La multitude de fonctions hydroxyles présentes sur la CD permet d'y greffer des groupements fonctionnels variés qui améliorent leurs propriétés catalytiques qui atteignent alors les performances d'enzymes naturelles.

2.1 Cyclodextrines supports de fonctions aminées

Ainsi, le fait de greffer une ou plusieurs fonctions imidazoles sur la CD aurait dû conférer à ces systèmes des propriétés proches de celles des sérines protéases^{34,35,36,37}. Les premiers essais réalisés par CRAMER et MACKENSEN^{38,39} n'ont pas apporté les résultats attendus à cause du greffage des groupements imidazole sur les hydroxyles primaires de la CD, maintenant celles-ci à une distance trop importante de la fonction ester du substrat qui est immobilisée de l'autre côté de la cavité. IWAKURA⁴⁰ a greffé l'histamine sur les OH secondaires et a obtenu une vitesse d'hydrolyse du PNPA 80 fois supérieure à celle observée avec l' α CD et 6,3 fois par rapport au mélange α CD/histamine. De plus, cette modification procure une activité catalytique à pH neutre, alors que la cyclodextrine non modifiée n'agit qu'à pH basique (voir Tableau 4.III).

L'imidazole jouant le rôle de site actif et la cavité celui de site de fixation, ces systèmes ont des propriétés catalytiques comparables à celles d'enzymes naturelles telles que l' α -chymotrypsine, la trypsine ou l'élastase.

Catalyseur	Constante de vitesse $\times 10^4 \text{ s}^{-1}$
aucun	0,789
α CD	1,27
Histamine	12,1
α CD+Histamine (mélange 1:1)	16,0
α CD-Histamine	101

Tableau 4.III : Constantes du pseudo 1^{er} ordre pour le clivage du PNPA en présence de catalyseurs. pH = 8,37, 25°C, I=0,02M ; Référence 40.

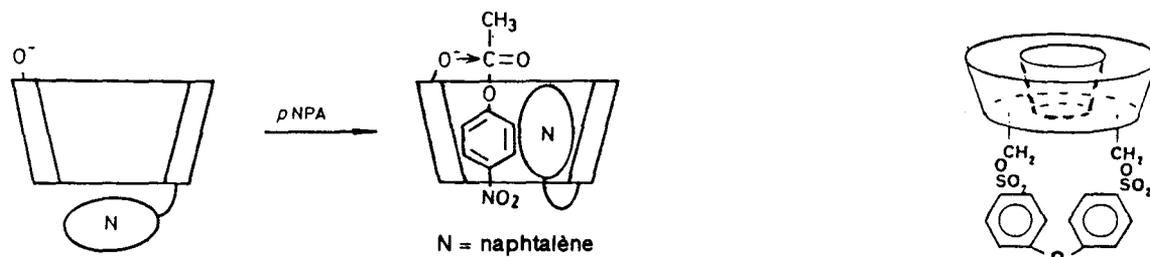
la formation de complexes 2:1 entre le Cuivre II et la mono-(6- β -aminoethylamino-6-déoxy)- β -cyclodextrine accélère l'oxydation de la Furoïne⁴¹ et le clivage du PNPA ou du PNPB⁴² grâce à la présence de 2 sites de liaison rapprochés capables de complexer le substrat coopérativement (voir schéma suivant).

2.2 Autres types de modifications

On peut également avoir une accélération de l'effet catalytique par le greffage de fonctions qui n'interviennent pas directement en tant que catalyseurs mais agissent plutôt dans l'étape de fixation du substrat en modifiant la polarité de la cavité et la géométrie du complexe.

BRESLOW^{43,44} a synthétisé une cyclodextrine avec un fond rigide (voir figure suivante) qui apporte un caractère apolaire autorisant le substrat à pénétrer plus profondément à l'intérieur de la cavité.

D'autres modifications de ce type ont été réalisées avec des substituants pendants qui peuvent entrer dans la cavité même et qui, associées au substrat, induisent une rigidité et une stabilité accrues au complexe⁴⁵ (voir dessin suivant).



Enfin, MATSUI⁴⁶ a amélioré la stabilité avec divers substrats chargés en introduisant une charge positive sur la CD : les résultats obtenus pour le clivage de l'acide p-acétoxybenzoïque sont différents de ceux obtenus avec la β CD. A pH basique, le substrat forme un complexe d'inclusion classique stabilisé par les interactions électrostatiques de la fonction acide déprotonnée et le groupement amine quaternaire du carbonate de (triméthylamino-6-déoxy) β -cyclodextrine. Le cumul des interactions hydrophobes et électrostatiques provoque une accélération de l'hydrolyse de l'isomère méta, ne modifie guère celle de l'isomère para et ralentit celle de l'ortho par rapport à la cyclodextrine non modifiée (voir Figure 8.III).

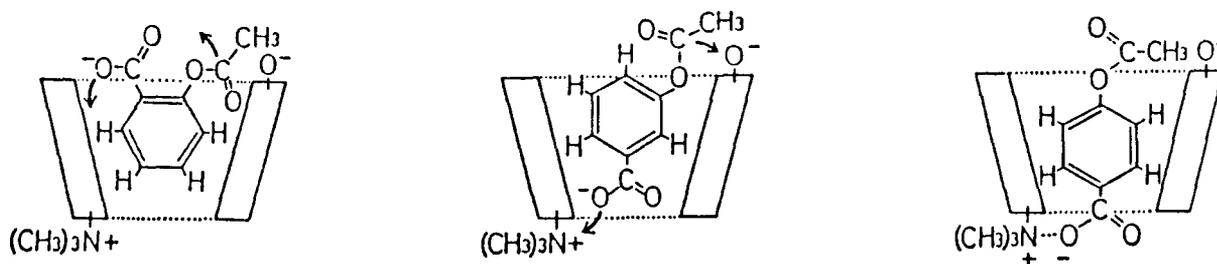


Figure 8.III : Géométries des complexes des isomères o, m, p de l'acide acétoxybenzoïque inclus dans la triméthylamino-6-déoxy) β -cyclodextrine.

IV ACTIVITÉ CATALYTIQUE DES POLYMERES EN PHASE HOMOGENE

1 Mise en évidence de phénomènes coopératifs

C'est vers la fin des années 50 que la structure macromoléculaire complexe des enzymes naturelles fut modélisée et que l'action catalytique de celles-ci fut reproduite *in vitro*.

La synthèse d'enzymes artificiels a respecté les caractéristiques principales des enzymes naturels : le squelette fut élaboré par polymérisation vinylique, ceci apportant le caractère macromoléculaire ; les sites actifs des acides aminés étant directement greffés sur cette chaîne carbonée. Ainsi l' α -chymotrypsine dont le site actif comporte le groupement imidazole de l'histidine et la fonction hydroxyle de la sérine a été modélisée par la copolymérisation de 4(5)-vinylimidazole et d'alcool vinylique⁴⁷.

L'imidazole a par ailleurs été impliquée dans le site actif de plusieurs enzymes esterolytiques au cours d'études chimiques et cinétiques. C'est son caractère ampholyte (2 sites de protonation) qui lui donne ses propriétés : dans l'acétylcholinestérase⁴⁸ et la β -galactosidase⁴⁹ le groupement basique est apporté par la fonction imidazole. Cependant, dans l' α -amylase, l'imidazole fournit le caractère acide du site actif. La ribonucléase combine l'action de 2 fonctions imidazole protonnées à des degrés différents. Ce riche éventail de modes de réactions de l'imidazole a inspiré de nombreux travaux de OVERBERGER^{47,50,51,52,53,54,55,56,57,58}, KUNITAKE et al.^{59,60}, SMETS et al.⁶¹ et KOLTZ⁶².

D'une manière générale, on constate que l'activité esterolytique des monomères est très inférieure à celle du polymère ou copolymère correspondant. Le rôle de la macromolécule est de former un environnement qui concentre les fonctions intervenantes dont la combinaison est favorable à la complexation et à l'attaque du substrat : c'est le phénomène de *coopérativité*.

A travers la littérature, cette notion est mise en évidence en jouant sur le caractère hydrophobe des polymères qui est souvent modulé par le greffage de chaînes aliphatiques ou de noyaux aromatiques. L'effet hydrophobe a pour intérêt d'induire la concentration du substrat à proximité de la macromolécule et des sites actifs.

Autre illustration de ce phénomène que nous détaillerons ultérieurement : le polystyrène sulfonate de sodium (NaPSS) en présence de β CD n'a pas d'activité catalytique intrinsèque mais provoque une accélération de l'esterolyse du PNPA en

présence de β CD⁶³ : le substrat et la β CD sont mis en présence l'un de l'autre dans le domaine hydrophobe. La complexation et la réaction sont favorisées.

2 Activité des polyamines non modifiées

2.1 Réactivité des polyamines

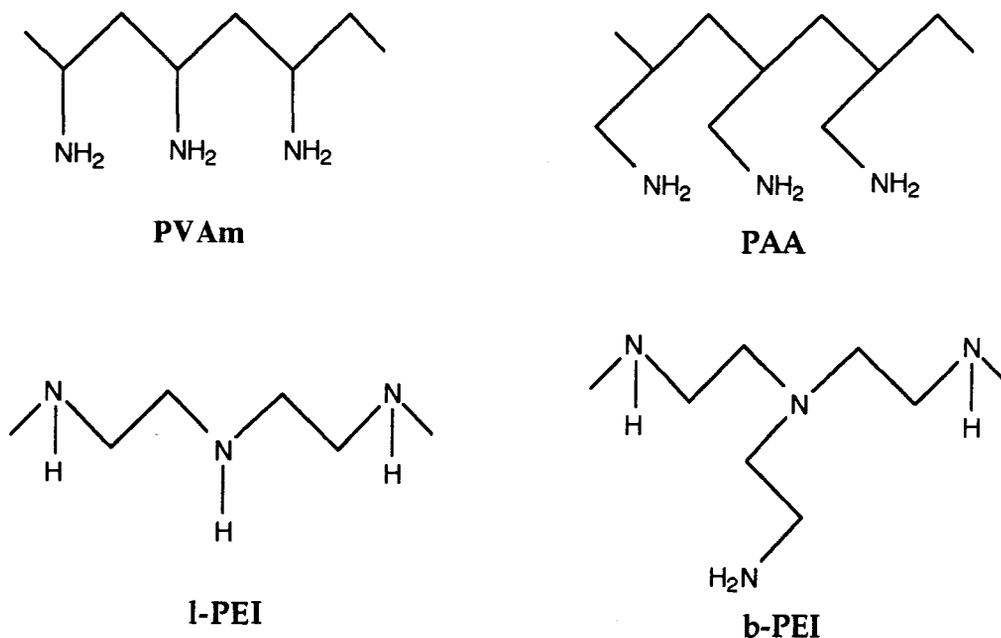


Figure 9.III : Les 4 différentes sortes de polyamines

Des polyamines telles que la PVAm, les polyéthylénimines linéaires ou branchées (l-PEI ou b-PEI)^{64,61} ou la PAA⁴ ont été utilisées pour l'hydrolyse du PNPA ou d'autres esters du nitrophénol. Ces polyamines font varier la constante de vitesse de façon linéaire en fonction de leur concentration, la réaction est du second ordre. L'activité catalytique de celles ci suivent cet ordre : PAA > b-PEI > PVAm > l-PEI . Leurs constantes de vitesses respectives relatives à l'hydrolyse du PNPA sont résumées dans le Tableau 5.III.

Polyamine	PAA (a)	PVAm (b ₁)	b-PEI (b ₂)	l-PEI (b ₃)
k (M ⁻¹ s ⁻¹)	1,10	0,05	0,16	0,016
				0,033 (c)

Tableau 5.III : Constantes de vitesse de l'hydrolyse du PNPA par différentes polyamines.

(a) : T°=25°C, $\mu=0,05$, pH=8,74, PNPA=10⁻⁴M. Référence 4

(b) : T=287°C, $\mu=0,03$, PNPA=10⁻⁴M ; 1) : pH=91 ; 2) : pH=921 ; 3) : pH=901. Référence 61

(c) : Référence 64

Les études de SMETS et al.⁶¹ ont montré que la différence d'activité entre la b-PEI et la l-PEI est due davantage à la présence de groupements amines libres sur les branches du polymère qu'à une polarité inférieure qui serait apportée par la présence des groupes méthylènes supplémentaires.

La PAA possède l'activité catalytique la plus importante grâce à sa richesse en fonctions amines libres et à l'accessibilité de celles-ci qui est supérieure à celle de la PVAm de par la présence d'un motif -CH₂- qui les éloigne de la chaîne polymère.

2.2 PKa et degré de polymérisation de la PVAm

Polyamine	D.P	PKa(1)	pKa(2)
PVAm (a)	10000	8,49	-
PVAm (a)	800000	8,59	-
PVAm (b)	1000	8,23	7,5
PVAm (b)	31000	8,23	5,4
PAA (a)	10000	9,67	-
1,3-Propanediamine (b)	15	10,2	9,7

Tableau 6. III : pKa de polyamines : (1) en présence de KCl ou NaCl ; (2) sans sel
Références : a) : 66 ; b) : 65.

SEO⁴ et SMETS et al.⁶¹ ont montré que l'activité catalytique dépend du pH qui détermine le caractère nucléophile et la conformation de la chaîne. BROUWER⁶⁵ et KOBAYASHI⁶⁶ ont étudié la variation de pKa de la PVAm en fonction de la taille du polymère afin de pouvoir déterminer si celle-ci pourrait moduler ses propriétés. Comme on peut le voir dans le Tableau 6.III, de fortes variations de longueur de chaînes ont assez peu d'influence sur le pKa apparent des polyamines.

L'effet du pH et de la force ionique sur le degré de charge de PVAm de degrés de polymérisation différents déterminé avec HCl en présence ou non de NaCl 2M est représenté dans la Figure 10.III pour des PVAm de masse 1000 et 31000 et pour la 1-3 propanediamine (1,3 PDA). Ce dernier a été choisi comme modèle de bas poids moléculaire de la PVAm. On peut voir sur la Figure 10.III que le 1,3-PDA est plus basique que la PVAm, ceci étant dû aux interactions entre groupes voisins^{67,68} présents dans la PVAm.

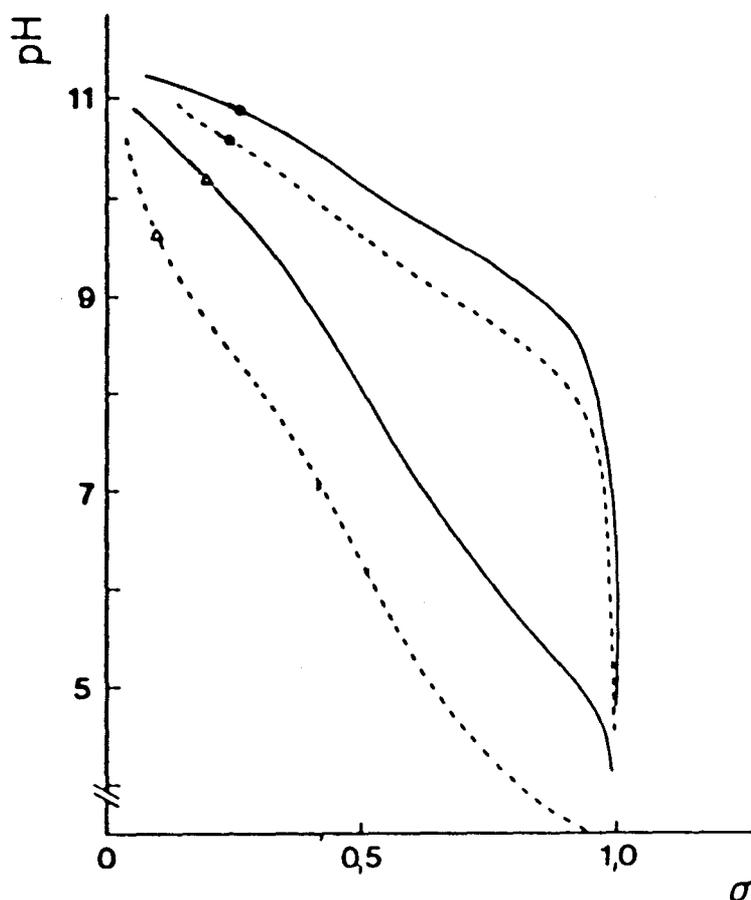


Figure 10.III : Titration : a) de la PVAm (DP = 720) et b) de la 1,3-PDA en présence (—) et en absence (-----) de sel. Référence : 65.

En absence de sel (-----) le pK_a de la polyamine de bas poids moléculaire est supérieur mais en présence de sel (—), conditions dans lesquelles le caractère polyélectrolyte est supprimé, il n'y a pas de dépendance avec le DP.

3 Influence du pH sur la conformation de la PVAm

L'étude de viscosité de la PVAm présentée sur la Figure 11.III montre un maximum autour de $pH = 6$. La viscosité augmente lors de la neutralisation des motifs basiques, ceci est la manifestation de l'effet de répulsion entre les groupes voisins chargés dont la proportion augmente avec la charge du polymère qui prend une conformation de plus en plus étendue^{69,70,71}. Le passage par une viscosité maximum est dû à une structure très rigide à pH intermédiaire, cette conformation est stabilisée par liaison hydrogène entre groupes amines et ammonium

voisins^{67,68} (avec un intermédiaire à 6 centres). La neutralisation d'une solution de PVAm,HCl rapportée par KOBAYASHI et al.⁶⁶, comporte un maximum autour de pH = 3 et n'évoque pas cette conformation intermédiaire.

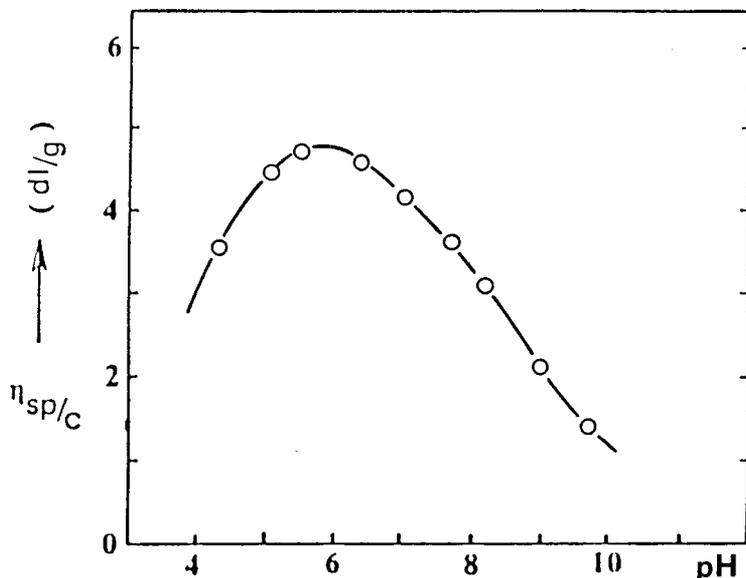


Figure 11.III : Viscosité réduite d'une solution aqueuse de PVAm en fonction du pH. Référence 69.

En résumé, l'activité catalytique d'une polyamine dépend de :

- sa richesse en fonctions amines
- l'éloignement des fonction amines de la chaîne
- la polarité du microenvironnement du polymère
- du pH
- du pKa de l'amine
- de la force ionique

4 polyamines modifiées

Des polyamines modifiées par greffage de groupements alkyles ou benzyles ont montré une activité catalytique bien supérieure à celle du polymère de départ non greffé. L'amélioration apportée par la présence de résidus hydrophobes est due principalement à la nouvelle conformation que ceux ci imposent à la chaîne polymère en solution : les études viscosimétriques sur la PAA⁷² et PEI alkylée ou

benzylée^{73,74} ont montré que celles ci ont tendance à se replier sur elles mêmes pour former une structure globulaire comparable à celle des protéines naturelles.

Les études faites en fluorométrie ont montré une forte hausse de l'intensité de fluorescence des sondes testées ainsi qu'une affectation de leur durée de vie de fluorescence⁷⁵, ce qui confirme l'existence d'un domaine hydrophobe capable de solubiliser des molécules de taille assez importante. Comme le montre le Tableau 7.III, l'activité catalytique de ce type de polymères est supérieure à celle des petites molécules modèles ou d'amines alkylées formant des micelles en solution.

Ester		butyrate	capronate	caprylate
Solution moléculaire	Diéthylamine	1,0	0,62	0,26
	Triéthylamine	0,78	0,47	0,32
Micelle	Diéthylamine	5,7	5,0	7,4
	Butyl-diéthylamine	2,9	2,4	3,6
	Heptyl-diéthylamine	1,9	2,1	2,8
	Hexadécyl-diéthylamine	1,7	1,3	1,7
Polymère	PEI-heptyl	5,8	166	1330
	PEI-hexadécyl	27	536	2460
α -Chymotrypsine		2300	14000	28000

Tableau 7.III : Constantes de vitesse ($M^{-1}s^{-1}$) d'hydrolyse d'esters de p-nitrophényl catalysée par des amines aliphatiques en solution, en micelles ou polymérisées. Référence 76

SEO⁷² rapporte que le domaine hydrophobe des polymères est moins polaire et plus dense que celui des micelles formées par les tensio-actifs. De plus, la longueur du groupement alkyle et le degré de substitution sont tous deux facteurs de la diminution de la polarité et donc d'une amélioration du pouvoir de solubilisation du substrat.

PSHEZHETSKII⁷⁶ a mis en évidence que l'opération de greffage de groupements alkyles sur la PEI provoque une modification de la structure du polymère, entraîne de ce fait une diminution du pKa des fonctions amines de l'ordre de 3 unités par rapport à celui des petites molécules modèles (voir Tableau 8.III). Les conséquences de ceci en catalyse sont très importantes puisque, comme nous l'avons

évoqué précédemment, le nombre de sites catalytiques dépend du nombre de fonctions amines déprotonnées. En particulier, dans le domaine de pH biologique, les centres actifs du polymère présents dans les régions hydrophobes de la macromolécule sont pratiquement entièrement déprotonnés, tandis que les amines de faible poids moléculaire ont un degré de dissociation inférieur à 0,1%. Ainsi l'activité catalytique des catalyseurs polymères atteint une activité jusqu'à 7000 fois supérieure à celle des amines de type moléculaire⁷⁶.

pKa	DEA	TEA	Butyl- DEA	Heptyl- DEA	Dodécyl- DEA	Hexadécyl- DEA
Amines en solution	11,2	10,0	10,6	10,52	10,4	-
micelles (a)	9,8	9,4	9,3	9,3	9,5	9,5
PEI alkylée (b)			Butyl-PEI 8,6	Heptyl- PEI 8,05	Dodécyl- PEI 7,8	Hexadécyl- PEI 7,5

Tableau 8.III : Valeurs de pKa d'alkyles diéthyles amines pour des solutions moléculaires, micellaires, macromoléculaires. (a) : pKa des sites catalytiques dans les micelles de bromure de cétyl triméthyl ammonium. (b) : pKa des sites catalytiques. Référence 70.

En résumé, l'apport de groupements carbonés plus ou moins importants (sur la PEI comme sur la PAA) apporte de nouvelles caractéristiques conformationnelles au catalyseur qui influencent très favorablement l'étape de fixation du substrat ainsi que celle de l'attaque nucléophile.

V ETUDES DES SYSTEMES POLYMERE-CYCLODEXTRINE

Les polymères hydrosolubles modifient la viscosité du milieu et pourraient provoquer une diminution de la vitesse d'hydrolyse par réduction de la mobilité des réactifs. Nous verrons dans ce paragraphe qu'en effet, si diverses interactions polymère/catalyseur ont été recensées, il en existe également entre polymère et substrat. La combinaison de ces interactions peut favoriser la réaction d'esterolyse.

1 Diffusion de la cyclodextrine en solution aqueuse de polymère

La mobilité des molécules en solution aqueuse n'est pas favorable à la rencontre entre le catalyseur et le substrat, celle-ci dépend de la taille des molécules ainsi que de la viscosité du milieu. Il est possible d'entraver la diffusion des petites

molécules (substrat) en augmentant la viscosité de la solution par ajout de polymère dans la solution. Ceci a pour conséquence : 1) Obstruction de la trajectoire de diffusion du substrat⁷⁷. 2) Immobilisation de la molécule par interaction spécifique avec le polymère⁷⁸.

Plus particulièrement, la diffusion d' α et de β CD en solution aqueuse en présence d'acide polyméthacrylique (PMA), de NaPSS et de leurs copolymères a été étudiée⁷⁹. La diminution des coefficients de diffusion des CD associée l'augmentation de la concentration en polymère a été interprétée par la formation d'un complexe entre la CD et un ou plusieurs motifs du polymère.

La Figure 12.III suivante montre que le coefficient de diffusion dépend à la fois de la concentration en β CD et en NaPSS. UEMURA explique que la CD est immobilisée par la formation d'un complexe d'inclusion avec les aromatiques du polymère mais aussi par la gêne stérique de la chaîne macromoléculaire⁷⁹.

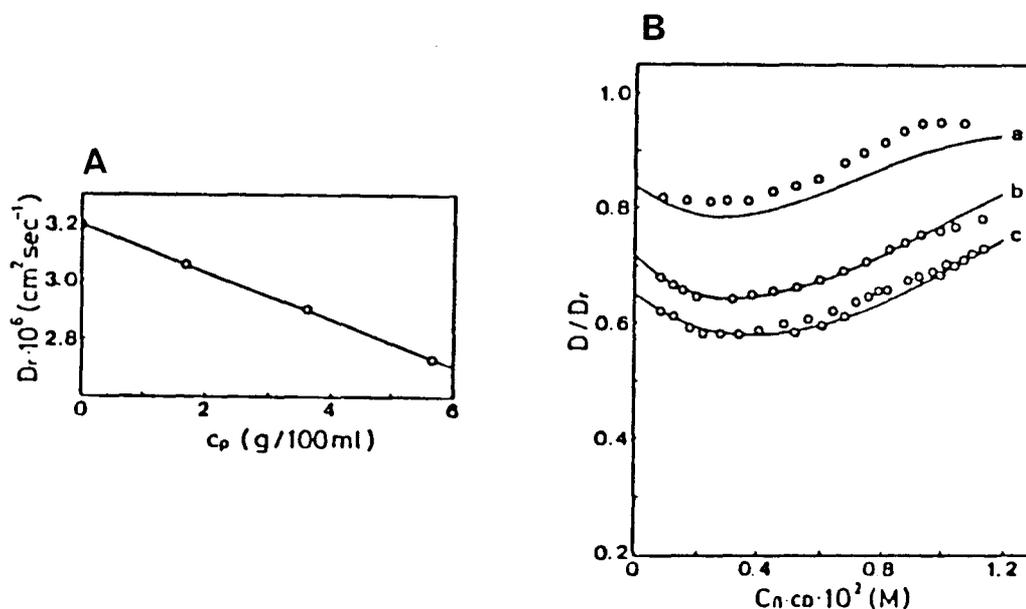


Figure 12.III : Coefficients de diffusion différentiels de l' α et β CD en solution aqueuse de NaPSS. A : coefficient de diffusion à dilution infinie D_r en fonction de la concentration en polymère ; B : valeurs de D/D_r pour la β CD en fonction de (β CD)

2 Etude de systèmes catalytiques polymères/CD

2.1 Polyélectrolytes

Les systèmes précédents ont été testés en catalyse dans le but de confirmer ces interactions mais aussi pour fournir davantage de renseignements sur la conformation du polymère en solution.

SEO^{63,80} a mis en évidence l'effet accélérateur du NaPSS sur l'hydrolyse du PNPA par la β CD : ce polyélectrolyte a le pouvoir de concentrer à la fois le substrat et la β CD dans le domaine hydrophobe qu'il forme en solution aqueuse.

Bien que le NaPSS seul ne provoque pratiquement pas d'accélération de la réaction, comme le montre la Figure 13.III, la présence de β CD lui confère un rôle dans la catalyse, laissant présager une action coopérative de ces 2 éléments.

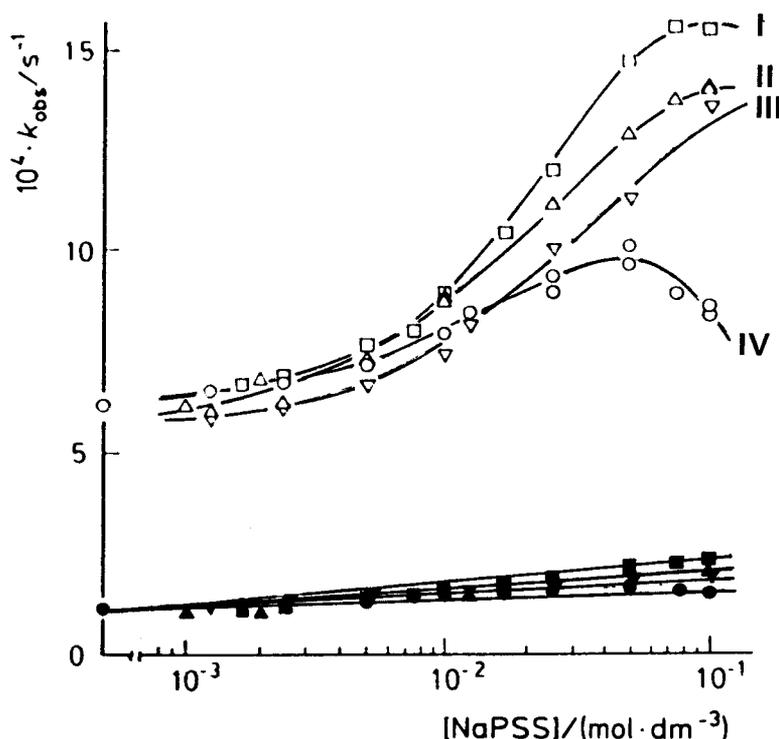
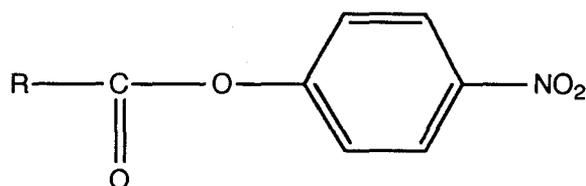


Figure 13.III : Effet du NaPSS de masses variables sur l'hydrolyse du PNPA catalysée par la β CD. Symboles non pleins : (β CD)= 10^{-2} M ; I : \overline{Mn} =40,7 ; II : \overline{Mn} =24,4 ; III : \overline{Mn} =4,97 ; IV : \overline{Mn} =3,86. $\times 10^{-5}$. Référence 63.

Les paramètres qui interviennent sur la cinétique sont la longueur de la chaîne et le taux de sulfonation du NaPSS. Des mesures de solubilité révèlent un meilleur pouvoir solubilisant du substrat avec des polymères de masse importante, leur domaine hydrophobe étendu étant apte à inclure davantage de CD et de substrat. La RMN du proton a mis en évidence l'existence d'un complexe d'inclusion entre CD et noyau aromatique⁸¹. La faiblesse du taux de substitution induit une concentration en cyclodextrine libre plus importante et donc une plus grande disponibilité de celle-ci pour capter et esterolyser le substrat ; toutefois le polymère ne modifie pas la constante de dissociation (K_d) du complexe β CD/PNPA et ne provoque pas d'effet inhibiteur⁶³.

L'éthylbenzène sulfonate (NaEBS) ou le dodécylbenzènesulfonate (NaDBS) utilisés comme modèles du NaPSS subissent une forte interaction avec la β CD mais, contrairement au polymère, ne forment pas un domaine hydrophobe capable de concentrer à la fois le substrat et la β -cyclodextrine⁸⁰.

En faisant varier la partie ester du substrat, on modulera son degré hydrophobe et son interaction avec le polymère. L'ordre de réactivité de ces esters de nitrophénol ne varie pas que ce soit en présence de β CD seule ou du mélange β CD/NaPSS : MNPA > PNPA > PNPB ; le polymère n'agit pas sur les constantes d'association respectives des substrats avec la CD mais induit une accélération de la réaction par la solubilisation des 2 éléments au sein des micelles⁸⁰.



PNPH : R = CH₃-(CH₂)₄

PNPB : R = C₆H₅

Le PMA⁶³ interagit également avec la cyclodextrine mais provoque l'inhibition de la réaction contrairement au NaPSS. En effet, 2 phénomènes expliquent ce comportement : 1) Dans les conditions de l'étude cinétique (pH = 8,74), le PMA est partiellement chargé et se trouve dans sa configuration étendue ; ceci n'occasionne pas l'effet de concentration présenté par la conformation micellaire⁸². 2) Il y a formation de complexes stables entre le PMA et la CD qui engendre l'occupation des sites actifs.

2.2 Systèmes PAA/CD

SEO⁸³ a indiqué que la constante de vitesse du second ordre diminue lors de l'addition de CD dans le milieu lorsque la réaction est catalysée par la PAA et davantage encore avec la PAA benzylée. Il a vérifié l'hypothèse de l'inhibition par formation d'un complexe d'inclusion entre le PNPA et la β CD qui protégerait celui-ci de l'attaque nucléophile des fonctions amines. L'effet inhibiteur plus prononcé avec la PAA benzylée provient de l'inhibition compétitive causée par la partie hydrophobe du polymère qui vient également interagir avec la CD ce qui provoque la désactivation des sites catalytiques .

3 Conclusion

Les polymères hydrosolubles jouent le rôle de microenvironnement dont le caractère hydrophobe, les propriétés électrostatiques ou la compatibilité chimique permettent de concentrer cyclodextrine et substrat. La littérature que nous venons de parcourir évoque tantôt l'inhibition de l'action de la CD à cause de l'occupation de la cavité par les fonctions supportées par le polymère (PMA, PAA, PAA benzylée), tantôt une accélération (NaPSS).

VI ETUDE DE POLYMERES CATALYSEURS SUPPORTS DE CYCLODEXTRINE

Après avoir parcouru la littérature rapportant les effets catalytiques de la cyclodextrine puis des polymères hydrosolubles ainsi que de leur mélange, nous allons poursuivre nos investigations vers les systèmes dans lesquels la cyclodextrine est liée de façon covalente à une chaîne polymère. Ce genre de système n'a pas été abondamment étudié (sans doute à cause des conditions de synthèse) et ceci malgré des résultats très positifs qui sont la conséquence directe de l'existence d'un lien entre la macromolécule et la CD qui confère à celle-ci de nouvelles propriétés complexantes. Deux types de catalyseurs ont été rencontrés : ceux obtenus par polymérisation de monomères de cyclodextrine et ceux synthétisés par greffage de CD sur un polymère déjà existant.

1 Cyclodextrine polymérisée

La polymérisation d'acryloyl- β -cyclodextrine a conduit à la formation d'homopolymères hydrosolubles^{84,85}. La présence de cyclodextrines adjacentes imposée par la polymérisation apporte des différences importantes au niveau de la complexation du substrat. HARADA³ a étudié l'hydrolyse du PNPA et du p-nitrobenzoate de p-nitrophényl pNP-pNB par la polyacryloyle- β -cyclodextrine (poly-CD-A), l'effet accélérateur apparent (k_2/K_M) qu'il a mesuré (par rapport à la CD libre) étant respectivement de 1,5 et 3,0. L'accélération relativement faible de l'hydrolyse du PNPA par rapport aux solutions de cyclodextrine est uniquement due à une énergie d'activation inférieure provenant de la richesse de l'environnement en fonctions hydroxyles. Mais nous pouvons également évoquer la gêne stérique qui serait causée par le greffage des groupements acryloyles sur les OH primaires de la β CD (Figure 14.III) et qui pourraient être à l'origine d'une accessibilité restreinte de la cavité pour le substrat. Autrement dit, si la β CD était reliée au polymère par les OH secondaires - côté le moins ouvert - elle pourrait "capter" plus facilement le substrat, l'entrée de la cavité étant alors entièrement libre.

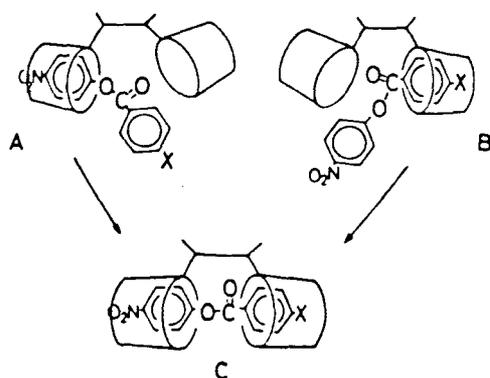


Figure 14.III : Mode de complexation du pNP-pNB par poly-CD-A

L'effet d'accélération plus important avec le pNP-pNB vient du fait que le mode de complexation est tout à fait différent : il se forme un complexe de type 2-1. En effet, le pNP-pNB est trop encombrant pour pénétrer complètement dans une seule CD qui ne peut contenir qu'un seul noyau aromatique. Soit la partie nitrophényl soit la partie benzoyle peut être incluse dans la cavité de la β CD. Lorsque le groupement p-nitrophényl est inclus, ceci est favorable à la réaction, comme il l'a été démontré pour divers esters de phényl⁸⁶. Cependant, quand la partie ester est incluse dans la cavité, ce mode de liaison n'est pas favorable à la réaction comme l'ont démontré LACH et al.⁸⁷ et VAN ETTEN et al.¹⁴ sur le p-amino benzoate d'éthyle et des benzoates d'alkyle. La non réactivité de ces esters a été expliquée par la trop grande distance qu'il y a entre le groupement carbonyle et les hydroxyles de la CD dans ce complexe. Dans le système Poly-CD-A/ pNP-pNB il est possible que les 3 modes de liaison représentés dans la Figure 14.III existent. Le mode A est efficace tandis que le mode B ne l'est pas, le mode C peut être productif. On peut prévoir dans ce cas une stabilisation du complexe formé par 2 CD adjacentes du polymère avec un substrat encombrant par rapport au complexe ternaire qui serait formé avec la CD libre.

Cet effet coopératif disparaît lorsque la distance moyenne entre les motifs supportant la CD augmente (pour les copolymères CD-A-acrylamide). D'autre part l'existence de complexes ternaires avec des substrats de taille importante a été observée par spectrophotométrie, équilibre de dialyse, isotherme de solubilité et fluorescence du TNS^{88,89} dont l'intensité est fortement augmentée en présence de Poly-CD-A (cette dernière méthode analytique sera particulièrement développée au cours du Chapitre IV).

2 Polyallylamines porteuses de cyclodextrine

Dans ses travaux SEO⁴ a procédé au greffage de la β CD sur la PAA. Les polymères hydrosolubles obtenus ont des degrés de substitution variables et possèdent des motifs non substitués intervenant dans la réaction d'hydrolyse. Si dans les systèmes PAA/ β CD, cette dernière avait une action inhibitrice, les polymères PAA- β CD présentent une accélération de la vitesse d'hydrolyse qui est supérieure à l'addition des effets de chacun pris séparément⁸³.

Ici encore, un effet coopératif existe entre le résidu β CD qui a pour rôle de mobiliser le substrat et les fonctions amines voisines qui interviennent au stade de l'attaque nucléophile.

SEO⁴ avance pour preuve de l'intervention des fonctions amines, un effet accélérateur supérieur pour l'hydrolyse du PNPA que pour le MNPA alors que c'est l'inverse qui est observé en présence de β -cyclodextrine libre. Il explique ceci par le fait que la fonction ester du PNPA émergeant de la cavité de la β CD est plus accessible aux fonctions amines du polymère que celle du MNPA qui est encapsulée.

Les études de fluorescence avec le TNS⁷² ont permis de mesurer K_d qui est de $6 \cdot 10^{-4}$ Mol/l en présence de polymère et $5 \cdot 10^{-2}$ Mol/l avec la β CD ce qui indique que, comme avec le poly-CD-A, il y a formation d'un complexe 2-1 avec des substrats encombrants. Il faut noter que la formation de complexes ternaires se produit presque spontanément avec les polymères greffés, grâce à un microenvironnement riche en unités cyclodextrines, tandis que ce type de complexes avec la CD en solution ne se produit qu'à des concentrations supérieures à 10^{-3} M. (Nous détaillerons les données concernant les systèmes β CD/TNS dans le paragraphe qui traite de la technique de la fluorescence (Chapitre IV).

SEO⁸³ a montré que des degrés de substitution trop importants pouvaient être néfastes sur l'accélération de la réaction, la faible concentration en fonctions amines libres faisant diminuer la constante k_2 . C'est pourquoi, avec le PNPA, le PNPB et le PNPB, l'activité catalytique augmente jusqu'à $DS = 0,5$ et diminue ensuite.

En résumé, nous avons vu dans ce paragraphe que le greffage de la cyclodextrine sur une chaîne macromoléculaire améliore les propriétés catalytiques de celle-ci, grâce à un effet de concentration locale élevée qui permet la coopérativité entre les résidus β CD voisins en augmentant la stabilité des complexes β CD/substrat et, à ceci s'ajoute un autre type de coopérativité, qui consiste en l'association des propriétés complexantes de la CD et du potentiel nucléophile du polymère fonctionnalisé.

C/ CONCLUSION DU CHAPITRE III

Les systèmes catalytiques artificiels que nous venons de découvrir à travers la littérature reprennent le concept général des enzymes naturelles : un squelette macromoléculaire associé à un site actif qui a pour fonction de capter le substrat et de le transformer. Nous avons vu que les amines sont les groupements fonctionnels les plus étudiés à cause de leur caractère nucléophile. L'efficacité des polymères aminés est dans tous les cas améliorée lorsqu'on leur associe des résidus alkylés ou benzylés grâce à leur pouvoir solubilisant des composés hydrophobes. La cyclodextrine possède ces deux propriétés : groupement hydroxyle nucléophile et cavité hydrophobe ; de plus elles présentent l'avantage de pouvoir être modifiées dans le but d'adapter leur pouvoir d'inclusion ou d'y greffer d'autres groupements nucléophiles.

Ainsi, la modification chimique des systèmes catalytiques précités apporte une sélectivité vis à vis de substrats de différents degrés hydrophobes ou chargés ; l'énantiosélectivité a été mise en évidence avec la cyclodextrine.

Après avoir pris connaissance de ces données, et dans le but de vérifier leur validité vis à vis de la PVAm qui a été relativement peu étudiée dans le domaine de l'hydrolyse d'esters, les chapitres suivants vont consister à développer l'étude des systèmes cyclodextrine/PVAm (Chapitre IV) et cyclodextrine benzylée (Chapitre V).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE III



- 1 LEHNINGER
Biochimie, Flammarion Médecine Sciences, 2ème Ed. Chap.8, (1975)
- 2 M. KOMIYAMA, M. L. BENDER
Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1976), 73 ,2969
- 3 A. HARADA, M. FURUE, S. NOZAKURA
Macromolecules, (1976), 9 , 705
- 4 T. SEO, T. KAJIHARA, T. IIJIMA
Makromol. Chem. (1987), 188 , 2071
- 5 J. M. LEHN, C. SIRLIN,
J. Chem. Soc.; Chem. Commun. (1978), 949
- 6 R. BRESLOW, G. TRAINOR, A. UENO
J. Am. Chem. Soc. (1983), 105 , 2739
- 7 D. J. CRAM, P. Y. LAM, S. P. HO
J. Am. Chem. Soc. (1986), 108 ,939
- 8 R. HERSCHFELD, M. L. BENDER
J. Am. Chem. Soc. (1972), 94 ,1376
- 9 Y. MURAKAMI, Y. AOYAMA, M. KIDA, A. NAKANO
Bull. Chem. Soc. Jpn. (1977), 50 ,3365
- 10 T. KUNITAKE, Y. OKAHATA, T. SAKAMOTO
J. Am. Chem. Soc. (1976), 98 , 7799
- 11 F. M. MENDER, C. E. PORTNOY
J. Am. Chem. Soc. (1967), 89 , 4698
- 12 B. ZERNER, M. L. BENDER
J. Am. Chem. Soc. (1963), 85 ,356
- 13 F. M. MENDER, M. LADIKA
J. Am. Chem. Soc. (1987), 109 ,3146
- 14 R. L. VAN ETIEN, G. A. CLOWES, J. F. SEBASTIAN, M. L. BENDER
J. Am. Chem. Soc. (1967), 89 , 3253
- 15 F. M. MENDER
Acc. Chem. Res. (1985), 18 , 128
- 16 R. L. VAN ETIEN, J. F. SEBASTIEN, G. A. CLOWES, M. L. BENDER
J. Am. Chem. Soc. (1967), 89 , 3242

-
- 17 R. L. VAN ETTEN, J. F. SEBASTIEN, G. A. CLOWES, M. L. BENDER
J. Am. Chem. Soc. (1967), 89 , 3253
- 18 M. L. BENDER
Trans. N. Y. Acad. Sci. (1967), 29 , 301
- 19 W. SAENGER
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1980), 19 , 344
- 20 M. L. BENDER, M. KOMIYAMA
"Cyclodextrin Chemistry" Springer. Berlin, (1978)
- 21 R. P. BELL, A. T. KUHN
Trans. Faraday Soc. (1963), 59 , 1789
- 22 W. LAUTSCH, R. WIECHERT, H. LEHMANN
Kolloid-Z (1954), 135 , 134
- 23 J. STAERK, H. Jr. SCHLENK
Abstracts, 149th National Meeting of Am. Chem. Soc., Detroit, p11c, (1965)
- 24 Y. KURONO, V. STAMOUDIS, M.L. BENDER
Bioorg. Chem. (1976), 5 , 393
- 25 M. L. BENDER, E. J. POLLOCK, M. C. NEUVEU
J. Am. Chem. Soc. (1962), 84 , 595
- 26 CHIN T. F, CHUN P. H., LACH J. L.
J. Pharm. Sci. (1968), 57 , 44
- 27 M. L. BENDER, R. L. VAN ETTEN, G. A. GLOWES, J. F. SEBASTIEN
J. Am. Chem. Soc. (1966), 88 , 2318
- 28 J. SZEJTLI
"Cyclodextrin Technology", Kluwer Academic Publ. (1988)
- 29 M. KOMIYAMA, H. HIRAI
Chem. Lett. (1980), 1471
- 30 Y. KITaura, M.L. BENDER
Bioorg. Chem. (1975), 4 , 237
- 31 Y. IHARA, E. NAKANISKI, M. NANGO, J. KOGA
Bull. Chem. Soc. Jpn. (1986), 59 , 1901
- 32 R. FORNAISER, P. SCRIMIN, U. TONATELLO
Tetrahedr. Lett. (1983), 24 , 5541
- 33 M.L. BENDER, M. KOMIYAMA
"Cyclodextrin Chemistry", Springer Verlag, New-York (1977)
- 34 D. E. KOSHLAND Jr, D. H. STRUMEYER, W. J. RAY Jr.
Brookhaven Symp. Biol. (1962), 15 , 101

-
- 35 L. WEIL, A. R. BUCHERT
Federation Proc. (1952), 11 , 307
- 36 G. SCHOELLMANN, E. SCHAW
Biochemistry (1963), 2 , 252
- 37 M. L. BENDER, G. E. CLEMENT, F. J. KEZDI, H. D'A. HECK
J. Am. Chem. Soc. (1964), 86 , 3680
- 38 F. CRAMER, G. MACKENSEN
Angew. Chem. (1966), 78 , 641
- 39 F. CRAMER, G. MACKENSEN
Chem. Ber. (1970), 103 , 2138
- 40 Y. IWAKURA, K. UNO, F. TODA, S. ONOZUKA, K. ATTORI, M. L. BENDER
J. Am. Chem. Soc. (1975), 97 , 4432
- 41 Y. MATSUI, T. YOKOI, K. MOCHIDA
Chem. Lett., Chem. Soc. Jpn. (1976), 1037
- 42 H. J. SCHNEIDER, F. XIAO
J. Chem. Soc. Perkin Trans, (1992), 2 , 387
- 43 R. BRESLOW, M. F. CZARNIECKI, J. EMERT, H. HAMAGUCHI
J. Am. Chem. Soc. (1980), 102 ,762
- 44 J. EMERT, R. BRESLOW
J. Am. Chem. Soc. ((1975) ,97 , 670
- 45 A. UENO, F. MORIWAKI, Y. HINO, T. OSA
J. Chem. Soc. Perkin Trans. II (1985)
- 46 Y. MATSUI, A. OKIMOTO
Bull. Chem. Soc. Jpn.(1978), 51 ,3030
- 47 C.G. OVERBERGER, J. C. SALAMONE, Y. YAROSLAVSKY
J. Am. Chem. Soc. (1967), 89 , 6231
- 48 I.B. WILSON ,F. BERGMANN
J. Biol. Chem. (1950), 185 , 683
- 49 K. WALLENFELS, O.P. MALHOTRA
" The enzymes ", Ed. Academic Press Inc. New York, (1960), 4 , 409
- 50 G.C. OVERBERGER, T. S^T PIERRE, N. VORCHEIMER, J. LEE, S. YAROSLAVSKY
J. Am. Chem. Soc. (1964), 87 , 296
- 51 C.G. OVERBERGER, T. S^T PIERRE, S. YAROSLAVSKY
J. Am. Chem. Soc. (1965), 87 , 4310

-
- 52 C. G. OVERBERGER, T. S^T PIERRE, C. YAROSLAVSKY, S. YAROSLAVSKY
J. Am. Chem. Soc. (1966), 88 , 1184
- 53 G.C. OVERBERGER, R. CORETT, J.C. SALAMONE, S. YAROSLAVSKY
Macromolecules (1968), 1 , 331
- 54 G. C. OVERBERGER, M. MORIMOTO
J. Am. Chem. Soc. (1971), 93 , 3222
- 55 G.C. OVERBERGER, M. MORIMOTO, I. CHO, J.C. SALAMONE
J. Am. Chem. Soc. (1971), 93 , 3228
- 56 J. A. PAVLISKO, G. C. OVERBERGER
J. Polym. Sci. ; Polym. Chem. Ed. (1981), 19 , 1621
- 57 R. TOMKO, G. C. OVERBERGER
J. Polym. Sci. ; Polym. Chem. Ed. (1985), 23 , 265
- 58 R. TOMKO, G.C. OVERBERGER
J. Polym. Sci. ; Polym. Chem. Ed. (1985), 23 , 279
- 59 T. KUNITAKE, F. SHIMADA
Polym. Lett. (1968), 6 , 467
- 60 T. KUNITAKE, F. SHIMADA, C. ASO
Makromol. Chem. (1969), 126 , 276
- 61 A. EVERAERTS, C. SAMYN, G. SMETS
Makromol. Chem. (1984), 185 , 1881
- 62 M. NANGO, I. M. KOLTZ
J. Polym. Sci. : Polym. Chem. Ed. (1978), 16 , 1265
- 63 T. SEO, T. KAJIHARA, T. IIJIMA
Makromol. Chem. (1987), 188 , 1295
- 64 I.M. KOLTZ, V.H. STRYKER
J. Am. Chem. Soc. (1968), 90 , 2717
- 65 W. M. BROUWER, P. PIET, A.L. GERMAN
Makromol. Chem. (1984), 185 , 363
- 66 S. KOBAYASHI, K. SUH, Y. SHIHOHURA
Macromolecules (1989), 22 , 2363
- 67 E. A. LEWIS, J. BARKLEY, T. S^T PIERRE
Macromolecules (1981), 14 , 546
- 68 P. L. RINALDI, C. YU, G. C. LEVY
Macromolecules (1981), 14 , 551
- 69 W. M. BROUWER, P. PIET, A. L. GERMAN
Polym. Bull. (1982), 8 , 245

-
- 70 BLOYS, VAN TRESLONG
C. J. Recl. Trav. Chim. Pays-Bas (1978), 97 , 13
- 71 P. TEYSSIÉ, C. DECOENE, M. TEYSSIÉ
Makromol. Chem. (1965), 84 ,51
- 72 T. SEO, S. TAKE, K. MIWA, K. HAMADA, T. IIJIMA
Macromolecules (1991), 24 , 4255
- 73 V. S. PSHEZHETSKII, G. A. MURTAZAEVA, V. A. KABANOV
Eur. Polym. J. (1974), 10 , 581
- 74 V. S. PSHEZHETSKII, G. M. NIKOLAEV, A. P. LUKJANOVA
Eur. Polym. J., (1977), 13 , 423
- 75 T. SEO, K. HAMADA, T. IIJIMA
Macromolecules (1991), 24 , 4801
- 76 V. S. PSHEZHETSKII, A.P. LUKYANOVA, V. A. KABANOV
J. Molec. Catal. (1977), 2 , 49
- 77 J. H. WANG
J. Am. Chem. Soc. (1954), 76 , 4755
- 78 T. IIJIMA, T. UEMURA, S. TSUSUKU, J. KOMIYAMA
J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed. (1978), 16 ,793
- 79 T. UEMURA, T. MORO, J. KOMIYAMA, T. IIJIMA
Macromolecules (1979), 12 , 737
- 80 T. SEO, T. KAJIHARA, T. IIJIMA
Makromol. Chem. (1990), 191 , 1665
- 81 P. V. DEMARCO, A. L. THAKKAR
Chem. Commun. (1970), 2
- 82 J. C. LEYTE, M. MANDEL
J. Polym. Sci., part A 2 (1964), 1879
- 83 T. SEO, T. KAJIHARA, K. MIWA, T. IIJIMA
Makromol. Chem. (1991), 192 ,2357
- 84 M. FURUE, A. HARADA, S. NOZAKURA
J. Polym. Sci. ; Polym. lett. (1975), 13 ,357
- 85 A. HARADA, M. FURUE, S. NOZAKURA
Macromolecules (1976), 9 ,701
- 86 H. J. BRASS, M. L. BENDER
J. Am. Chem. Soc. (1973), 95 , 5391

-
- 87 J. L. LACH, T. F. CHIN
J. Pharm. Sci. (1964), 53 , 924
- 88 A. HARADA, M. FURUE, S. NOZAKURA
Polym. J. (1980), 12 , 29
- 89 A. HARADA, M. FURUE, S. NOZAKURA
Macromolecules (1977), 10 , 676

CHAPITRE IV

PROPRIETES CATALYTIQUES ET ORGANISATION DE SYSTEMES COMPOSES DE β -CYCLODEXTRINE ET DE PVAm

INTRODUCTION

Nous allons à présent procéder à l'expérimentation des systèmes catalytiques dont la synthèse a fait l'objet des deux premiers chapitres de ce travail. Avant d'étudier les polymères de la série PVACD, une approche préliminaire s'impose, celle-ci ayant pour but de tester, dans un premier temps, les propriétés catalytiques de la cyclodextrine puis de la PVAm séparément. Dans un second temps le mélange de celles-ci fera l'objet de mesures cinétiques mais aussi thermodynamiques. Une fois ces deux étapes réalisées, nous aurons les bases suffisantes pour pouvoir effectuer certaines comparaisons avec l'expérimentation catalytique des polymères greffés qui sera complétée par une étude de photoluminescence qui nous renseignera sur leur pouvoir d'inclusion vis à vis de composés hydrophobes fluorescents encombrants. Enfin, cette démarche va nous permettre de tirer des conclusions sur les transformations que subit le polymère au cours du greffage de la cyclodextrine, mais aussi sur le mode d'action spécifique de ce système catalytique.

A/ METHODE EXPERIMENTALE DU SUIVI DE LA REACTION D'HYDROLYSE D'ESTERS DE NITROPHENOL

I PRINCIPE ET MESURES DES CONSTANTES DE VITESSE

1 Méthode d'exploitation des données expérimentales

Comme nous l'avons défini précédemment, le choix des esters de nitrophénol comme substrat dans les réactions d'hydrolyse enzymatiques est en partie dû à la commodité qu'ils apportent, étant donné que l'évolution de la concentration en p-nitrophénol peut être facilement suivie par spectrophotométrie : le p-nitrophénolate a une longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{\max}) de 405 nm (400 nm sous sa forme complexée par la cyclodextrine) et un coefficient d'extinction molaire ϵ de 18000 mol⁻¹ dm².

La variation de la concentration de l'ester au cours du temps suit la loi de cinétique du 1er ordre suivante :

$$-d(A)/dt = k(A)$$

dont la forme intégrée est :

$$\log \frac{(A_0)}{(A)} = kt/2,303 \quad (\text{voir début Chapitre III})$$

soit :

$$\ln((A_0)-(A)) = kt \quad (1)$$

où (A_0) est la concentration initiale en ester et (A) est la concentration en ester au temps t .

Comme nous mesurons la quantité de p-nitrophénolate qui se forme au cours du temps, la mesure directe de la DO que nous mesurons peut être utilisée pour déterminer la constante de vitesse de la réaction :

$$\ln(A_\infty - A) = -kt \quad (2)$$

où A_∞ est la DO de la solution au temps infini et A est la DO mesurée au temps t .

La constante de vitesse du premier ordre est obtenue par la pente de la droite $\ln(A_\infty - A) = f(t)$.

2 Réactions catalysées

L'intervention d'un catalyseur dans la réaction modifie l'ordre de la réaction : la constante qui est mesurée à partir de l'équation (2) est alors une constante du pseudo-premier-ordre que l'on nommera k_{obs} .

2.1 Réactions du second ordre

Si la vitesse de réaction évolue linéairement en fonction de la concentration en catalyseur, la réaction suit la loi cinétique du second ordre :

$$k_{obs} = k \text{ (cat)} + k_{un}$$

k est une constante de vitesse du second ordre ($\text{mol}^{-1} \text{l s}^{-1}$) et k_{un} est la valeur de k_{obs} en absence de catalyseur.

2.2 Réactions de type enzymatique

Lorsque la réaction est de type enzymatique, la constante de vitesse du pseudo premier ordre ne varie pas linéairement en fonction de la concentration en catalyseur mais elle suit la loi de *Michaelis-Menten* (voir Chapitre III). La mesure de k_{obs} en fonction de la concentration en cyclodextrine permet de mesurer les grandeurs cinétiques (k_2 et K_m) en traçant la droite de *Lineweaver-Burk* : $1/(k_{obs} - k_{un})$ en fonction de l'inverse de la concentration en catalyseur.

$$\frac{1}{(k_{obs} - k_{un})} = \frac{K_m}{k_2 \text{ (Cat)}} + \frac{1}{k_2}$$

II EXPERIMENTATION DU SUIVI CINETIQUE

1 Le substrat

Une solution stock ($2 \cdot 10^{-2} \text{M}$) de PNPA (JANSSEN) est préparée dans l'acétonitrile. L'introduction de $15 \mu\text{l}$ de cette solution à 3ml du milieu réactionnel porte la concentration expérimentale en substrat à 10^{-4}M , et la concentration en acétonitrile à 0,5%.

2 Le solvant

La plupart des mesures ont été effectuées en solution tampon Tris(2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3 propanediol) (JANSSEN) 0,05M, le pH étant ajusté à 8,74 avec HCl (nous utiliserons l'abréviation Tris-HCl).

Ces conditions (identiques à celles qui ont été employées par SEO et al.^{1,2} ont été choisies du fait de la similitude de nos travaux. Il faut noter que parmi toutes les études de cinétique rapportées dans la littérature, on ne retrouve pas de conditions de pH ou de force ionique "standards", ce qui nous pose parfois des difficultés pour comparer des résultats émis par des équipes de recherche différentes.

3 Instrumentation-mode opératoire

Les solutions tampon (3ml) dans des tubes hermétiquement fermés contenant les catalyseurs aux concentrations désirées sont immergées 30 mn au bain thermostaté à 25°C (après avoir ajusté le pH à 8,74 si nécessaire).

Après avoir ajouté 15 μ l de la solution de PNPA à l'aide une pipette automatique GILSON, le tube est agité et son contenu est versé dans une cellule en quartz. Le spectrophotomètre (UVIKON 930) est programmé pour mesurer et enregistrer l'absorbance de la solution à 400nm pendant 3 à 5 minutes.

Enfin, l'absorbance de la solution pour une durée de réaction infinie (A_{∞}) est mesurée après adjonction d'une goutte de NaOH concentrée.

B/ ETUDE CINETIQUE DES SYSTEMES PVAm/ β CD NON GREFFES

Avant d'étudier l'activité catalytique des copolymères de la série PVACD, il est nécessaire de connaître les propriétés catalytiques de la β CD, de la PVAm et d'alkyles amines prises séparément, mais aussi de mélanges amines/ β CD. Ainsi, dans un premier temps, nous étudierons l'activité catalytique de la PVAm, mais aussi celle d'amines de petite taille. Ensuite, nous étudierons l'activité catalytique de la cyclodextrine ; et enfin, nous verrons comment les interactions que nous avons mises en évidence entre la PVAm et la β CD (liaisons hydrogène) auront des répercussions sur les propriétés catalytiques du mélange et de chacun pris séparément. Une fois ces questions éclaircies, ces résultats pourront nous servir de référence et nous renseigner sur l'opportunité de lier de façon covalente la cyclodextrine à la PVAm.

I ACTIVITÉ CATALYTIQUE DES AMINES ET POLYAMINES

La réaction d'hydrolyse du PNPA catalysée par des fonctions amines diverses montre une variation linéaire de la constante de vitesse en fonction de leur concentration (Figure 1 IV). La pente de la droite donne accès à la constante du second ordre ($l \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$).

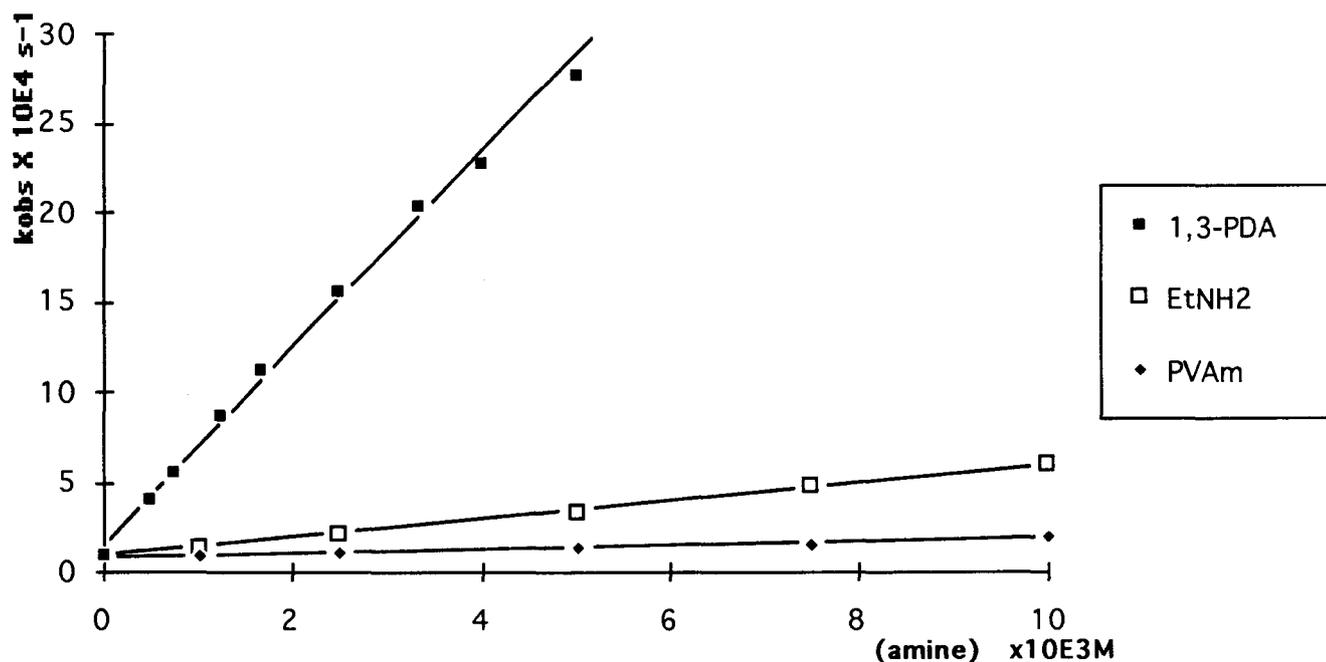


Figure 1.IV : Hydrolyse du PNPA par la PVAm, l'ethylamine et la 1,3-propanediamine.

Amine	k 10 ² M ⁻¹ s ⁻¹
PVAm	1,25 / 5 (a)
PAA	110 (b)
Et NH ₂	5,27
1,3-PDA	29,5
Pr NH ₂	39 (b)
b-PEI	16 (a)
l-PEI	1,7 (a)

Tableau 1.IV : Constantes de vitesse du second ordre d'hydrolyse du PNPA par différentes amines. Références : (a) = 3 ; (b) = 1.

Bien que la PVAm soit l'amine qui ait le plus fort taux de déprotonation au pH expérimental, son activité catalytique est la plus faible : la proximité des fonctions amines de la chaîne polymère est un désavantage pour l'accessibilité du substrat vers celles-ci³ ; ceci n'est le cas ni pour la PAA, ni pour les alkyles amines dont la mobilité et l'encombrement stérique leur permettent une approche plus facile de la fonction ester.

Le pKa des alkyles amines (> 10) est tel que la quasi totalité de celles-ci est protonnée au pH expérimental ; elles ne peuvent donc pas être responsables d'une attaque nucléophile sur la fonction ester, cependant elles induisent une accélération de la réaction supérieure à celle des polyamines. Le mécanisme de la réaction que nous proposons alors est basé sur le principe de l'existence d'une liaison hydrogène affaiblissant la fonction ester et une attaque simultanée d'un OH⁻ dont la concentration locale est accrue par la présence des fonctions amines chargées positivement.

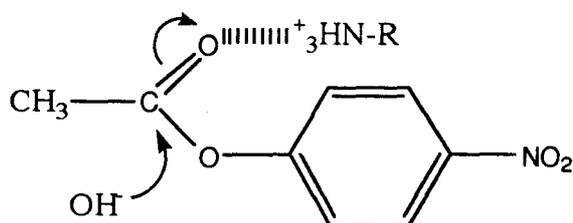


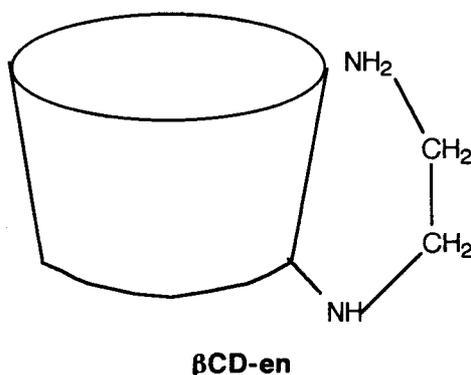
Figure 2.IV : Intermédiaire intervenant au cours de l'hydrolyse du PNPA par une alkylamine sous sa forme protonnée.

II INFLUENCE DE FONCTIONS AMINES SUR LES PROPRIETES CATALYTIQUES DE LA β CD - ASSOCIATION AMINE/CYCLODEXTRINE

1 Valeurs expérimentales

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique (Chapitre III), les réactions d'esterolyses catalysées par la β CD obéissent à la loi de *Michaelis-Menten* et l'ajout d'amines accélère l'étape de désacétylation de celle-ci et lui donne une efficacité proche de celle d'enzymes naturelles.

Afin de savoir si l'on observe la même coopérativité entre la β CD et la PVAm, nous avons procédé à des essais d'hydrolyse du PNPA par des mélanges PVAm/ β CD mais aussi $\text{EtNH}_2/\beta\text{CD}$. D'autre part, le greffage de l'éthylène diamine sur la β CD ($\beta\text{CD-en}$) a été réalisé (selon la méthode décrite par MATSUI⁴ pour nous fournir une molécule modèle des polymères de la série PVACD, et grâce à laquelle nous allons observer l'incidence apportée par une amine greffée comparativement aux mélanges amine/ β CD.



La Figure 3. IV montre l'évolution de la constante de vitesse mesurée k_{obs} en fonction de la concentration en βCD , en présence ou non de fonction amine : dans les 2 cas la loi de *Michaelis-Menten* est observée. Par conséquent il est possible de déterminer dans chaque cas les constantes cinétiques k_2 et K_m grâce au diagramme de *Lineweaver-Burk*.

Ces résultats sont réunis dans le Tableau 2.IV accompagnés de données trouvées dans la littérature.

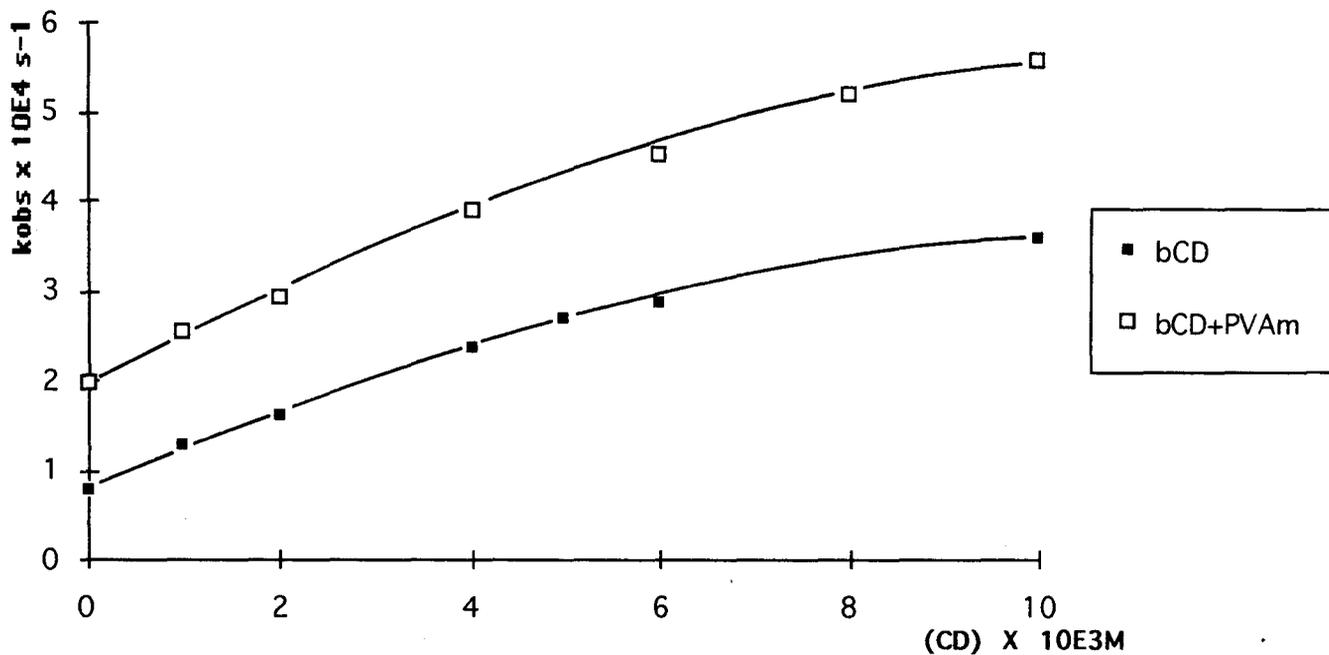


Figure 3. IV : Evolution de k_{obs} en fonction de la concentration en β CD seule ou en présence de PVAm 10^{-2}M .

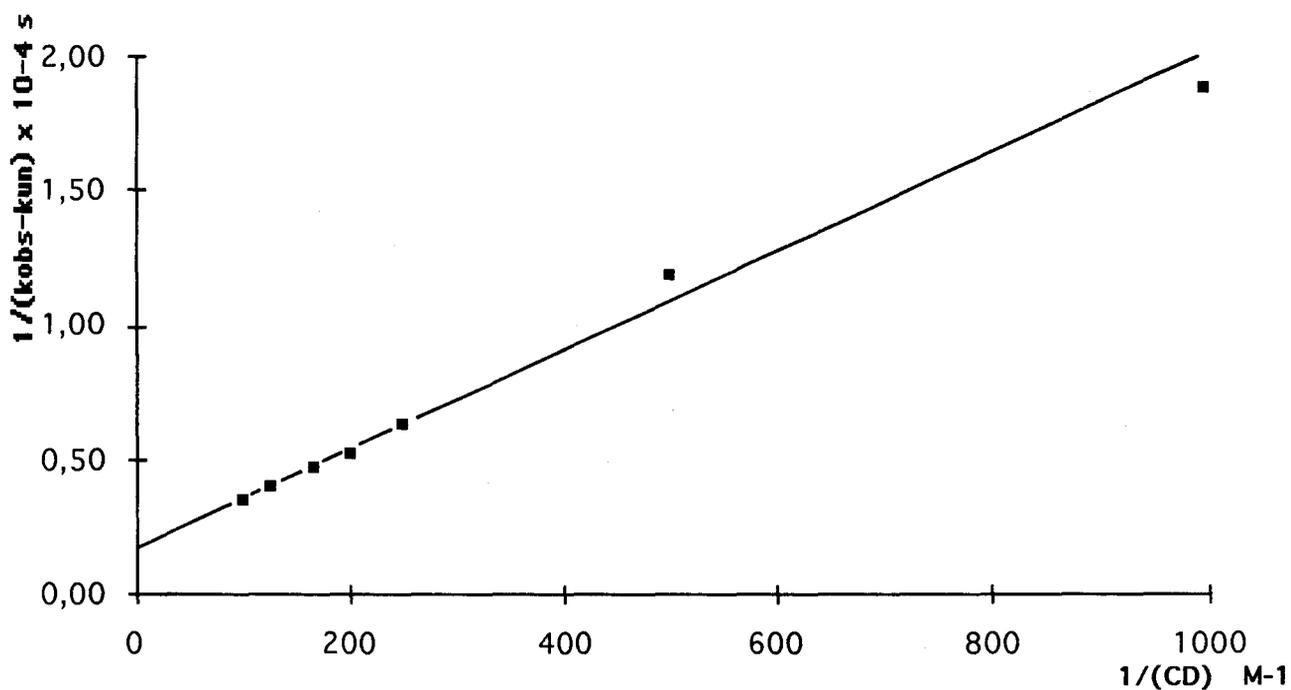


Figure 4.IV : Tracé de la droite de Lineweaver-Burk (pour la réaction catalysée par la β CD seule) à partir des données de la Figure 3.IV.

A partir des constantes k_2 , K_m , k_{un} , on peut déterminer :

- L' effet catalytique qui est le rapport de la vitesse de transformation du substrat sur la constante de *Michaelis-Menten* (k_2/K_m), ce qui revient à la constante de second ordre apparent de transformation du substrat.

- Le rapport des constantes de premier ordre k_2 et de pseudo premier ordre k_{un} (constante de vitesse de transformation du substrat en absence de catalyseur).

Catalyseur	k_2 $\times 10^3$ (s^{-1})	K_m $\times 10^3$ M	k_2/K_m $M^{-1} s^{-1}$	k_2/k_{un}
β CD	0,5	8,5	0,060	5,55
β CD (a)	0,99	8,3	0,119	-
β CD (b)	1,3	14,5	0,09	11
β CD(+EtNH ₂)	0,94	20	0,047	10,4
β CD(+PVAm)	0,77	18	0,042	8,55
β CD-en	125	16,2	7,72	1300
β CD-en (c)	450	14,5	31	-

Tableau 2.IV : Constantes k_2 et K_m pour réactions d'hydrolyse du PNPA par β CD seule ou associées à des amines greffées et non greffées. Références : (a) : 5 ; (b) : 1 ; (c) : 6.

2 Etude du complexe β CD/p-nitrophénolate

Afin de mesurer si la PVAm a un effet perturbateur sur le pouvoir d'encapsulation de la β CD, nous avons mesuré la constante de dissociation (K_d) du complexe β CD/p-nitrophénolate, qui a été choisi comme modèle du PNPA. Comme on le voit sur la Figure 5.IV, l'absorption maximale du p-nitrophénolate montre un glissement vers le rouge de 5 nm avec un point isobestique à 392 nm.

En supposant la formation d'un complexe 1-1 entre la β CD et le p-nitrophénolate, l'équation de *Benesi-Hildebrand* s'applique⁷ :

$$\frac{(CD)(S)}{\Delta A_{obs}} = \frac{(CD) + (S)}{\Delta \epsilon} + \frac{K_d}{\Delta \epsilon}$$

ΔA_{obs} est la variation d'absorption de la solution lors de l'addition de β CD, $\Delta \epsilon$ est la différence entre les coefficients molaires d'extinction du substrat libre et complexé.

En traçant $(CD)+(S)/\Delta A_{obs}$ en fonction de $(CD)+(S)$, on peut déterminer K_d qui est la valeur de $(CD)+(S)$ pour $(CD)+(S)/\Delta A_{obs} = 0$.

La valeur de K_d mesurée en présence de PVAm est identique à celle mesurée pour la β CD seule : $0,8 \cdot 10^{-4}$ mol/l.

Le complexe β CD/p-nitrophénolate n'est donc pas perturbé par la PVAm en solution.

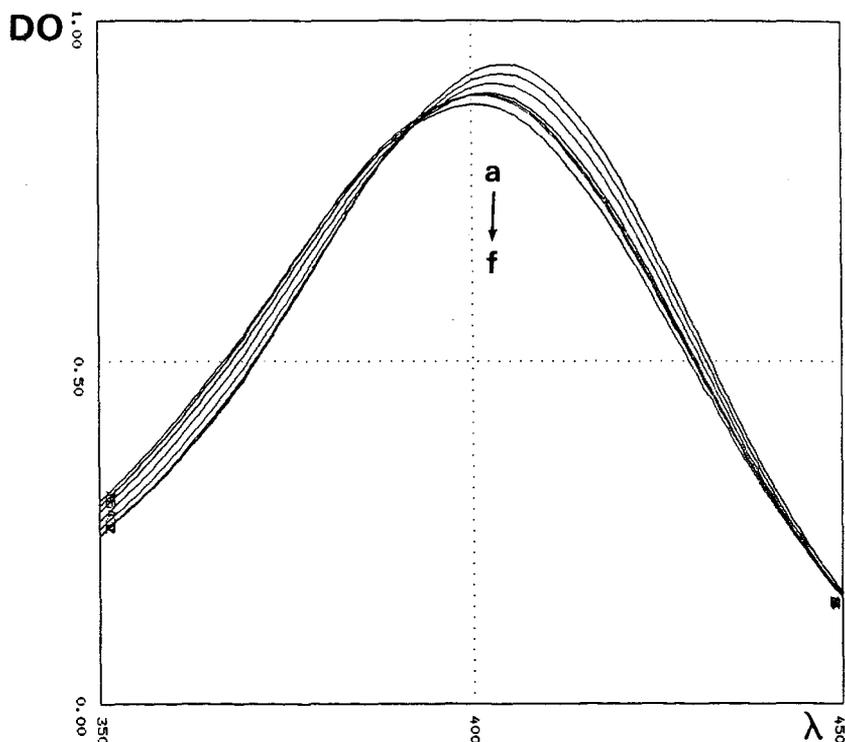


Figure 5.IV : Spectre d'absorption du p-nitrophénolate en présence de quantités croissantes de β CD. (β CD) = : a) $2 \cdot 10^{-4}$; b) $4 \cdot 10^{-4}$; c) $8 \cdot 10^{-4}$; d) $2 \cdot 10^{-3}$; e) $4 \cdot 10^{-3}$; f) $8 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

3 Interprétations

Malgré des conditions identiques, et plusieurs essais, les constantes k_2 et K_m que nous obtenons pour l'hydrolyse du PNPA par la β CD seule diffèrent de celles obtenues par SEO et al.¹.

Les résultats rapportés ci-dessus font apparaître que la PVAm et EtNH_2 ont une influence plutôt négative sur le pouvoir catalytique de la β CD (exprimé par le rapport k_2/K_m). La coopérativité observée par BENDER et KOMIYAMA⁸ n'est pas mise en évidence.

Si les 2 amines provoquent une légère augmentation de k_2 , leur effet défavorable vient de la déstabilisation du complexe (K_m double) : EtNH_2 peut pénétrer à l'intérieur de la cavité et jouer le rôle d'inhibiteur ; d'autre part, nous

avons établi précédemment l'existence d'interactions entre la PVAm et la β CD qui peuvent se traduire par une gêne stérique défavorisant la complexation du PNPA.

Le greffage de l'éthylène diamine sur la β CD lui apporte une nette amélioration de son pouvoir catalytique qui est caractérisé par une multiplication par 1000 de k_2 . D'après le modèle moléculaire de la β CD-en, nous pensons plutôt à une intervention de la fonction amine sur l'intermédiaire acyl-cyclodextrine qu'à une attaque directe de celle-ci sur la fonction ester qui se trouverait à l'opposé du point d'attache de l'amine sur la β CD et donc à une distance trop importante. Il est cependant légitime de s'interroger sur la position de la fonction hydroxyle qui serait acétylée : si celle-ci se trouve sur le même motif glucosidique que la fonction éthylène diamine ou si elle se trouve sur le motif diamétralement opposé. Dans ce dernier cas, la distance serait trop grande pour que l'amine intervienne pour la désacétylation.

Enfin, la mesure de K_d du complexe β CD/p-nitrophénolate en présence de PVAm ne nous a pas confirmé la déstabilisation du complexe β CD/PNPA obtenue par la méthode cinétique. En fait, ce complexe intervient non pas dans l'étape initiale, mais plutôt dans l'étape finale de cette réaction de type enzymatique (étape de libération du p-nitrophénolate). On peut conclure de cette expérience que la molécule modèle testée n'est pas comparable au PNPA vis à vis de la β CD, mais aussi que l'étape de libération du p-nitrophénolate n'étant pas affectée par la PVAm, n'est pas à l'origine de la diminution de l'activité catalytique de la β CD.

III ETUDE DES MODIFICATIONS DES PROPRIETES CATALYTIQUES DE LA PVAm PAR AJOUT DE β CD

1 Données cinétiques expérimentales

Après avoir observé la loi cinétique de 2ème ordre dans l'hydrolyse du PNPA par la PVAm ou autres alkyles amines (voir paragraphe I de cette partie), nous allons réaliser les mêmes expériences en présence de cyclodextrine et voir si les changements observés apportent d'autres renseignements sur les interactions.

Le Tableau 3.IV rapporte les mesures que nous avons effectuées sur la PVAm et EtNH₂, mais aussi sur la PAA que SEO et al.¹ ont étudié dans le même but que le nôtre. Dans les trois cas, on observe une situation différente : la β CD provoque une inhibition de l'activité catalytique de la PAA, c'est le contraire qui est observé avec la PVAm, et enfin il n'y a pas de changement significatif concernant EtNH₂

Amine	$k \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	
	sans β CD	avec β CD
PAA (a)	1,100	0,660
PVAm	0,012	0,017
Et NH ₂	0,053	0,055

Tableau 3.IV : Constantes d'hydrolyse du 2ème ordre en présence ou non de β CD. (a) : référence 1.

2 Interprétations

SEO^{1,2} a observé une diminution de 60% de la constante d'hydrolyse du PNPA par la PAA lorsque de la β CD est ajoutée dans le milieu, cette inhibition est expliquée par la complexation du PNPA par la β CD qui a pour effet de protéger celui-ci de l'attaque du polymère.

Au contraire, l'activité de la PVAm augmente en présence de β CD : les interactions PVAm/ β CD mises en évidence par viscosimétrie et par potentiométrie montrent que celles-ci sont intimement liées en solution ; le substrat complexé est donc également à proximité des fonctions amines du polymère, et donc plus exposé aux fonctions vinylamines.

IV CONCLUSION

La cinétique a mise en évidence les interactions entre PVAm et β CD : dans un sens, la PVAm inhiberait l'action catalytique de la β CD et dans l'autre sens, la β CD améliorerait celle de la PVAm. Ce comportement différent de celui rencontré avec la PAA, peut s'expliquer par la différence d'activité qui existe entre la PAA et la β CD d'une part, et d'autre part entre la PVAm et la β CD ; les valeurs de k_{obs} sont exprimées ci-dessous pour une concentration en catalyseur de 10^{-2}M :

Catalyseur	$k_{obs} \times 10^4 \text{ s}^{-1}$
β CD	3,9
PVAm	2
PAA (a)	85

Tableau 4.IV : Constantes du pseudo-premier ordre de l'hydrolyse du PNPA, par 3 systèmes catalytiques . (catalyseur) = 10^{-2}M . (a) : référence 1.

Etant donné l'écart de réactivité qui existe entre la PAA et la β CD, on comprend facilement pourquoi SEO observe une inhibition : les 2 systèmes catalytiques agissent de façon indépendante, le système le plus lent réduit l'efficacité du système le plus rapide. Manifestement, cet exemple ne reflète pas l'observation de BENDER et KOMIYAMA d'après laquelle l'activité catalytique de la β CD devrait être multipliée grâce aux fonctions amines.

La faible différence de k_{obs} observée entre β CD et PVAm ainsi qu'un rapport de réactivités inversé expliquent qu'on n'observe pas de similitude avec le cas précédent malgré la ressemblance entre les 2 polymères. Cependant on peut interpréter nos observations en suivant le même principe : le système le plus lent (la β CD) désactive le système le plus rapide (la PAA) et l'on peut aussi avancer d'après nos observations que le système le plus lent (la PVAm) est activé en présence de l'autre système (la β CD) qui aurait pour rôle de concentrer le substrat dans l'environnement du polymère.

Nous pouvons désormais conclure que les amines primaires, en tant que substituants de chaînes polymères, ne participent pas en tant que cocatalyseur aux réactions d'hydrolyses d'esters catalysées par la β CD. Ce rôle n'est accompli que par des amines dont la taille les autorise à pénétrer dans la cavité de l'acétyl- β -cyclodextrine en formant un complexe géométriquement favorable à la désacétylation (voir l'effet accélérateur apporté par la 1,4 diazabicyclo(2,2,2)octane dans le Chapitre III) ou encore dans le cas où l'amine est directement greffée sur la β CD (β CD-en).

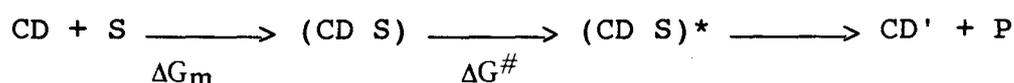
C/ APPROCHE THERMODYNAMIQUE DE L'HYDROLYSE DU PNPA PAR LE MÉLANGE β CD/PVAm

La cinétique d'une réaction dépend de paramètres thermodynamiques qui gèrent les déplacements des équilibres entre les différentes espèces en solution et dont la combinaison est plus ou moins favorable à l'aboutissement aux produits de la réaction. Précisément, dans le cas de la cinétique enzymatique, c'est le complexe enzyme/substrat qui génère le produit de la réaction. L'étude thermodynamique que nous entreprenons à présent consiste à chiffrer de façon séparée la spontanéité de formation du complexe (Energie libre de complexation ΔG_m), et d'autre part à déterminer le saut énergétique que doit franchir ce complexe pour former le complexe activé (Energie libre d'activation du complexe $\Delta G^\#$) dont dépend la constante de vitesse de formation des produits. Cette étude a été menée selon une approche identique à celle que nous venons d'employer pour l'étude cinétique et devrait nous permettre d'exprimer en d'autres termes les conclusions que nous en avons tirées.

I APPROCHE THEORIQUE

1 Mécanisme et explication thermodynamique de la réaction

La cinétique nous a permis de déterminer simultanément la constante de dissociation du complexe, que nous assimilons à K_m , puisque cette valeur a été mesurée relativement à la vitesse initiale de réaction ; puis k_2 qui est la constante du premier ordre relative à la réactivité du complexe d'inclusion (CD S). Du point de vue thermodynamique, une étape supplémentaire est ajoutée au mécanisme de la réaction : le complexe (CD S) se divise en 2 populations distinctes, la première se trouve à l'état fondamental (CD S) et la seconde à l'état excité (CD S)*. C'est ce dernier intermédiaire qui réagit. La vitesse de la réaction dépend donc de l'importance de la concentration en complexe activé qui dépend elle même du saut énergétique qui sépare les 2 états du complexe.



2 L'inclusion

La Figure 6.IV suivante illustre explicitement le mécanisme de formation du complexe substrat/cyclodextrine et permet de comprendre pourquoi un composé

organique en solution aqueuse vient spontanément pénétrer à l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine. Ce phénomène est la résultante d'une multitude d'interactions (substrat/solvant ; solvant/solvant ; CD/solvant etc...) qui conduisent à l'état thermodynamique le plus stable. Nous allons à présent détailler chacune de ces composantes et faire le lien entre la nature et la force de chaque type d'interactions et sa manifestation au point de vue énergétique.

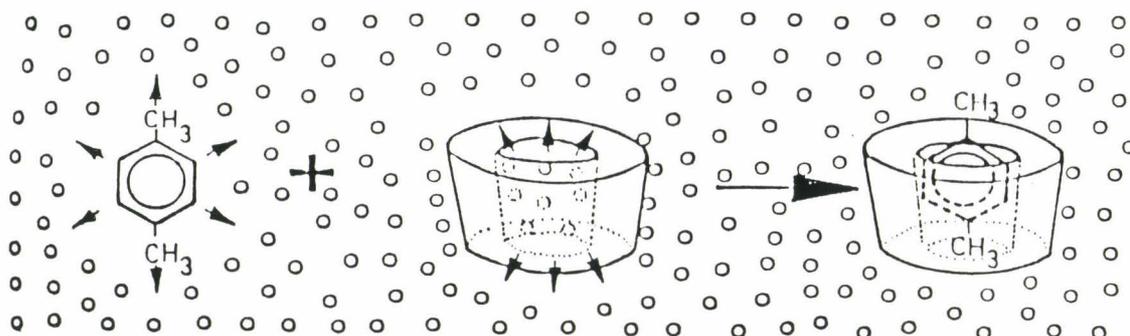


Figure 6.IV : Mécanisme de l'inclusion d'un composé aromatique en solution par la cyclodextrine. Les flèches matérialisent les interactions entre le solvant (H₂O) et les régions hydrophobes des molécules.

2.1 Mécanisme

La formation de complexes cyclodextrine/substrat comprend plusieurs étapes élémentaires^{9,10,11,12},

1) Les molécules d'eau s'échappent de la cavité de la cyclodextrine et acquièrent un niveau d'énergie correspondant à celui de l'état gazeux. En conséquence, les interactions de Van Der Waals et le nombre de liaisons hydrogène diminuent tandis que les degrés de liberté de translation et de rotation des molécules d'eau libérées augmentent.

2) La molécule invitée se libère de la couche d'eau qui l'enrobe et acquiert également un état différent. La couche d'eau se disperse et se réarrange.

3) La molécule invitée, considérée comme étant dans l'état d'un gaz parfait, entre à l'intérieur de la cavité vide et le complexe est stabilisé par des interactions de Van Der Waals, et dans certains cas par liaisons hydrogène. La molécule incluse possède alors une liberté de rotation d'une seule dimension.

4) Les molécules d'eau expulsées se réarrangent et créent entre elles des liaisons hydrogène. Les changements d'entropie et d'enthalpie sont ceux habituellement considérés pour l'exemple classique de la condensation de l'eau.

5) La structure de l'eau est restaurée autour de la partie du substrat qui reste en contact avec le solvant, et intégrée à la couche d'eau hydratant la cyclodextrine.

2.2 Règles thermodynamiques de l'inclusion

Le Tableau 4.IV¹³ indique que d'une manière générale, l'enthalpie de formation du complexe (CD S) est de signe négatif (une augmentation de température conduit à le déstabiliser), tandis que la variation d'entropie peut être tantôt positive, tantôt négative.

Molécule invitée	ΔG kJ mol ⁻¹	ΔH kJ Mol ⁻¹	ΔS J mol ⁻¹ K ⁻¹
Phénol	-19,2 (5,8)	-10,9 (0,8)	+29,2
Acide benzoïque	-12,1 (2,1)	-31,8 (11,3)	-66,9
Acide Methyl-3-benzoïque	-40,1 (0,4)	-48,9 (5)	-29,2
p-nitrophénoï	-17,1 (9,6)	-43,9 (10,4)	-87,8

Tableau 4.IV : Constantes thermodynamiques d'encapsulation de diverses molécules par la β CD à 298,1° K. Entre parenthèses, l'incertitude sur les mesures.

Le signe de ΔS_m varie selon le substrat indiquant que plusieurs forces sont impliquées dans la formation des complexes¹⁴. A partir des différentes déterminations calorimétriques de ΔH_m et ΔS_m ^{15,16,17,18}, la Figure 7.IV illustre le tracé de ΔH_m en fonction de ΔS_m ¹⁹, on observe une relation linéaire : il y a une compensation entre l'enthalpie et l'entropie^{20,21,22,23}.

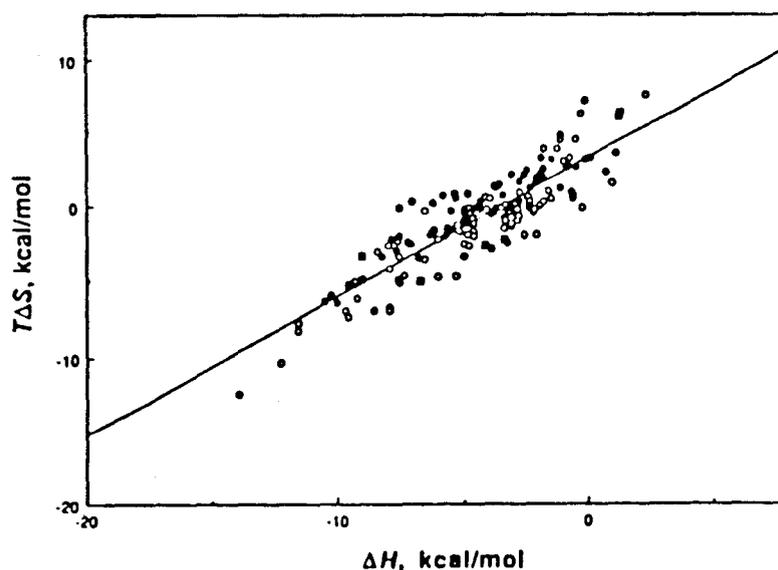


Figure 7.IV : Diagramme de corrélation entre l'enthalpie et l'entropie de formation de diverses supermolécules formées à partir de l' α CD. Référence 20.

Lorsque ΔH_m est faible, peu de chaleur est libérée au cours de la complexation, la valeur de ΔS_m mesurée est alors grande indiquant que le système a un plus grand degré de désordre après la formation du complexe. Si ΔH_m est grand, l'entropie mesurée est alors négative et la formation du complexe conduit à un degré d'ordre supérieur²⁴.

L'exemple suivant illustre ceci :

Si l'on considère les données thermodynamiques concernant la complexation du phénol et du p-nitrophénol du Tableau 4.IV, l'enthalpie de formation du complexe du phénol est faible et son entropie est positive ; ces valeurs diffèrent des celles relatives au p-nitrophénol. On constate cependant que l'énergie libre de complexation a une grandeur comparable. Le signe négatif de ΔG_m prouve la spontanéité de la formation de la supermolécule.

De plus, cet exemple illustre le fait que la connaissance isolée de ΔH_m ou ΔS_m ne peut donner une idée de la stabilité du complexe.

Quels événements au niveau moléculaire peuvent faire varier l'entropie lors de la réunion de la molécule hôte et de la molécule invitée ? Les molécules d'eau qui forment une couche ordonnée autour du substrat sont libérées dans le milieu et contribuent à augmenter le désordre ($\Delta S_m > 0$). Dans le même temps, substrat et cyclodextrine perdent une partie de leurs degrés de liberté de rotation et de translation ; de plus, les interactions substrat-solvant et cavité-solvant sont annulées pour créer des interactions complexe-solvant d'intensité inférieure et provoquent une diminution de l'entropie du système ($\Delta S_m < 0$). De la combinaison de tous ces effets contraires résulte une valeur absolue de ΔS_m qui est faible et dont le signe est positif ou négatif selon la prédominance du type d'interaction qui est mis en jeu au cours de la complexation du substrat considéré.

La variation d'enthalpie dépend également de plusieurs facteurs : la dispersion de la couche d'eau structurée entourant la molécule hydrophobe provoque une diminution des liaisons hydrogènes dans le système, ceci est énergétiquement défavorable. Il y a compensation par l'expulsion des molécules d'eau d'énergie élevée incluses dans la cavité hydrophobe et qui peuvent alors augmenter la quantité de liaisons Hydrogène (solvant-solvant) dans le système¹³. ΔH_m est de signe négatif dans la majorité des cas. On peut évoquer l'expérience classique où l'on dissout un composé hydrophobe dans l'eau qui est un exemple de réaction endothermique ; l'encapsulation de ce composé par la cyclodextrine revient à l'isoler du milieu aqueux pour le fixer dans un environnement plus compatible : cette étape est donc exothermique.

3 Manifestations moléculaires de l'énergie d'activation du complexe

Après avoir défini les lois thermodynamiques auxquelles obéit la formation de la supermolécule, considérons maintenant l'énergie libre d'activation du complexe que l'on peut définir comme étant le saut d'énergie à franchir pour former le complexe dit activé lequel fournit les produits de réaction.

L'énergie d'activation du complexe est par définition de signe positif. Cette transition peut être accompagnée d'une augmentation d'entropie ($\Delta S^\ddagger > 0$) : l'organisation des molécules d'eau entourant le complexe, est perturbée par la mise en position du substrat vis à vis de la fonction hydroxyle avec laquelle il va réagir, et du changement de polarité et de géométrie de la fonction ester qui s'apprête à subir l'attaque nucléophile et à prendre une configuration de type sp_3 ²⁵. D'autre part cette tendance est compensée par la perte de degrés de liberté relative à cette position précise que le substrat doit prendre pour pouvoir réagir.

Les conditions stériques particulières que nous venons d'évoquer provoquent une variation d'enthalpie défavorable puisque le complexe à l'état fondamental est dans une conformation dans laquelle le substrat est idéalement complexé, sa position "réactive" l'oblige à modifier son degré de pénétration à l'intérieur de la cavité.

4 Transformations mathématiques des données cinétiques

Sachant que :

- K_m est la constante de dissociation du complexe (CD S),
- k_2 est la constante de vitesse du 1er ordre de formation de P à partir de (CD S)*

$$d(P)/dt = k_2 (CD S^*)$$

L'énergie libre de formation du complexe ΔG_m est obtenue à partir de la dépendance de K_m avec la température²⁶ et est obtenue par le développement mathématique suivant :

$$\begin{aligned} K_m &= e^{(\Delta G_m/RT)} \\ &= e^{(\Delta H_m - T\Delta S_m/RT)} \end{aligned}$$

$$RT \ln K_m = \Delta H_m - T\Delta S_m$$

ΔH_m et ΔS_m sont respectivement la variation d'enthalpie et d'entropie de formation du complexe.

ΔS_m est mesurée à partir de la pente de la droite $R\ln K_m = f(T)$ et ΔH_m , à partir de la pente de la droite $R\ln K_m = f(1/T)$.

Nous avons préféré cette double exploitation car la précision d'une grandeur obtenue sur la mesure d'une pente est plus précise que celle obtenue par extrapolation à l'ordonnée à l'origine.

Quant à l'énergie libre d'activation du complexe, elle est obtenue par la relation thermodynamique²⁷ :

$$\begin{aligned}\Delta G^\# &= RT\ln(kT/hk_2) \\ &= \Delta H^\# - T\Delta S^\#\end{aligned}$$

où - k est la *constante de Boltzmann* : $k = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$

- h est la *constante de Planck* : $h = 6,62 \cdot 10^{-34} \text{ J.s}$

$\Delta H^\#$ et $\Delta S^\#$ représentent respectivement l'enthalpie et l'entropie d'activation du complexe.

$\Delta S^\#$ est obtenue à partir de la pente de la droite $R\ln(kT/hk_2) = f(T)$

$\Delta H^\#$ est obtenue à partir de la pente de la droite $R\ln(kT/hk_2) = f(1/T)$

Comme précédemment, le traitement des pentes offre une précision accrue sur ces valeurs.

II RESULTATS EXPERIMENTAUX

1 Données cinétiques

Les constantes de vitesse d'hydrolyse du PNPA non catalysée, catalysée par la β CD et par un mélange β CD+PVAm ont été mesurées à différentes températures et les constantes cinétiques k_2 et K_m (Tableau 5.IV) ont pu être obtenues par les diagrammes de *Lineweaver-Burk* (Figure 8.IV).

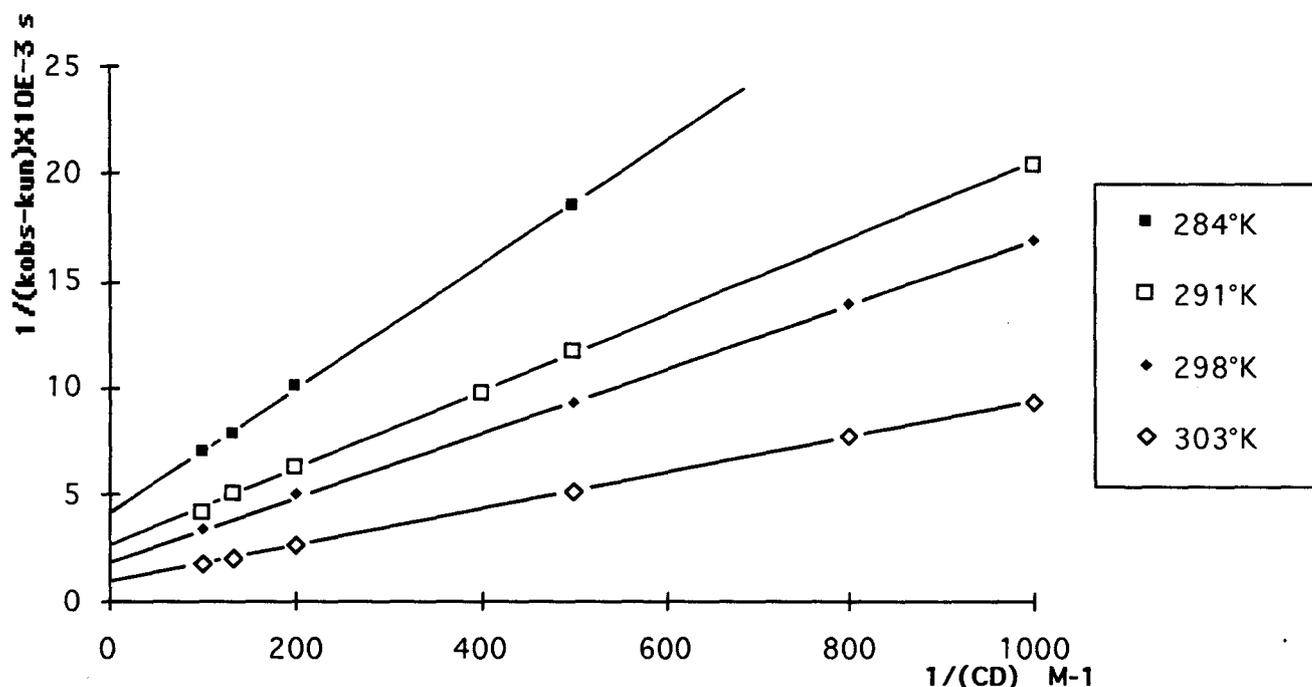


Figure 8.IV : Diagramme de Lineweaver-Burk pour l'hydrolyse du PNPA par la β CD à différentes températures.

T °K	β CD		β CD+PVAm	
	$k_2 \times 10^4 \text{s}^{-1}$	$K_m \times 10^3 \text{M}$	$k_2 \times 10^4 \text{s}^{-1}$	$K_m \times 10^3 \text{M}$
284	2,36	6,78	2,1	5,5
291	3,9	7,14	4,34	11
298	5	7,41	7,7	18,2
303	-	-	12,5	20
308	10	8,33	-	-

Tableau 5.IV : Constantes cinétiques de l'hydrolyse du PNPA catalysée par la β CD seule ou en présence de PVAm à diverses températures.

2 Influence de la PVAm sur la formation du complexe

L'augmentation de K_m en fonction de la température, indique une déstabilisation du complexe CD/PNPA et confirme le signe négatif de ΔH_m que nous évoquions précédemment.

La relation $\Delta G_m = RT \ln K_m$ nous permet de mesurer ΔH_m et ΔS_m : les résultats sont répertoriés dans le Tableau 6.IV :

	β CD	β CD+PVAm	α CD (a)
ΔH_m kJ.mol ⁻¹	-6,3 (1,8)	-60 (12)	-20,9
ΔS_m J.mol ⁻¹ K ⁻¹	+19,5 (6,2)	-170 (40)	-35,1
ΔG_m kJ.mol ⁻¹	-12,1	-9,35	-10,45

Tableau 6.IV : Constantes thermodynamiques de complexation du PNPA par l' α CD et la β CD seule et en présence de PVAm. (a) : référence 20. ΔG_m est calculée pour 298°K . Entre parenthèses, l'incertitude sur les mesures.

La complexation du PNPA par la β CD est caractérisée par une variation d'enthalpie assez faible et qui est compensée par une variation favorable de l'entropie. La complexation du même substrat par l' α CD, si elle est caractérisée par des variation d'entropie et d'enthalpie de valeurs tout à fait différentes, présente une énergie libre de complexation qui n'est que légèrement inférieure (Ceci vérifie en partie le fait que l'activité catalytique de l' α CD est inférieure à celle de la β CD vis à vis du PNPA). La règle de compensation entropie/enthalpie est vérifiée.

L'ajout de PVAm dans le milieu modifie légèrement ΔG_m qui devient un peu moins favorable. On note cependant une multiplication par 10 de ΔH_m qui est compensée par une variation d'entropie négative importante. La PVAm est donc un obstacle à la formation du complexe : les interactions entre le polymère et la CD que nous avons mises en évidence par ailleurs sont probablement à l'origine d'un encombrement stérique gênant l'accessibilité de la cavité.

3 Influence de la PVAm sur l'activation du complexe

A partir des données cinétiques énoncées dans Tableau 5.IV, $\Delta G^\#$, $\Delta H^\#$ et $\Delta S^\#$ ont été calculées d'après la relation $\Delta G^\# = RT \ln(kT/hk_2)$ et sont répertoriées dans le Tableau 7. IV :

	β CD		β CD + PVAm
ΔH^\ddagger kJ mol ⁻¹	+56,4 (a)	+41,3 (6)	+52,1 (10)
ΔS^\ddagger J K ⁻¹ mol ⁻¹	-112 (a)	-169 (19)	-87 (6)
ΔG^\ddagger kJ mol ⁻¹	+89,9 (a)	+91,7	+78

Tableau 7.IV : Constantes thermodynamiques relatives à l'énergie d'activation du complexe β CD/PNPA en présence ou non de PVAm. Entre parenthèses, l'incertitude de la mesure. ΔG^\ddagger est calculée pour 298°K . (a) : Référence 28.

La diminution de ΔG^\ddagger en présence de PVAm est le résultat de 2 composantes antagonistes :

- La variation d'enthalpie d'activation du complexe est positive dans les deux cas mais on peut remarquer que celle-ci est plus défavorable en présence de PVAm. Toutefois l'amplitude de la variation d'entropie est inférieure en présence de PVAm et induit une énergie libre d'activation plus favorable. ΔS^\ddagger est donc le facteur déterminant au cours de cette étape. Le système déjà stabilisé par les liaisons hydrogène (entre la PVAm et la β CD) perdrait moins de degrés de liberté et gagnerait alors moins d'entropie. Le bilan est tel que la PVAm facilite l'activation de la supermolécule.

Ces résultats permettent d'expliquer l'évolution des valeurs de k_2 et K_m mesurées précédemment (voir Tableau 5.IV) : l'augmentation de k_2 en présence de PVAm est en accord avec la diminution de l'énergie d'activation (ΔG^\ddagger inférieur) ; tandis que l'augmentation de K_m est expliquée par la supériorité de ΔG_m en présence de PVAm.

4 Bilan des deux étapes précédentes

Nous venons d'établir l'étude thermodynamique séparée de l'étape de complexation puis d'activation du complexe. La première a démontré que la PVAm gêne la formation du complexe et la seconde révèle que l'activation du complexe est plus facile. Bien que cette interprétation ne soit pas thermodynamiquement rigoureuse étant donné que ΔG_m est exprimée en kJ/mol de substrat et que ΔG^\ddagger en kJ/mol de complexe, l'addition algébrique des grandeurs thermodynamiques de

chacune des deux étapes peut être faite pour obtenir ΔG_T , ΔH_T et ΔS_T relatives au passage direct des 2 molécules séparées au complexe activé : $CD + S \longrightarrow (CD S)^*$

	βCD	$\beta CD + PVAm$
ΔH_T $kJ mol^{-1}$	35 (8)	-7,9 (22)
ΔS_T $J mol^{-1} K^{-1}$	-149,5 (25)	-257 (46)
ΔG_T $kJ mol^{-1}$	79,5 (32)	67,6 (68)

Tableau 8.IV : Constantes thermodynamiques relatives à la réaction $CD+S \longrightarrow (CD S)^*$
Valeurs calculées à partir des données des Tableaux 6.IV et 7.IV . ΔG_T à 298°K, entre parenthèses l'incertitude sur le calcul.

L'incertitude sur ΔG_T ne peut permettre de tirer quelque conclusion que ce soit quant à la variation d'énergie libre dans les deux systèmes. La variation d'entropie nous indique toutefois que la présence de polymère fige davantage l'ordre du système ce qui a pour conséquence d'annuler l'effet favorable qu'il exerce sur l'enthalpie de formation de l'intermédiaire réactionnel.

5 Mesure de l'énergie d'activation de la réaction par la loi d'Arrhénius

Nous venons de déterminer les constantes thermodynamiques intervenant au cours des étapes caractéristiques d'une cinétique de type enzymatique. Afin de mesurer l'énergie d'activation de la réaction catalysée par la PVAm ou non catalysée, nous avons appliqué la méthode classique qui consiste à mesurer la constante de vitesse du pseudo-premier ordre à différentes températures et de calculer ΔE , l'énergie d'activation par la loi d'Arrhénius.

Bien que cette méthode ne soit pas rigoureusement adaptée aux réactions de type enzymatique puisque, contrairement à celle que nous venons d'exploiter dans le paragraphe précédent, elle ne tient pas compte des étapes intermédiaires qui conduisent à la formation des produits ; nous avons quand même exploité celle-ci dans le cas de l'hydrolyse du PNPA par la cyclodextrine. L'énergie d'activation "globale" qui est mesurée n'a donc pas une valeur qui est rigoureuse, mais pourra quand même être considérée comme référence par rapport aux autres mesures.

$$k = k_0 e^{-(\Delta E/RT)}$$

$$\ln k = -\Delta E/RT + \ln k_0$$

k est la constante du pseudo-premier ordre mesurée à la température T (en °K)

k_0 est le *facteur préexponentiel* ou *facteur de fréquence*.

Le tracé de $\ln k$ en fonction de $1/T$ nous donnera par la pente de la droite la valeur de ΔE (Figure 9.IV).

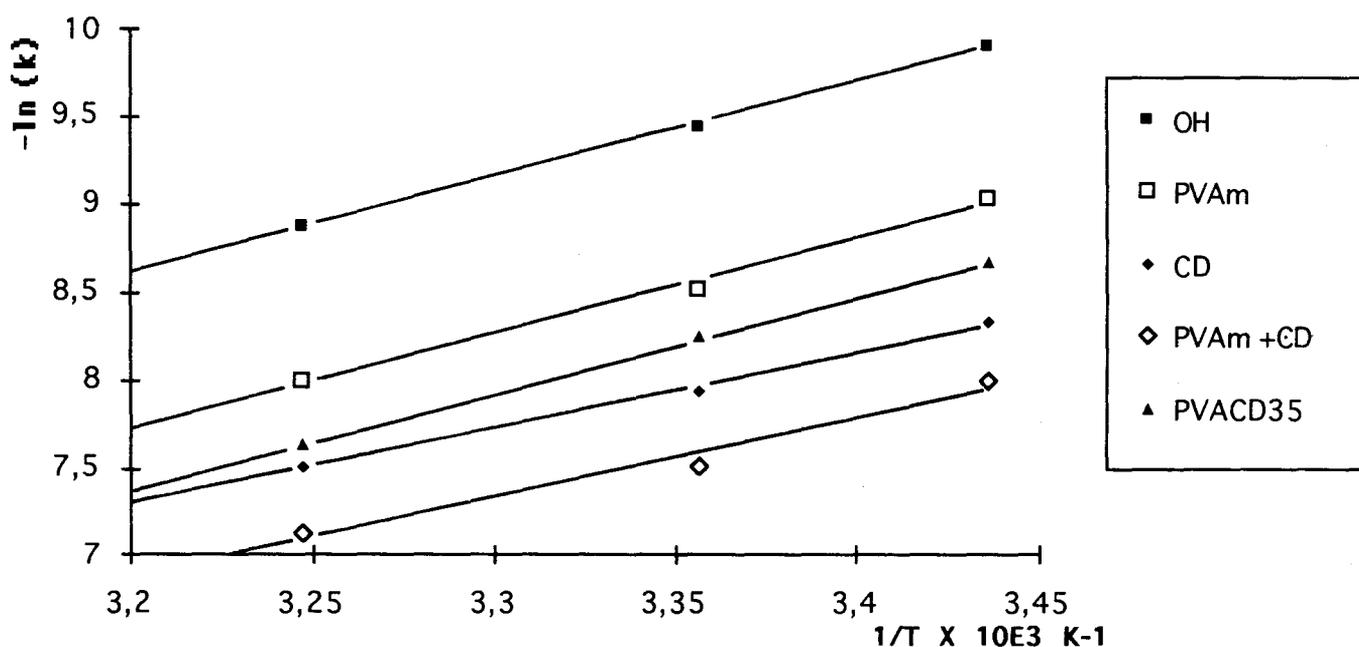


Figure 9.IV : Diagramme d'Arrhénius pour la réaction d'hydrolyse du PNPA non catalysée et catalysée.

Catalyseur	ΔE kJ·mol ⁻¹
aucun	45,2 (3)
PVAm (10 ⁻² M)	45 (5)
β CD (10 ⁻² M)	36,4 (4)
PVAm+ β CD (10 ⁻² M+10 ⁻² M)	38,2 (10)
PVACD35 (10 ⁻² M)	45,1 (1)

Tableau 9.IV : Energies d'activation des réactions d'hydrolyse du PNPA par divers catalyseurs. Entre parenthèses, l'incertitude sur les mesures.

ΔE a été calculé pour chaque cas à partir des pentes des droites de la Figure 9.IV.

Le Tableau 9.IV indique que les variations de l'énergie d'activation sont assez faibles et n'autorisent pas à en tirer de conclusions franches. On peut constater que

la PVAm ne modifie pas ΔE , que la β CD provoque sa diminution et que l'énergie d'activation de l'hydrolyse catalysée par le mélange PVAm/ β CD serait une moyenne arithmétique des deux précédentes.

En revanche, le facteur qui intervient de façon plus évidente, d'après la Figure 9.IV est le *facteur de fréquence* k_0 que l'on pourrait évaluer par extrapolation des droites à l'ordonnée à l'origine : cette constante propre à chaque système catalyseur serait supérieure à celle observée pour la réaction non catalysée. Plus concrètement, l'activité des systèmes aminés que nous avons étudié pour catalyser l'hydrolyse du PNPA est due à la structure des polymères qui favorise la formation de complexes de transition, cependant ils n'interviennent pas au niveau de l'étape de l'hydrolyse par elle-même puisque l'énergie d'activation est identique à celle de la réaction non catalysée. PSHEZHETSKII et al.²⁹ n'ont également observé aucune diminution de l'énergie d'activation des réactions d'hydrolyses d'esters catalysées par des PEI substituées par divers radicaux hydrophobes, en revanche ils ont rapporté que l'efficacité de leurs systèmes était également due à la modification du facteur pré-exponentiel.

D/ ETUDE CINETIQUE DES SYSTEMES PVAm- β CD GREFFES

I MESURES ET EXPLOITATION DES MESURES

Les conditions expérimentales sont identiques à celles que nous avons utilisées pour le mélange PVAm/ β CD.

Etant donné que la cinétique de l'hydrolyse du PNPA catalysée par les polymères de la série PVACD suit la loi de *Michaelis-Menten* (Figure 10.IV), les constantes k_2 et K_m sont calculées suivant le principe énoncé précédemment.

II RESULTATS EXPERIMENTAUX

Le tracé de k_{obs} en fonction de la concentration en unités monomères est représentée sur la Figure 10.IV ci-dessous :

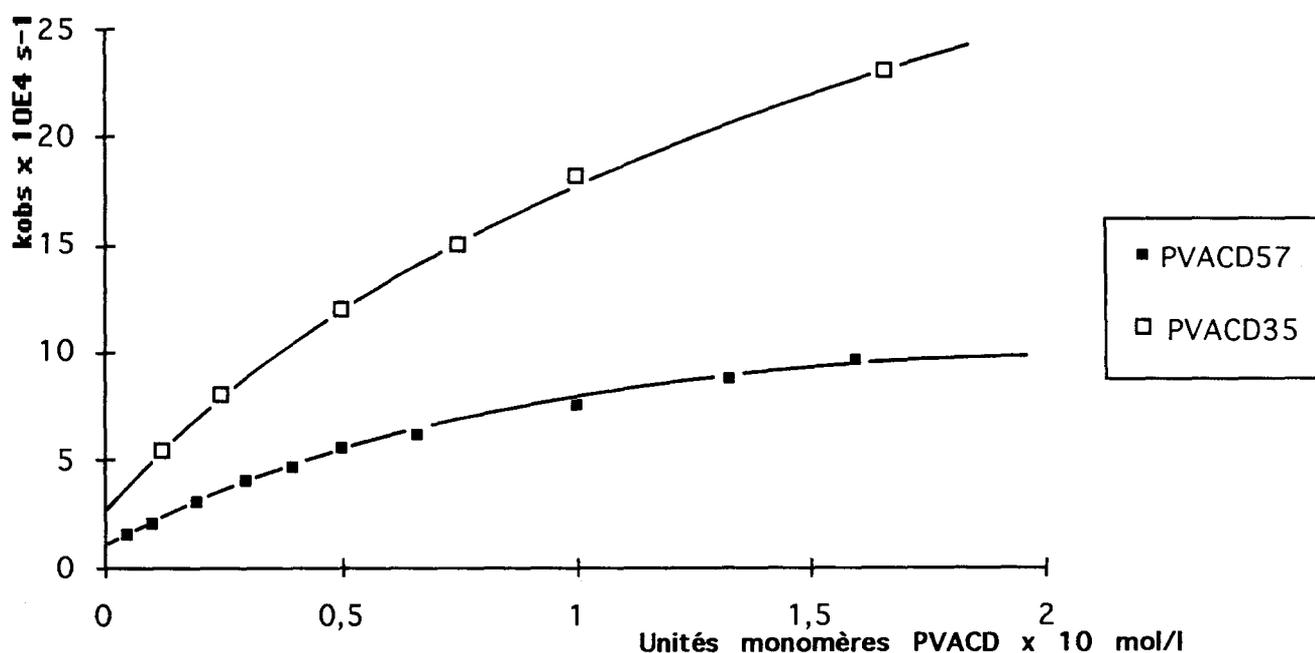


Figure 10.IV : Evolution de la constante d'hydrolyse du pseudo-premier ordre de l'hydrolyse du PNPA en fonction de la concentration en unités monomères de catalyseur PVACD57 et PVACD35.

Cette courbe indique que malgré un taux de motifs porteurs de cyclodextrine très faible, on observe une cinétique de type *Michaelis-Menten* ; ceci nous permet donc déjà de constater que malgré sa faible concentration, c'est la cyclodextrine qui impose la vitesse de réaction. Aussi, nous allons dans les expériences suivantes nous

en tenir à rapporter la concentration en catalyseur à la concentration correspondante en cyclodextrine. Ceci nous permettra de pouvoir comparer nos résultats avec ceux de SEO^{1,2} et HARADA²⁸ qui considèrent leurs catalyseurs comme de la cyclodextrine polymérisée plutôt que comme un polymère support de cyclodextrine.

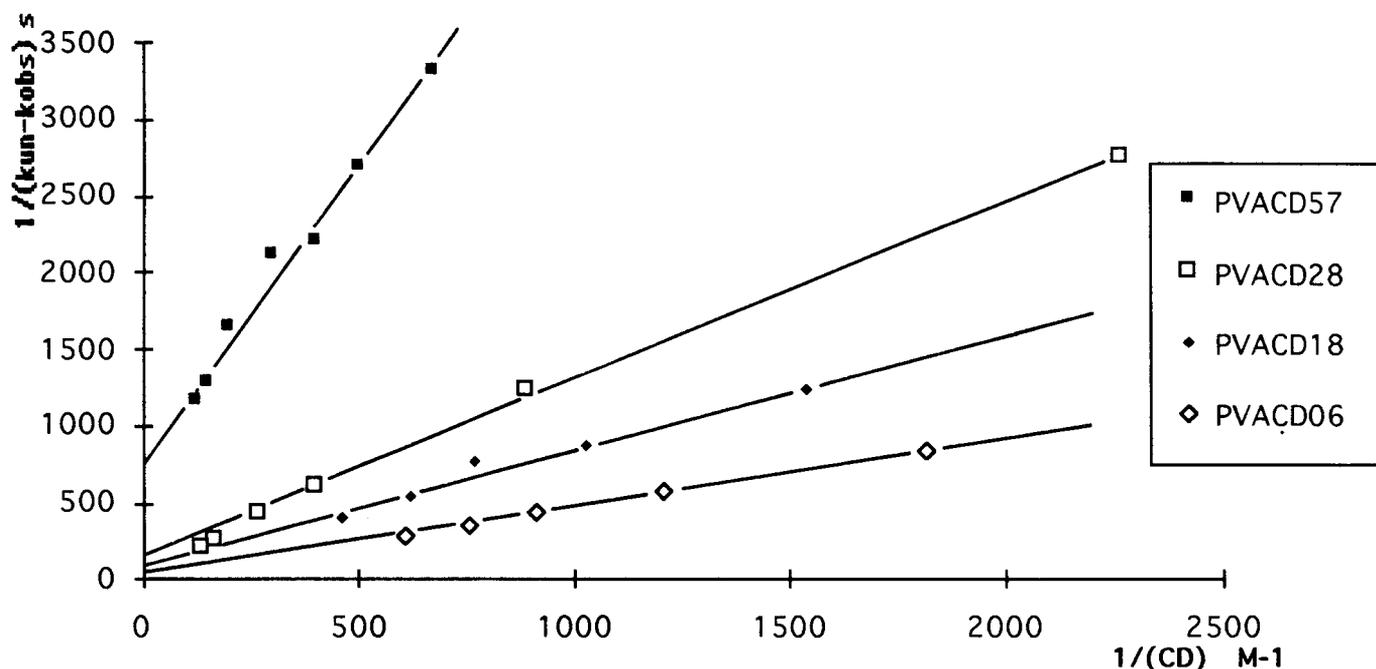


Figure 11.IV : Droites de Lineweaver-Burk pour l'hydrolyse du PNPA avec différents catalyseurs.

La Figure 11.IV représente les droites de Lineweaver-Burk pour des catalyseurs dont le taux de substitution varie, les constantes cinétiques que l'on en retire sont rassemblées dans le Tableau 10.IV, accompagnées de celles des systèmes de référence et de la polyallyl-cyclodextrine (PAACD) de SEO^{1,2} ou de la polyacryloyle-cyclodextrine (poly-CD-A) de HARADA²⁸.

Catalyseur	DS %	k_2 $\times 10^3 \text{ s}^{-1}$	K_m $\times 10^3 \text{ M}$	k_2/K_m $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	NH_2/CD
PVACD57	5	1,6	7,1	0,22	19
PVACD35	2	6	4,5	1,30	49
PVACD28	1,5	9	11,5	0,78	66
PVACD18	0,9	11	8,3	1,33	110
PVACD06	0,3	24	10,5	2,28	330
βCD	-	0,5	8,5	0,059	-
$\beta\text{CD} + \text{PVAm}(10^{-2}\text{M})$	-	0,77	18,2	0,042	-
Poly-CD-A (a)	100	22	11	0,21	-
PAACD (b)	52	22,8	5,15	4,43	0,92
(c)	46	47,7	9,5	5	1,17
(c)	77	66,1	17,1	3,87	0,43

Tableau 10.IV : Constantes cinétiques de l'hydrolyse du PNPA par différents catalyseurs porteurs de cyclodextrine. Références : (a) : 28 ; (b) : 1 ; (c) : 2.

III INTERPRETATION DES RESULTATS

En consultant le Tableau 10.IV, on peut voir que le rapport k_2/K_m des polymères de la série PVACD est supérieur à celui que nous avons mesuré pour la cyclodextrine seule ou pour les mélanges $\beta\text{CD} + \text{PVAm}$ et sont du même ordre que ceux qui sont rapportés pour les autres polymères dont le taux de greffage est très supérieur. En ce qui concerne l'amélioration de l'activité catalytique du système greffé par rapport au mélange, elle provient à la fois de la stabilisation du complexe $\beta\text{CD-PNPA}$ et de l'accélération de l'étape d'hydrolyse. Tout comme SEO l'a démontré, ce rapport augmente alors que DS décroît, mais dans notre cas, nous observons une évolution plus régulière des constantes k_2 et K_m prises séparément. La Figure 12.IV indique que si K_m fluctue autour d'une valeur moyenne pour chacun des PVACD, en revanche, on constate que k_2 diminue nettement alors que DS augmente.

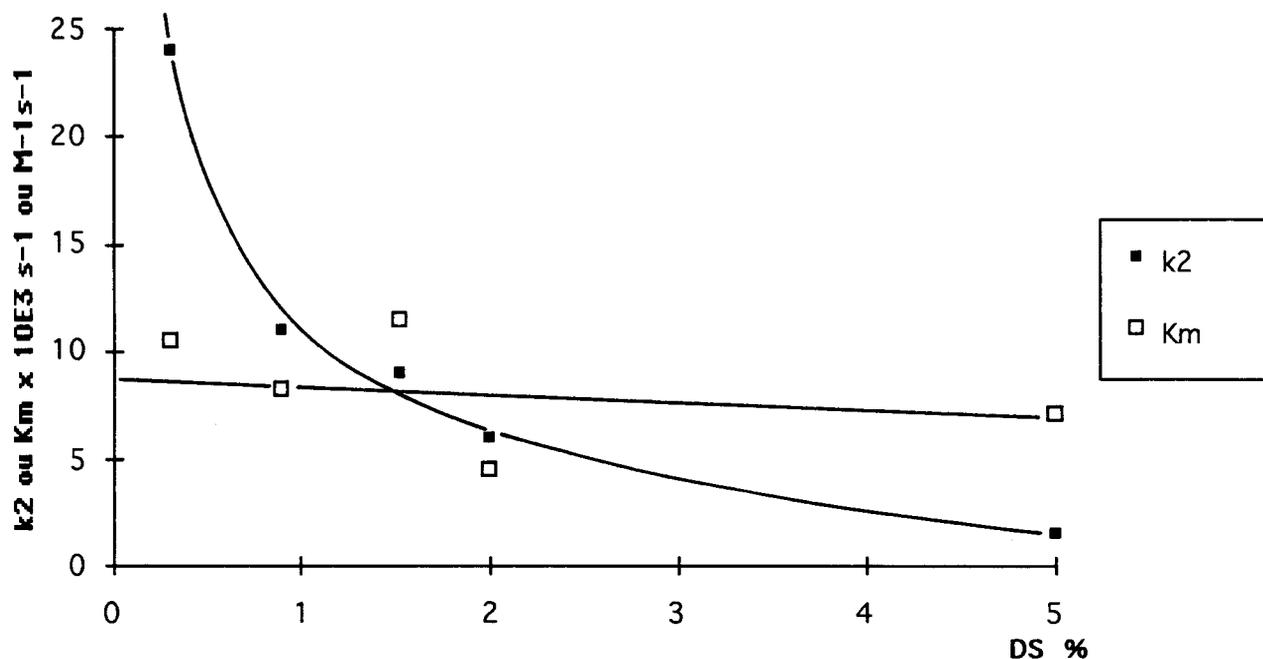


Figure 12.IV : Variation de k_2 et K_m en fonction de DS pour l'hydrolyse du PNPA .

De ceci, on peut en déduire que c'est k_2 qui est responsable de la variation du rapport k_2/K_m ; l'étape d'hydrolyse est l'élément clé de l'accélération de la réaction tandis que l'étape de complexation est peu affectée. L'accélération de la réaction qui est de l'ordre de 5 à 50 fois celle des systèmes non greffés a donc pour origine la formation de la liaison covalente qui relie la β CD au polymère et qui a pour conséquence la hausse de la constante k_2 que nous attribuons à l'attaque nucléophile des fonctions amines libres sur la fonction ester du PNPA inclus dans la cavité de la β CD. Nous pouvons par conséquent conclure qu'il existe un effet coopératif entre la fonction amine nucléophile et la cavité de la cyclodextrine. D'autre part, la participation des fonctions amines devient évidente quand on compare l'activité des catalyseurs de la série PAACD ou PVACD à celle du poly-CD-A qui malgré 100% de motifs β CD montre une accélération assez modeste (qui est attribuée selon HARADA²⁸ à la forte concentration locale en fonctions hydroxyles).

Nous avons pu observer que le mécanisme de la réaction d'hydrolyse est différent selon que la β CD est greffée ou non sur le polymère, en étudiant la cinétique de l'hydrolyse du PNPA catalysée par un mélange de PVAm et de β CD dont le rapport molaire β CD/ NH_2 correspond à celui du polymère greffé PVACD35. Les courbes représentées sur la Figure 13.IV sont révélatrices du mode d'intervention différent des deux systèmes catalyseurs : la courbe correspondant au système greffé montre

que la réaction suit la loi de *Michaelis-Menten*, tandis que la droite relative au mélange indique la cinétique suit une loi de second ordre.

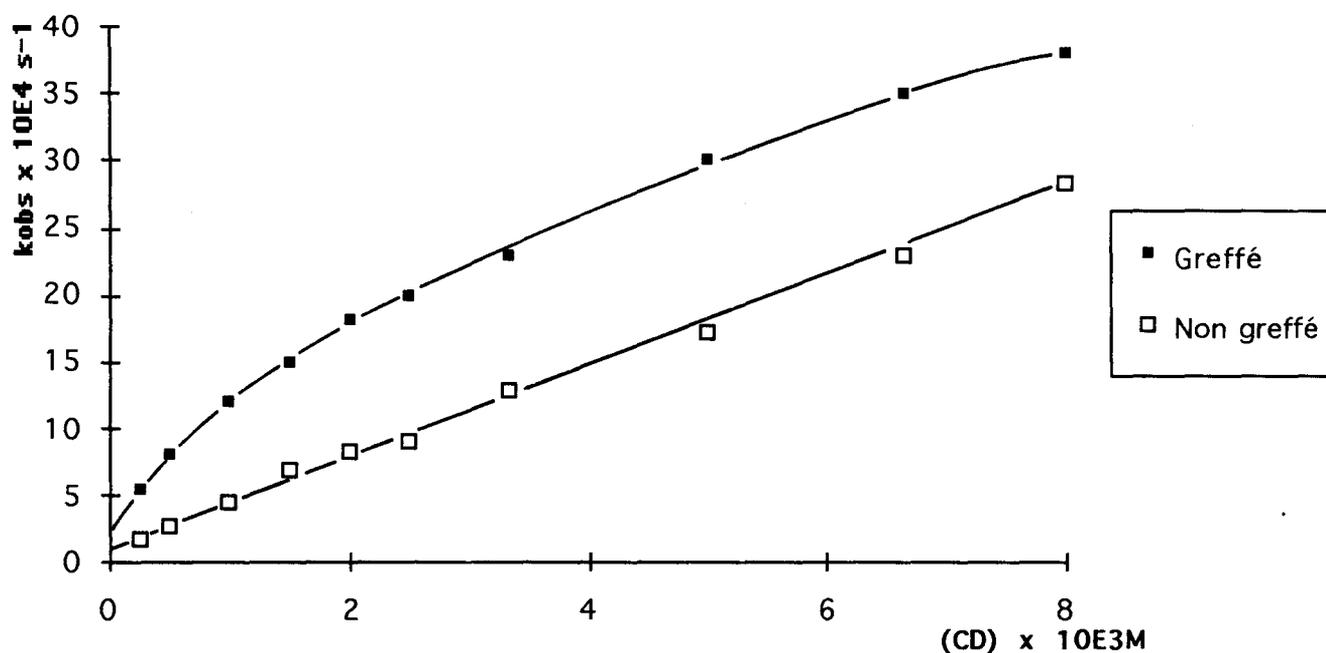


Figure 13.IV : k_{obs} en fonction de la concentration en cyclodextrine pour l'hydrolyse du PNPA par système greffé ou non greffé.

Le pouvoir catalytique exprimé par le rapport k_2/K_m n'est visiblement pas proportionnel à la quantité de cyclodextrine présente sur le polymère, au contraire, à l'exception de PVACD35, nous voyons que l'efficacité diminue lorsque le DS augmente. Le rapport molaire fonctions amines sur cyclodextrine est mentionné dans le Tableau 10.IV. A priori, le large excès en fonctions amines caractérisant chaque polymère est tel que le pouvoir catalytique de ceux-ci ne pourrait dépendre du rapport NH_2/CD . Cependant, nous devons considérer comme nous l'avons observé précédemment, l'existence de liaisons hydrogène mettant en jeu les fonctions hydroxyles de la βCD avec celles de la polyvinylamine ; sachant que la βCD possède 21 OH susceptibles de former des liaisons hydrogène avec le polymère, le rapport - fonctions vinylamine sur fonctions hydroxyles de la βCD - varie de 1 à 16. Ces proportions recalculées sont alors susceptibles d'avoir des conséquences sur la cinétique de la réaction. Ainsi le système catalyseur le plus efficace est celui qui possède le plus de fonctions amines libres capables d'attaquer l'ester dont la partie aromatique est encapsulée.

E/ INTERACTIONS DES SYSTEMES PVACD AVEC UN COMPOSE FLUORESCENT

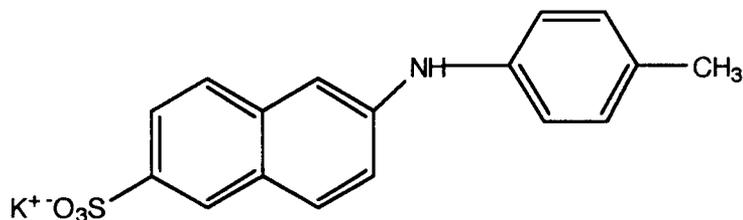
I PRINCIPE FONDAMENTAL DE LA PHOTOLUMINESCENCE

Voir Annexe 2.

II APPAREILLAGE

Le spectrophotomètre de luminescence LS 50 PERKIN ELMER que nous avons utilisé est décrit dans l'Annexe 2.

III ORIGINE DE LA FLUORESCENCE DU TNS



TNS

Le 2-p-toluidinylnaphtalène-6-sulfonate de potassium (TNS) est un composé aromatique hydrosoluble appartenant à une famille de composés aux propriétés lumineuses intéressantes : les 2-N-arylamino-naphtalène-6-sulfonates. Peu ou non fluorescents dans l'eau, ils émettent fortement dans des solvants organiques ou lorsqu'ils sont liés à des protéines ou encapsulés par des molécules telles que les cyclodextrines. Ces propriétés du TNS en font à la fois une sonde de polarité du solvant et une sonde de microenvironnement, c'est pourquoi elle est fréquemment utilisée dans des investigations structurales ou dynamiques dans le domaine de la biochimie ou dans l'étude des cyclodextrines. Ils sont couramment utilisés à cause de leurs caractéristiques spectrales et temporelles qui dépendent de leur microenvironnement. Une étude complète³⁰ de ses propriétés a permis de dégager les points importants suivants :

Les spectres de fluorescence enregistrés dans des solvants de polarité croissante montrent un déplacement bathochrome (déplacement vers les grandes longueurs d'onde) quand la polarité du solvant augmente, traduisant une stabilisation de l'état excité d'autant plus importante que la polarité du solvant est forte.

D'autre part des études dynamiques révèlent des durées de vie de fluorescence très courtes en milieu polaire qui sont considérablement augmentées dans des environnements apolaires.

L'utilisation du paramètre empirique de polarité de DIMROTH³¹, E_T , permet l'obtention de deux domaines linéaires pour la corrélation Energie de l'état fluorescent/ Polarité du solvant interprétables par la coexistence de deux états excités différents. Dans les solvants polaires, l'état fluorescent possède un fort caractère de transfert de charge alors que dans les solvants de polarité nulle ou faible, la polarité de l'état excité n'est que peu différente de celle de l'état fondamental. Le premier état est noté $S_{1,tc}$ (1 pour premier état excité et tc pour transfert de charge) et le deuxième est noté $S_{1,np}$ (np signifiant non plan par analogie avec la géométrie non plane de l'état fondamental). La mesure du rendement quantique de fluorescence du TNS dans ces mêmes solvants permet de retrouver la même discrimination : dans les solvants de polarité nulle à faible, la fluorescence de l'état $S_{1,np}$ est importante alors que dans les solvants polaires, la fluorescence de l'état $S_{1,tc}$ diminue rapidement et d'autant plus que la polarité augmente. Par ailleurs, il a été rapporté que la relaxation du solvant diminuant la transition singulet-triplet, le passage intersystèmes est facilité et la fluorescence n'est pas observée³². Ainsi dans l'eau, le rendement quantique de fluorescence est inférieur à 0,01. Dans le glycérol, solvant polaire mais de forte viscosité à température ambiante, le TNS présente une fluorescence anormalement importante (rendement quantique 0,40) et un maximum d'émission plus faible que celui que ne laisse prévoir la polarité de ce solvant. Il est donc évident que pour le glycérol, le paramètre prédominant est la viscosité et non la polarité.

Le TNS appartient en fait à une catégorie de molécules possédant un état excité appelé "T.I.C.T." (Twisted Internal Charge Transfer)³³. Ces molécules sont constituées de deux moitiés, l'une, D, a un caractère donneur d'électrons, l'autre, A, a un caractère accepteur d'électrons. L'excitation électronique conduit à un état excité de caractère dipolaire plus marqué que celui de l'état fondamental et de géométrie différente de celle de l'état fondamental, changement de géométrie obtenu par rotation des deux moitiés autour de la liaison les reliant. L'augmentation du caractère dipolaire de l'état excité dépend de la polarité du solvant, ainsi, un solvant de forte constante diélectrique favorisera la séparation des charges donc accentuera le transfert de charge à l'état excité. La modification de géométrie par torsion peut être gênée par le solvant comme dans le cas d'un solvant très visqueux qui freinera cette torsion. *Transfert de charge et torsion de la molécule à l'état excité sont en fait des processus non radiatifs*³⁴ qui diminuent le rendement quantique de fluorescence.

Une étude approfondie de la fluorescence de ces molécules a permis de mettre en évidence la coexistence de deux états excités, l'un ayant une géométrie quasiment

identique à celle de l'état fondamental, et le second de géométrie différente. Ces deux états excités sont parfois à l'origine d'une fluorescence double. Celle-ci peut se traduire de manière non ambiguë par deux bandes nettes, mais quand les énergies des deux états ne sont pas trop différentes, on ne distingue qu'une seule bande de fluorescence dont le maximum et la largeur spectrale changent avec la polarité du solvant. Souvent, l'analyse cinétique de la décroissance du signal de fluorescence permet de mettre en évidence le caractère biexponentiel de ce signal confirmant ainsi la présence de deux états excités différents.

A l'état fondamental, le TNS a une géométrie non plane, le cycle naphtyl et le cycle toluidinyl formant un angle non nul. Par excitation, on obtient un état excité de géométrie peu différente, $S_{1,np}$. Suivant la polarité du milieu, cet état se relaxe plus ou moins vite vers l'état $S_{1,tc}$ par transfert de charge et torsion. La Figure 14.IV représente les différents processus décrits précédemment dans le cas d'un solvant peu polaire et dans celui d'un solvant polaire.

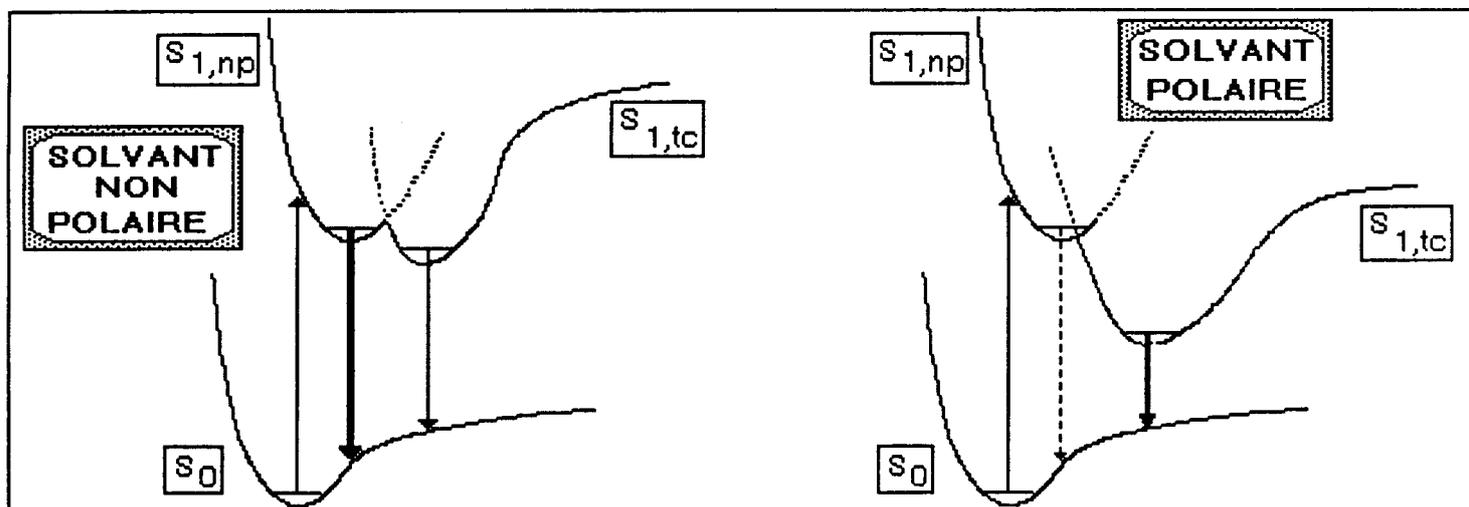


Figure 14.IV : Excitation et retour à l'état fondamental via deux états excités coexistants dans un solvant non polaire et dans un solvant polaire.

IV EXPLOITATION DE LA TECHNIQUE DE FLUORESCENCE

1 Stoechiométrie

Le TNS est composé de 2 groupements aromatiques, sa taille importante l'autorise à être complexé par 2 cyclodextrines ; c'est pourquoi 2 sortes de complexes existent (KONDO et al.³⁵) : 1-1 et 2-1 ceux-ci sont représentés schématiquement sur la figure suivante :



Figure 15.IV : Complexes 1-1 et 2-1 TNS-β-cyclodextrine

Le complexe 1-1 est formé pour une concentration en cyclodextrine inférieure à $10^{-3}M$ tandis que le complexe 2-1 est prépondérant à partir de $5 \cdot 10^{-3}M$ ³⁶.

Les caractéristiques qui différencient ces deux complexes sont :

- Le rendement quantique de fluorescence ($2-1 > 1-1$),
- un glissement vers le bleu du maximum de la longueur d'onde d'émission (λ^F_{max}) pour le complexe 2-1.

Ce sont ces deux paramètres qui vont nous donner les renseignements que nous recherchons à propos des propriétés complexantes de nos polymères greffés de la série PVACD.

2 Observation des complexes 1-1 et 2-1

2.1 Méthode de la variation continue

La stoechiométrie des complexes $\beta CD/TNS$ peut être révélée par la méthode classique de variation continue dite méthode de JOB : elle consiste à mesurer l'intensité de fluorescence de solutions dont la proportion en βCD et en TNS varie, la somme des concentrations restant constante. On trace le diagramme (Figure 20.IV) qui rapporte l'intensité de fluorescence en fonction de la proportion de l'un des constituants du mélange binaire ; la stoechiométrie du complexe est révélée par la valeur de l'abscisse qui correspond au maximum d'intensité de la courbe.

2.2 Détermination des constantes de dissociation des complexes

Il s'agit de mesurer les constantes de dissociation des deux complexes β CD/TNS qui ont particulièrement été étudiés par CATENA et BRIGHT^{37,38} dont les équilibres sont les suivants³⁹ :

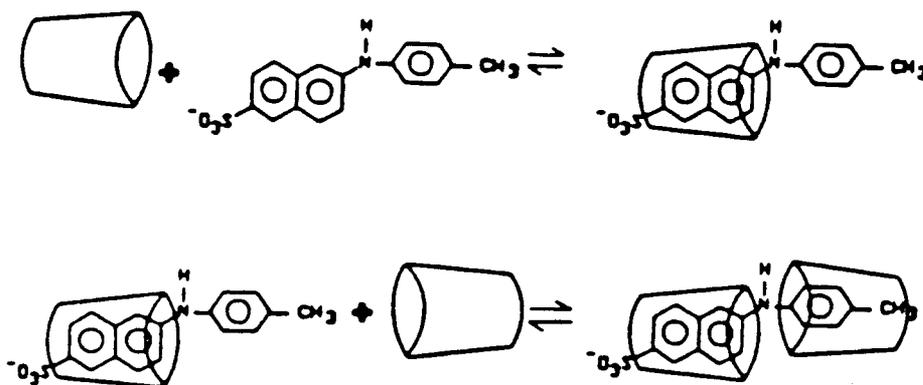


Figure 16.IV : Représentation schématique de la complexation de la β CD avec le TNS ; le premier équilibre illustre la formation du complexe 1-1 (K_1) par approche équatoriale. Le second illustre la formation du complexe 2-1 (K_2).

L'intensité de fluorescence varie de façon non linéaire avec la concentration en cyclodextrine, celle-ci augmente assez rapidement pour les faibles concentrations puis tend vers un maximum lorsque la concentration croît davantage (Figure 22.IV), l'intensité tend alors vers une valeur I_0 .

La constante de dissociation K_d est calculée selon l'équation suivante :

$$\frac{1}{I} = \frac{K_d}{I_0} \times \frac{1}{(\text{CD})} + \frac{1}{I_0}$$

Cette relation a été obtenue par analogie avec l'équation de *Lineweaver-Burk* utilisée précédemment en catalyse enzymatique.

Le tracé de $1/I$ en fonction de $1/(\text{CD})$ représente une droite dont l'ordonnée à l'origine et la pente donnent les valeurs respectives de I_0 et K_d .

V APPLICATION DE LA FLUORESCENCE SUR LES POLYMERES GREFFES

1 Mise au point des paramètres de mesures

1.1 Spectre d'absorption du TNS

Pour optimiser le signal que nous allons observer, il est nécessaire de déterminer la ou les longueurs d'ondes d'excitation (λ^E_{\max}) qui provoqueront la transition du TNS vers un état vibrationnel de son premier état excité et ceci avec le coefficient d'extinction qui soit le plus adapté à la mesure de la fluorescence. En effet, si pour observer la fluorescence il est nécessaire d'avoir une réponse qui soit détectable par l'appareil, la précision des mesures peut être affectée lorsque l'absorbance dépasse la valeur de 0,1 à cause de l'effet de *post-filtre* :

En effet, une concentration trop importante en TNS risque de fournir une mesure quantitative incorrecte à cause des effets de pré-filtre ou de post-filtre. En règle générale, sur les appareils de spectrofluorométrie, seul le centre de la cellule est utilisé à cause des géométries respectives des faisceaux d'excitation et d'émission (Figure 17.IV(a)).

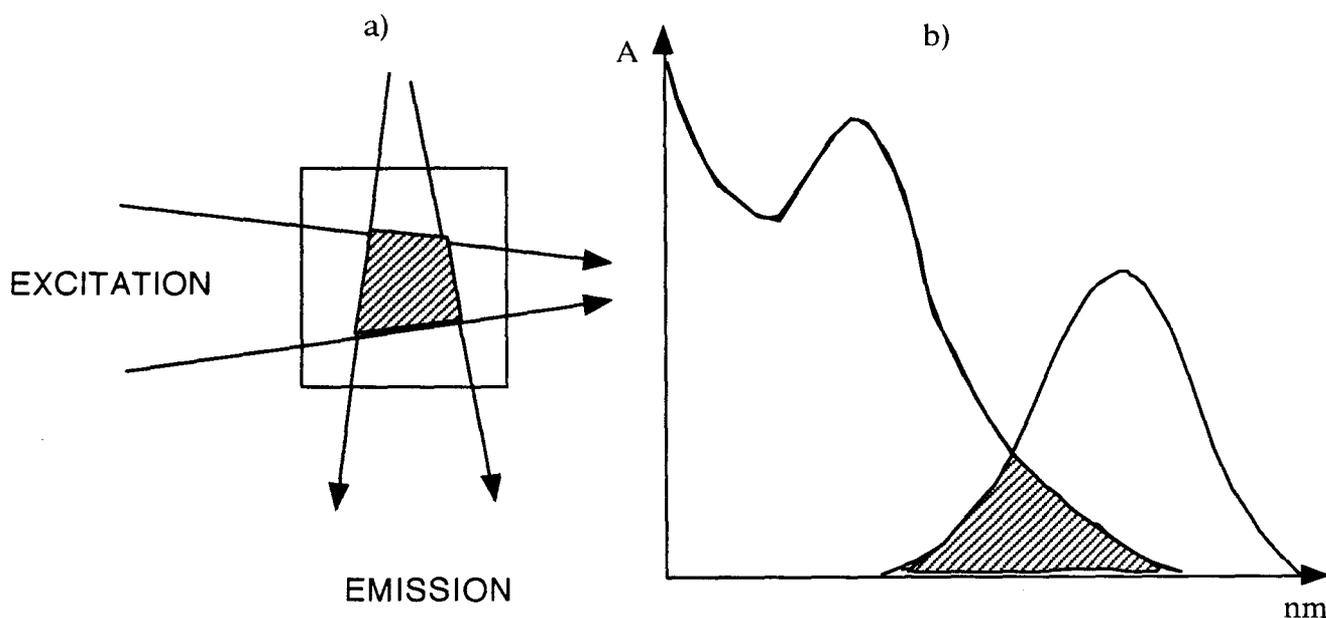


Figure 17.IV : a) : Visualisation du croisement des faisceaux d'excitation et d'émission dans la cellule de mesures. La zone d'analyse est représentée par les hachures. b) Représentation du recouvrement des spectres d'absorption et d'émission provoquant l'effet post-filtre.

Si la concentration est trop forte, l'énergie lumineuse atteignant le centre de la cellule sera atténuée et le nombre de molécules excitées sera moins important que ne

laisse prévoir la concentration : c'est l'effet pré-filtre. De même, une absorbance non négligeable aux longueurs d'onde initiales du spectre de fluorescence provoque une atténuation de ce début de spectre : c'est l'effet post-filtre (Figure 17.IV(b)). En pratique, si on se limite à une absorbance de 0,1 à l'excitatrice, la mesure d'intensité de fluorescence varie linéairement avec la concentration.

Sur le spectre d'absorption du TNS, en présence de cyclodextrine apparaissent deux bandes d'absorption à 258 et 315 nm puis un épaulement à 360 nm. Les mêmes bandes sont observées en présence des polymères de la série PVACD. Comme le montre la Figure 18.IV, une structuration de la bande attribuée à l'existence de groupements toluéniques sur le polymère apparaît vers 265 nm (voir Chapitre I).

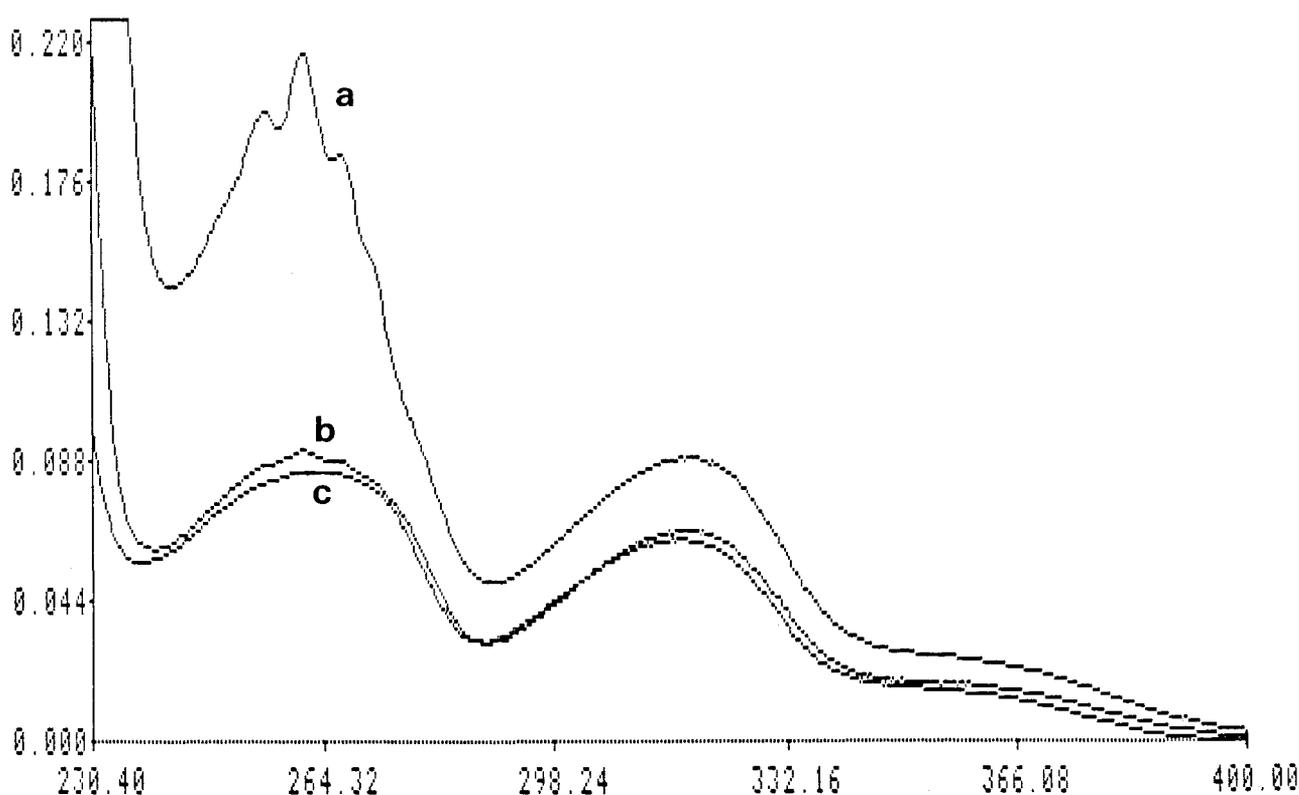


Figure 18.IV : Spectre d'absorption du TNS ($5 \cdot 10^{-6} M$) en présence de PVACD35 a) $10^{-4} M$; b) $10^{-5} M$; c) $10^{-6} M$.

	258 nm	315 nm
PVACD35 $10^{-4}M$	0,193	0,089
PVACD35 $10^{-5}M$	0,09	0,088
PVACD35 $10^{-6}M$	0,084	0,062
βCD $5 \cdot 10^{-3}M$	0,14	0,085
βCD $10^{-4}M$	0,096	0,06

Tableau 11.IV : Valeurs d'absorbance du spectre d'absorption du TNS ($5 \cdot 10^{-6}M$) en présence de PVACD35 et de βCD .

Le Tableau 11.IV nous montre qu'il sera préférable de travailler pour une valeur de λ^E_{max} de 315 et même 360 nm (pour laquelle l'absorbance est encore inférieure), notamment lorsque les concentrations en cyclodextrine seront élevées.

1.2 Spectres d'émission et d'excitation

- Pour obtenir le spectre d'excitation de fluorescence, on maintient constante la longueur d'onde de l'émission observée et l'on fait varier celle de la lumière excitatrice. On détecte alors l'intensité d'émission à la longueur d'onde fixée en fonction de la longueur d'onde excitatrice.

- Pour obtenir le spectre d'émission de fluorescence, on fixe la longueur d'onde excitatrice et l'on fait varier la longueur d'onde du monochromateur analysant la lumière émise par fluorescence.

Ces deux spectres sont représentés sur la Figure 19.IV : le spectre d'excitation est en fait quasiment identique au spectre d'absorption (voir Annexe 2), on y retrouve les mêmes bandes à 258 et 315 nm ainsi que l'épaule à 360 nm. Le spectre d'émission indique que l'intensité de fluorescence est supérieure lorsque $\lambda^E_{max} = 258$ nm.

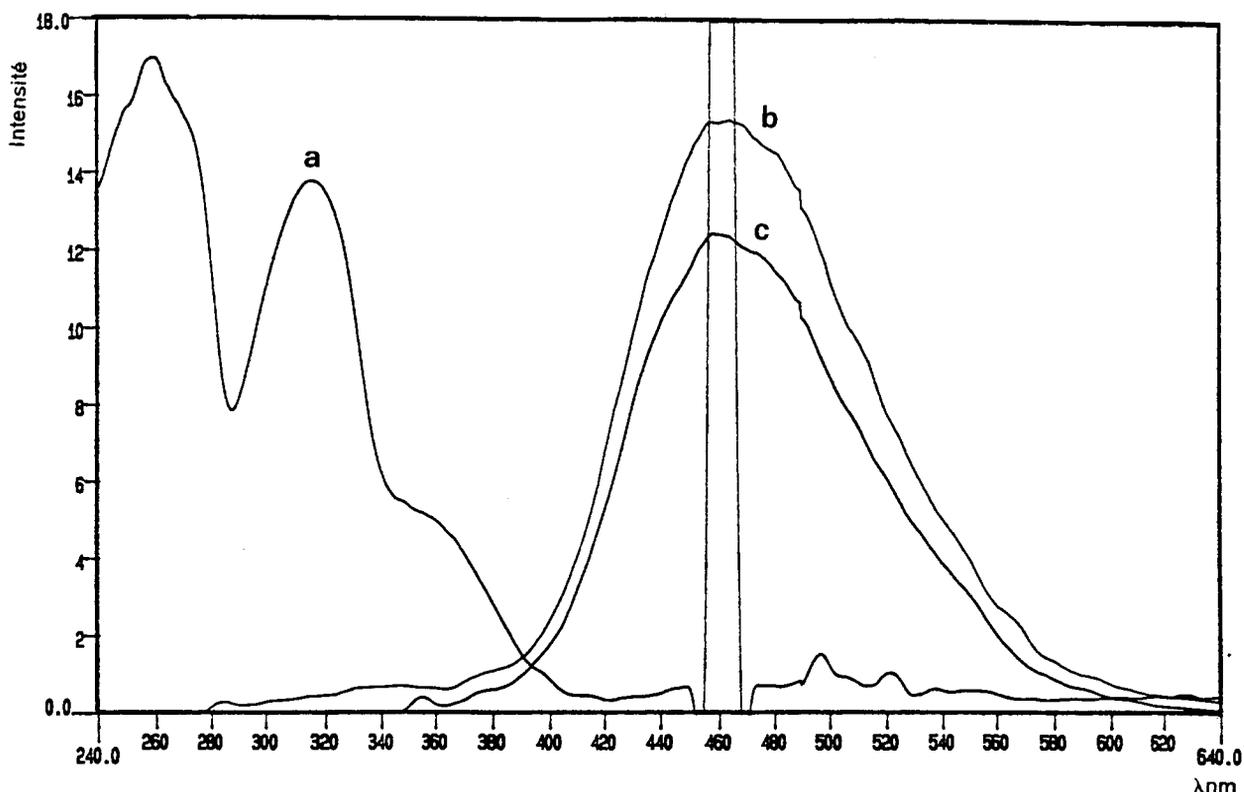


Figure 19.IV : a) Spectre d'excitation de fluorescence du TNS pour $\lambda^F_{\max} = 461 \text{ nm}$ Spectres d'émission de fluorescence du TNS b) à 258 nm, c) à 317 nm. (TNS)= 10^{-5}M , $\beta\text{CD}=10^{-4}\text{M}$.

1.3 Autres réglages du fluorimètre

- Au cours de mesures préliminaires sur des mélanges $\beta\text{CD}/\text{TNS}$, les spectres obtenus sont peu intenses et fortement bruités, aussi est-il nécessaire d'accumuler plusieurs enregistrements successifs (en général 5 accumulations). L'appareil est doté d'un logiciel lui permettant d'accumuler et de faire la moyenne des spectres, ce qui améliore sensiblement le rapport signal/bruit.

- L'intégration du signal est faite à partir de la ligne de base entre 340 et 640 nm.

- La vitesse de balayage est réglée à 400 nm/mn, des essais à 800 nm/mn donnant de moins bons résultats, même en augmentant le nombre de spectres accumulés.

- La bande passante (BP) d'excitation est ajustée à 5 nm tandis qu'elle est réglée à 2,5 nm en émission.

2 Détermination de la stoechiométrie des complexes

2.1 Diagramme de JOB

Sachant que les complexes 2-1 ou 1-1 peuvent se former, il s'impose de déterminer à quelle(s) espèce(s) nous aurons affaire en présence des polymères de la série PVACD dans nos conditions expérimentales.

La détermination de la stoechiométrie des complexes PVACD06 et 35/TNS a été accomplie suivant la méthode expérimentale de JOB et représentée par la Figure 20.IV.

Cette courbe indique une intensité de fluorescence maximale pour une proportion de TNS égale à 0,33, ainsi c'est le complexe 2-1 qui est formé.

Cette expérience a ensuite été réalisée en remplaçant le PVACD35 par un mélange équivalent de cyclodextrine et de PVAm (rapport molaire = 1/50) et révèle également la formation du complexe 2-1.

Quant au polymère PVACD06, celui-ci ne nous a pas donné de résultat que l'on ait pu exploiter, la très forte concentration en fonctions amines dans le milieu faussant les mesures ; on peut cependant établir que le TNS se trouve dans un environnement hydrophobe étant donné que $\lambda_{\text{max}}^{\text{F}} = 448 \text{ nm}$.

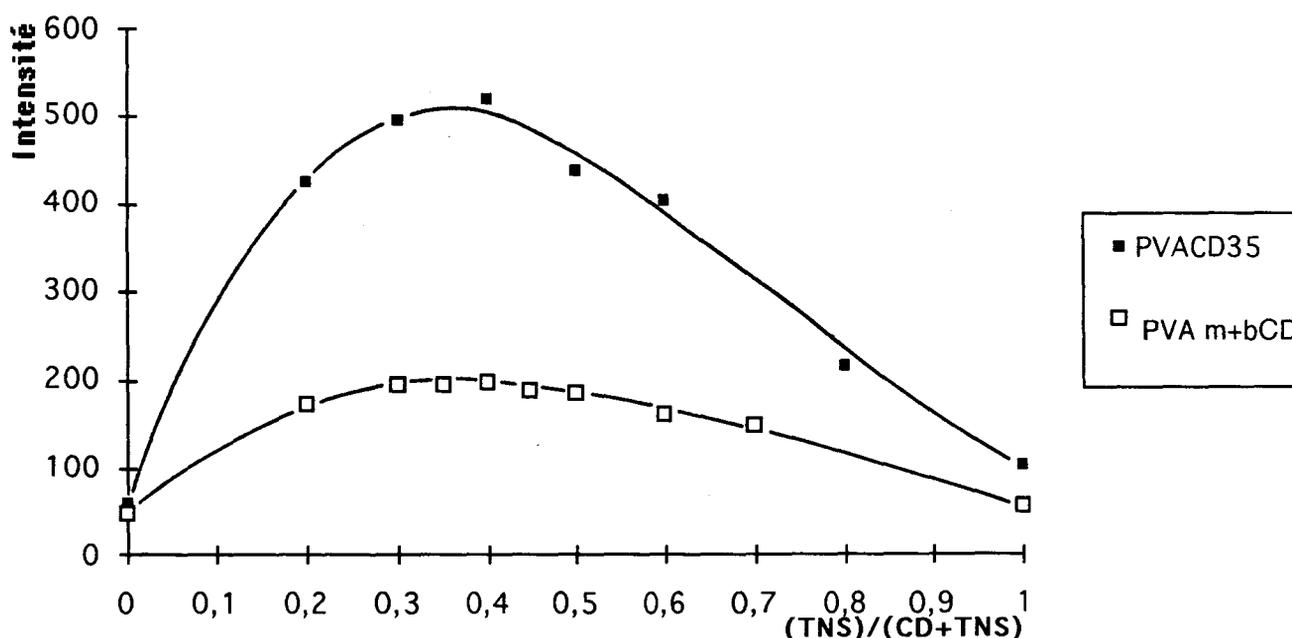


Figure 20.IV : Diagramme de JOB pour le système PVACD35 et PVAm + CD/TNS. $T^{\circ} = 25^{\circ}\text{C}$, tampon borax $\text{pH} = 9,17$, $\lambda^{\text{E}} = 315 \text{ nm}$; concentration $(\text{TNS} + \beta\text{CD}) = 10^{-5} \text{ M}$.

2.2 Interprétations

KONDO et al.³⁵, HARADA⁴⁰ ou JOBE⁴¹ ont mis en évidence l'existence du complexe 1-1 pour de faibles concentrations en β CD ($< 10^{-3}$ M) et l'existence du seul complexe 2-1 au delà de 5.10^{-3} M. Or, dans les deux cas présents, on observe le complexe 2-1 à une concentration en β CD très inférieure, autant pour le polymère greffé que pour un mélange β CD-PVAm. Ce dernier exemple vient confirmer l'hypothèse des interactions entre la β CD et la PVAm émise dans le Chapitre II : la polyvinylamine crée un microenvironnement riche en cyclodextrine, et favorise la formation des complexes 2-1. SEO² observe également l'existence unique du complexe 2-1 avec la polyallyl- β -cyclodextrine (PAACD) et HARADA avec des dimères de la cyclodextrine tels que le succinate et le glutarate de (bis)-cyclodextrine (respectivement $(\beta\text{CD})_2\text{S}$ et $(\beta\text{CD})_2\text{G}$) ou le polymère greffé polyacryloyle-cyclodextrine (poly-CD-A)⁴⁰. La stoechiométrie est confirmée dans chacun des cas précédents par une valeur de $\lambda_{\text{max}}^{\text{F}}$ qui traduit l'importance de l'environnement hydrophobe du TNS.

	CD-TNS	$\lambda_{\text{max}}^{\text{F}}$
β CD	1-1	464
β CD	2-1	455
PVACD06	2-1	448
PVACD35	2-1	450
PVAm+ β CD	2-1	457
$(\beta\text{CD})_2\text{G}$ (a)	2-1	447
$(\beta\text{CD})_2\text{S}$ (a)	2-1	447
poly-CD-A (a)	2-1	438

Tableau 12.IV : Longueur d'onde de l'intensité maximale de fluorescence du TNS complexé par la cyclodextrine sous plusieurs formes. (a) : Référence 36.

D'après le Tableau 12.IV, on peut constater un décalage vers le bleu de $\lambda_{\text{max}}^{\text{F}}$ pour les complexes 2-1, indiquant que le TNS est dans un environnement plus hydrophobe et qu'il est protégé de la relaxation par le solvant, ses deux radicaux aromatiques étant isolés de ce dernier par encapsulation.

Si l'on compare λ^F_{\max} du mélange PVAm- β CD avec celui des cyclodextrines greffées, le TNS est probablement plus en contact avec le solvant et pénètre donc moins profondément dans les cavités.

3 Mesure des constantes de dissociation

Etant donné que la stoechiométrie des complexes PVACD-TNS est établie, voyons maintenant l'influence du taux de greffage sur la stabilité des complexes.

3.1 Conditions opératoires

Il s'agit maintenant de relever l'évolution de l'intensité de fluorescence pour une gamme de concentration pour chacun des polymères greffés et ensuite de tracer le diagramme en double inverse de la concentration en fonction de l'intensité.

Hormis le DS des polymères, nous avons fait varier comme paramètre le pH. Ce choix s'explique par le fait que la proximité entre groupements β CD semble être primordiale pour qu'ils puissent agir coopérativement vis à vis du TNS^{2,40}. Comme la fluorimétrie est un outil bien adapté à la caractérisation du microenvironnement, il est concevable de mettre en évidence par cette méthode les effets du pH sur la conformation du polymère : le raisonnement que nous tenons est que si, comme on l'a vu grâce aux études viscosimétriques, l'augmentation de pH tend à provoquer le repliement des chaînes sur elles mêmes, alors le microenvironnement de celles-ci doit être modifié en se manifestant par une variation de la surface de contact avec le solvant et un rapprochement des motifs cyclodextrines.

3.2 Résultats

La Figure 21.IV montre l'évolution du spectre d'émission du TNS en fonction de la variation de concentration en polymère ; notons la constance de λ^F_{\max} à 445 nm qui traduit la constance de la stoechiométrie du complexe.

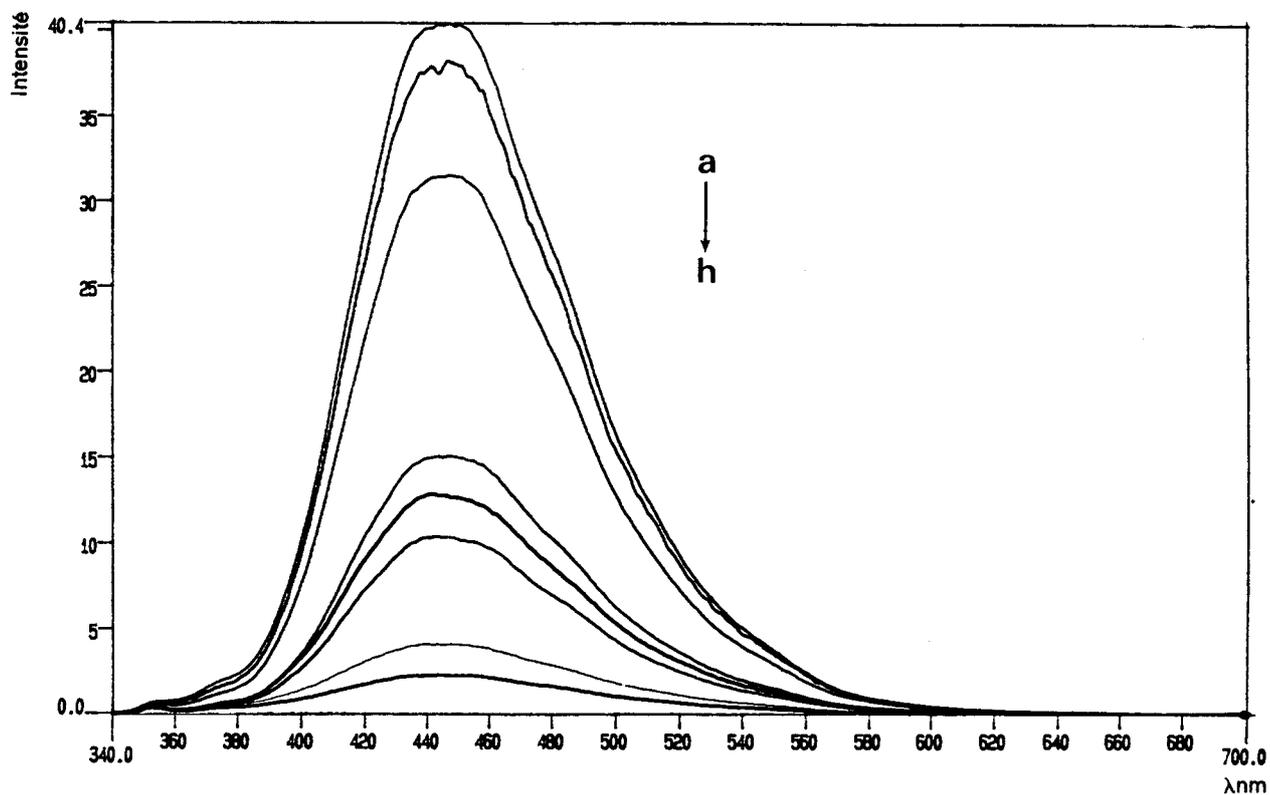


Figure 21.IV : Spectre d'émission de PVAB35 a) : $10^{-4}M$; b) : $7,5 \cdot 10^{-5}M$;
c) $5 \cdot 10^{-5}M$; d) : $1,75 \cdot 10^{-5}M$; e) : $1,25 \cdot 10^{-5}M$; f) : $1 \cdot 10^{-5}M$; g) : $7,5 \cdot 10^{-6}M$; h) : $4 \cdot 10^{-6}M$

On peut rapporter l'intensité de fluorescence (mesurée par intégration entre 340 et 640 nm) en fonction de la concentration en polymère (rapportée à la concentration en motifs cyclodextrines) (Figure 22.IV) :

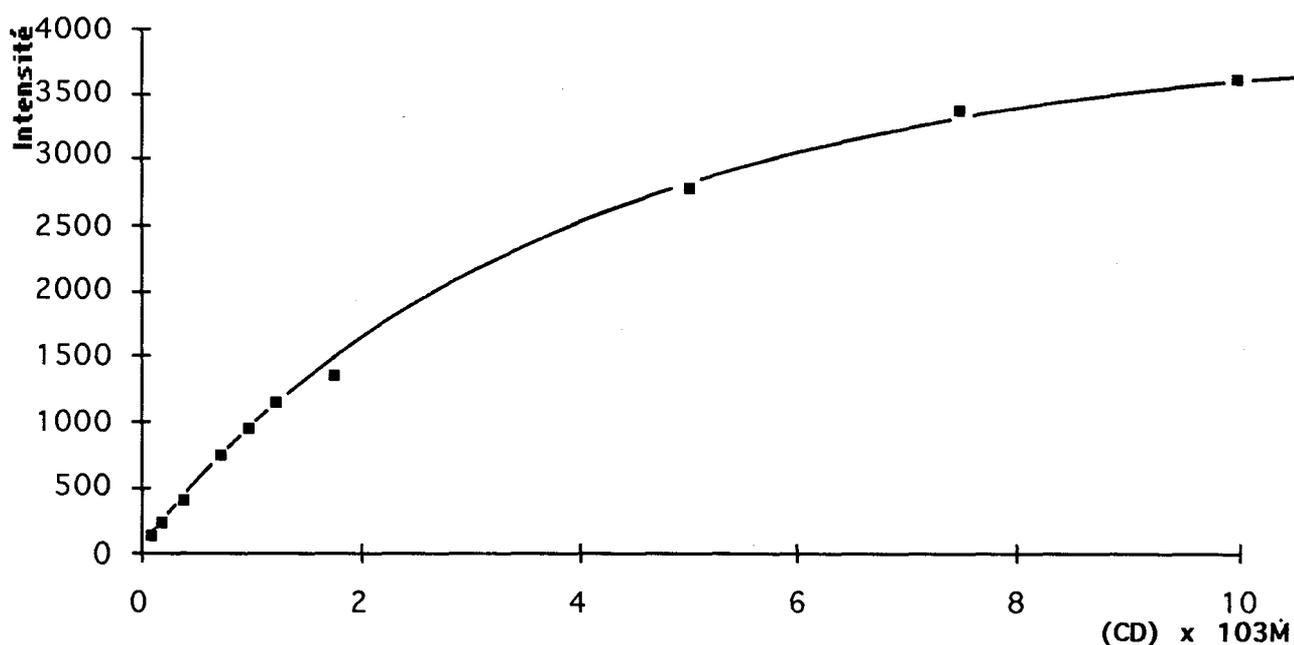


Figure 22.IV : Evolution de l'intensité de fluorescence du TNS ($5 \cdot 10^{-6}M$) en fonction de la concentration en PVACD35.

La transformation suivante consiste à tracer $1/I$ en fonction de $1/CD$, l'unique pente obtenue pour chaque polymère confirme l'existence du seul complexe 2-1 (Figure 23.IV).

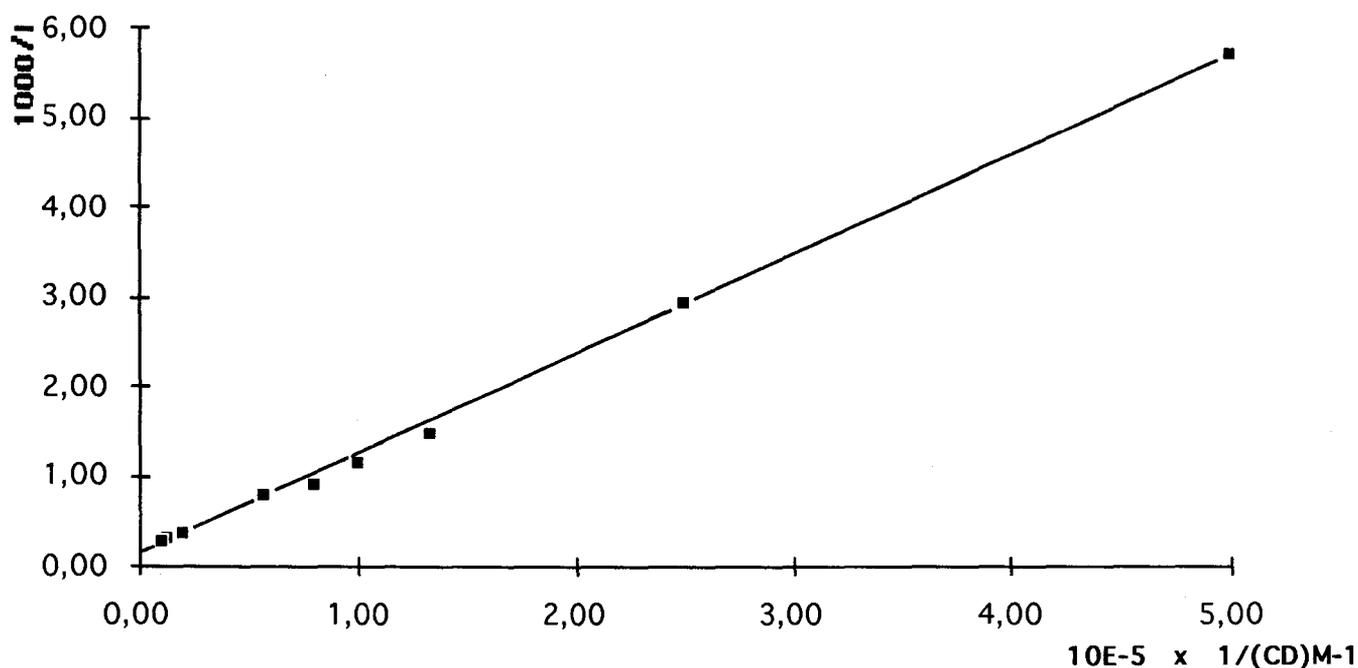


Figure 23.IV : Diagramme en double inverse de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en PVACD35 (TNS)= $5 \cdot 10^{-6}M$.

Le Tableau 13.IV donne les valeurs de K_d mesurée pour les différents polymères PVACD en fonction du pH :

Polymère	$K_d \times 10^4 M$ pH = 8,4	$K_d \times 10^4 M$ pH = 9,5	$K_d \times 10^4 M$ pH = 10,7
PVACD06	0,74	0,95	2,4
PVACD28	0,43	0,47	1,17
PVACD35	0,48	0,61	1,79
PVACD57	1,47	2,75	4,4
β CD-PVAm 1/50	-	1,16	-

Tableau 13.IV : Valeurs des constantes de dissociation des complexes PVACD-TNS en fonction du pH et du taux de greffage des polymères.

K_d augmente avec le pH (destabilisation du complexe) et varie de façon non monotone avec DS : contrairement aux complexes 1-1 qui sont formés avec le PNPA (voir cinétique des systèmes greffés), les complexes 2-1 sont dépendants de la quantité de cyclodextrine présente sur le polymère.

La Figure 24.IV montre que λ_{max}^F varie aussi en fonction du pH et du DS, ceci traduisant une influence de ces paramètres sur l'environnement hydrophobe du TNS.

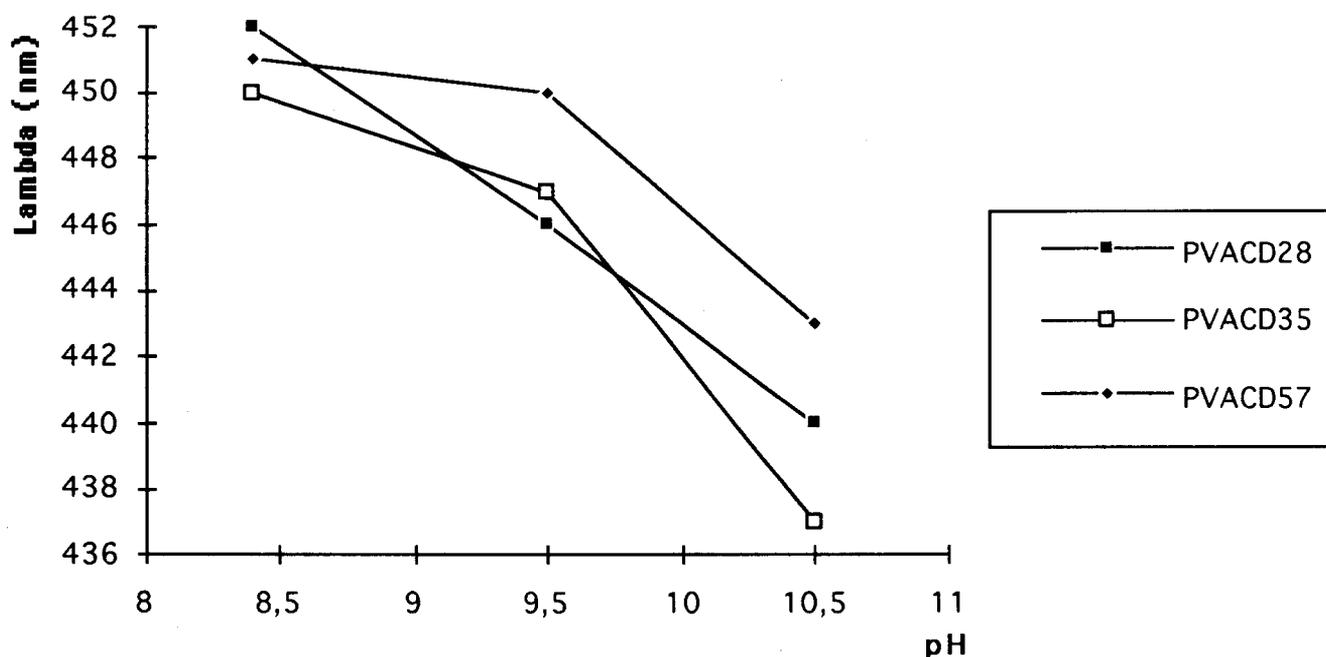


Figure 24.IV : Variation de λ_{max}^F en fonction du pH.

3.3 Discussion et interprétation des résultats

Comparons tout d'abord nos résultats à ceux qui ont été rapportés pour d'autres cyclodextrines dimérisées ou polymérisées :

Complexe		$K_d \times 10^4 M$	λF_{max}
βCD (2-1)	(a)	510	447
$\beta(CD)_2S$	(a)	0,6	447
$\beta(CD)_2G$	(a)	1,2	447
Poly-CD-A	(a)	1	437
PAACD (DS=0,39)	(b)	6	456

Tableau 14.IV : Constantes de dissociation et longueur d'onde de l'intensité maximale de fluorescence pour différents complexes CD-TNS. Références : (a) : 40 ; (b) : 2

Au vu de ces résultats, les constantes de dissociation que nous avons mesurées sont globalement du même ordre de grandeur, ceci signifie que la cyclodextrine greffée sur polyvinylamines forme des complexes 2-1 avec le TNS de façon aussi spontanée et stable que les cyclodextrines dimérisées ou polymérisées.

D'une manière générale, il faut noter que l'existence d'un lien covalent entre deux cyclodextrines ou entre cyclodextrine et chaîne polymère augmente de plus de 100 fois la stabilité du complexe 2-1 : la coopérativité (ou action simultanée) des cavités hydrophobes est stimulée par ce lien dont le rôle est de maintenir celles-ci à une distance qui les "oblige" à inclure chacune une partie de la même molécule substrat.

Le mélange βCD -PVAm (1/50) conduit à une stabilisation du complexe 2-1 moins forte que pour le polymère greffé correspondant (PVACD35). Ceci met en évidence l'importance de la liaison covalente entre la chaîne et la cyclodextrine.

Ces résultats sont inattendus si l'on compare la richesse en cyclodextrine de nos polymères avec celle des modèles ci-dessus : La série PVACD contient 0,3 à 5% en motifs cyclodextrine alors que les polymères de SEO¹ et HARADA³⁶ en contiennent respectivement 39% et 100%. Ces derniers sont caractérisés par une distance entre cavités complexantes très proches alors que l'on estime que cette distance varie entre un motif cyclodextrine tous les vingt (PVACD57) jusqu'à un motif tous les trois cents motifs vinylamine (PVACD06) dans notre cas.

Ces derniers auteurs, expliquent la stabilité des complexes par l'action coopérative de deux motifs cyclodextrines adjacents. Malheureusement, bien qu'ils aient synthétisé tous deux des copolymères moins riches en cyclodextrine ou

comportant un bras espaceur entre la β CD et la chaîne, les études de fluorescence qu'il publie ne rapportent précisément pas les valeurs de constantes de dissociation avec le TNS qui auraient pu nous renseigner sur l'incidence de la distance moyenne entre les cavités sur la stabilité des complexes.

HARADA³⁶ propose le modèle simplifié de la Figure 25.IV illustrant le complexe formé entre le poly-CD-A et le TNS :

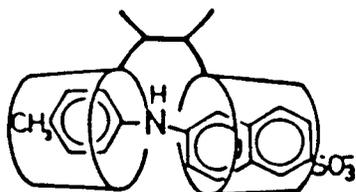


Figure 25.IV : Représentation du complexe 2-1 poly-CD-A-TNS

Cette représentation serait difficilement concevable à reproduire sur un modèle en 3 dimensions : étant donné la proximité entre les entrées des cavités et l'encombrement très important autour de la chaîne, la molécule de TNS ne peut entrer que difficilement dans les deux sites à la fois. L'accumulation très dense de cyclodextrine est probablement un facteur de rigidité du polymère qui doit être proche de celle d'un gel. Si les 2 motifs β CD du succinate ou du glutarate peuvent s'écarter momentanément pour laisser le TNS entrer dans les deux cavités, ceci est probablement plus difficile avec le poly-CD-A. Cette remarque, appuyée par la comparaison avec nos résultats, conduisent à envisager que la proximité immédiate entre les sites complexants ne serait pas absolument impérative pour que la coopérativité entre ceux-ci s'exerce. Il faut donc considérer qu'une chaîne macromoléculaire a la propriété de se replier sur elle-même et ceci est précisément ce qui peut expliquer que les cyclodextrines présentes sur les PVACD et réparties de façon assez distantes les unes des autres puissent malgré cela former des complexes 2-1 aussi stables.

La Figure 26.IV représente l'évolution de K_d en fonction de DS : K_d diminue d'abord puis augmente ensuite, notamment pour les polymères plus greffés ; on peut considérer ce résultat comme surprenant si l'on raisonne en terme de distance moyenne entre motif cyclodextrine, qui indiquerait plutôt une tendance inverse.

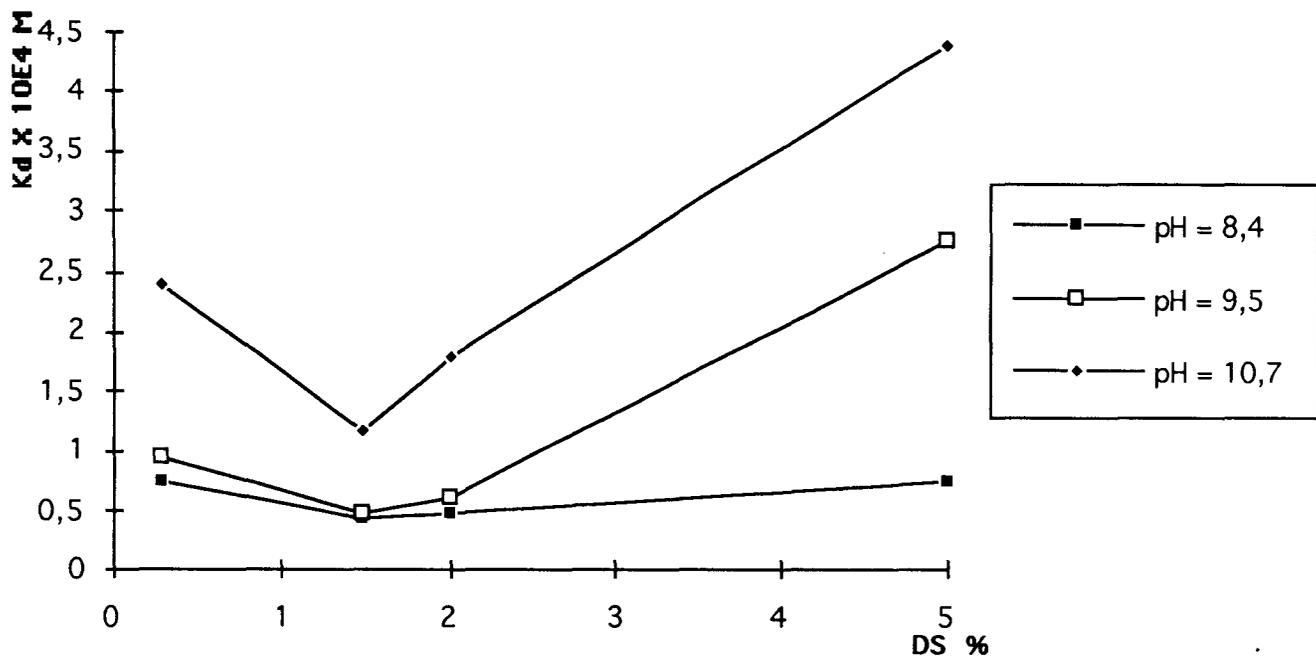


Figure 26.IV : Variation de Kd en fonction du DS pour différents pH.

Si l'on revient aux études viscosimétriques présentées précédemment dans le chapitre II, nous avons vu que la viscosité réduite des polymères diminue lorsque DS augmente (surtout à pH élevé) jusqu'à atteindre une conformation quasiment compacte (surtout pour DS = 2 et 5%). Malgré la hausse de la concentration locale en cyclodextrine due à ce repliement des chaînes on constate une diminution de leur mobilité qui défavorise la complexation du TNS et qui pourrait expliquer l'évolution de Kd observée sur la Figure 26.IV.

Il faut toutefois tenir compte que la charge négative du TNS est probablement à l'origine d'interactions avec la charge positive du polymère, par conséquent, celles-ci seront d'autant plus fortes que le pH sera bas ; ceci est le meilleur argument qui puisse expliquer le décalage entre les courbes de la Figure 26.IV.

Le poly-CD-A est doté d'un facteur stérique pénalisant supplémentaire par rapport aux PVACD : le point d'ancrage de la cyclodextrine à la chaîne polymère se situe sur l'un des OH secondaires de celle-ci ; cet encombrement du côté le plus ouvert de la cavité de la cyclodextrine gêne la pénétration du substrat.

La diminution de la valeur de λ_{max}^E en fonction du pH observée sur la Figure 24.IV traduit l'environnement de plus en plus hydrophobe du TNS. Les complexes

formés à pH élevé sont au sein d'une structure très dense (viscosité faible) et donc davantage isolés du milieu aqueux.

Enfin l'intensité relative de fluorescence que nous avons observée, pour les PVACD57,35 et 28 est comparable à celles mesurées par HARADA³⁶ qui a observé une augmentation de fluorescence du complexe β CD/TNS 2-1 trois fois plus importante que celle du complexe 1-1 et une différence encore plus marquée pour la polyacryloyle cyclodextrine (Tableau 15.IV).

Catalyseur	CD-TNS	Intensité relative de fluorescence
β CD	1-1	1
β CD	2-1	3
PVACD06	2-1	1,25
PVACD28	2-1	6,75
PVACD35	2-1	7,7
PVACD57	2-1	7
PAACD (DS=0,39) (a)	2-1	7,8
(β CD) ₂ G (b)	2-1	8
(β CD) ₂ S (b)	2-1	9
poly-CD-A (b)	2-1	20

Tableau 15.IV : Intensités relatives de fluorescence de complexes CD-TNS.
Références : (a) : 86 ; (b) : 36.

Ce phénomène est interprété comme suit³⁶ : l'encapsulation du TNS le fait passer d'un milieu très polaire (solution aqueuse) à un environnement beaucoup moins polaire (intérieur de la cavité), défavorisant le processus non radiatif de transfert de charge. De plus, dans le cas du complexe 2-1 où les deux moitiés de la molécule sont encapsulées, l'état excité perd la possibilité de relaxation non radiative par rotation de la liaison cycle naphthyl-cycle toluidinyl et ceci à plus forte raison lorsque les cyclodextrines sont attachées à une chaîne polymère (l'environnement du TNS est alors très rigide). Ceci explique pourquoi le rendement quantique d'émission du TNS en présence de l'acryloyle β -cyclodextrine³⁶ ou de PAACD², ou encore de PVACD est supérieur à celui mesuré pour des complexes non greffés 2-1 et encore plus pour des complexes 1-1.

Nous pouvons constater à partir du Tableau 15.IV que le rendement quantique de fluorescence des complexes de la poly-CD-A est supérieur à celui des polyamines greffées. Si l'on raisonne en terme de rigidité, comme cela est exprimé ci-dessus, il est en effet concevable que l'encombrement extrême des chaînes de polyacryloyle-cyclodextrine ne permette aucun mouvement des sites complexants les uns par rapport aux autres, formant des complexes ternaires dotés d'une faible mobilité.

Le complexe PVACD06-TNS possède une intensité de fluorescence proche de celle de la β CD libre : la longueur des chaînons de polyvinylamine qui séparent les deux cyclodextrines d'un même complexe crée peu de contraintes et autorise une mobilité de la supermolécule pratiquement égale à celle d'un complexe ternaire classique.

4 Conclusion

La variation des principaux paramètres (K_d , λF_{\max} , intensité de fluorescence) en fonction du degré de substitution sont la preuve que le greffage de la cyclodextrine sur la PVAm se fait de manière statistique et non pas séquencée. Dans ce dernier cas, nous aurions probablement observé des valeurs relativement constantes, puisque la distance entre les motifs porteurs de β CD ne varierait pas en fonction du degré de substitution.

Les polyvinylamines porteuses de cyclodextrine que nous avons synthétisées sont aptes à former spontanément des complexes 2-1 avec de grosses molécules comme le TNS. Bien que la cyclodextrine soit probablement dispersée et répartie de façon statistique sur la chaîne, celle-ci est concentrée grâce aux repliements du polymère qui forme un microenvironnement qui concentre les sites de complexation. La fluorimétrie nous apporte une preuve supplémentaire de la formation de microdomaines dont la cohésion serait maintenue par liaisons hydrogène entre la β CD et la polyvinylamine. Si la formation des complexes 2-1 dépend du degré de substitution des polymères (voir Figure 26.IV), ceci n'est pas vérifié pour les complexes 1-1 dont la constante de dissociation reste quasiment constante (voir les valeurs de K_m mesurées par la méthode cinétique et relatives au complexe 1-1 entre le PNPA et la β CD) ; ceci démontre que la formation des complexes 2-1 dépend effectivement de la conformation du polymère. Afin d'éliminer l'influence de la charge positive du polymère qui peut interagir avec le TNS, il faut envisager l'utilisation ultérieure d'une sonde non chargée (pyrène). Des études de solubilisation de colorants par équilibre de dialyse pourraient également venir compléter la fluorimétrie. Une application catalytique ultérieure de ces polymères

supports de cyclodextrine serait justifiée en utilisant des substrats qui comme le TNS possèderaient deux radicaux qui pourraient être inclus dans deux cavités (hexanoate, p-nitrobenzoate de p-nitrophénol). Ces investigations devraient pouvoir confirmer l'effet coopératif de deux motifs cyclodextrine au cours de l'inclusion de tels substrats.

F/ CONCLUSION DU CHAPITRE IV

Au cours de ce chapitre, nous avons pu constater que le greffage de la cyclodextrine sur la PVAm apporte des propriétés nouvelles au système comparativement à leur mélange. Ces propriétés ont pour origine la liaison covalente qui les relie. Les études cinétiques ont permis de découvrir l'action coopérative des cavités complexantes avec les fonctions amines. Les études thermodynamiques et cinétiques concernant les mélanges cyclodextrine-PVAm n'ont pas révélé un tel mécanisme, au contraire nous avons observé que l'activité globale de tels systèmes était inférieure ou égale à l'addition des activités séparées de chacun. La fluorimétrie nous a donné des informations quant au pouvoir complexant des systèmes greffés vis à vis de molécules de taille importante et nous avons pu vérifier que ces polymères ont tendance à prendre la conformation de pelote et à former des réseaux de liaisons hydrogène qui s'intensifient lorsque le DS grandit, c'est pourquoi nous avons mesuré une activité catalytique qui diminue lorsque le taux de greffage augmente. Comme nous l'avions fait pour les mélanges polymère/ β CD, des études thermodynamiques pourraient être entreprises ; celles-ci nous apporteraient des informations complémentaires quant à l'inclusion du PNPA, mais aussi sur l'étape de coupure de l'ester.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DU CHAPITRE IV

- 1 T. SEO, T. KAJIHARA, T. IIJIMA
Makromol. Chem. (1987), 188 , 2071
- 2 T. SEO, T. KAJIHARA, K. MIWA, T. IIJIMA
Makromol. Chem. (1991), 192 , 2357
- 3 A. EVERAERTS, C. SAMYN, G. SMETS
Makromol. Chem. (1984), 185 , 1881
- 4 Y. MATSUI, T. YOKOI, K. MOCHIDA
Chem. Lett., Chem. Soc. Jpn. (1976), 1037
- 5 A. UENO, F. MORIWAKI, Y. HINO, T. OSA
J. Chem. Soc. Perkin Trans. II (1985), 921
- 6 H. J. SCHNEIDER, F. XIAO
J. Chem. Soc. Perkin Trans (1992), 2 , 387
- 7 R.L.VAN ETEN, J.F. SEBASTIEN, G. A. CLOWES, M. L. BENDER
J. Am. Chem. Soc. (1967), 89 , 3242
- 8 M. L. BENDER, M. KOMIYAMA
"Cyclodextrin Chemistry" Springer. Berlin, (1978)
- 9 F. CRAMER, H. HETTLER
Naturwiss. (1967), 54 , 625
- 10 A. HERSEY, B. H. ROBINSON
J. Chem. Soc. ; Faraday Trans. (1984), 80 , 2039
- 11 M. KOMIYAMA, M. L. BENDER
J. Am. Chem. Soc. (1978), 100 , 2259
- 12 I. TABUSHI, Y. KIYOSUKE, T. SUGIMOTO, K. YAMAMURA
J. Am. Chem. Soc. (1978), 100 , 916
- 13 E. A. LEWIS, L. D. HANSEN
J. Chem. Soc. Perkin Trans. (1973), 2 , 2081
- 14 W. SAENGER
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1980), 19 , 344
- 15 G. BARONE, G. GASTRONUOVO, V. ELIA, M. MUSCETTA
Thermochim. Acta (1985), 85 , 443
- 16 M. R. EFTINK, J. C. HARRISON
Bioorg. Chem. (1981), 10 , 388
- 17 S. TAKAJI, M. MAEDA
J. inclusion Phenomena (1984), 2 , 775

-
- 18 K. TAKEO, T. KUGE
Starch (1972), 24 , 331
- 19 C. SIRLIN
Bull. Soc. Chim. France (1984), 1-2
- 20 Y. INOUE, T. HAKUSHI, Y. LIU, L.H. TONG, B.J. SHEN, D. S. JIN
J. Am. Chem. Soc. (1993), 115 , 475
- 21 A. HARADA, S. TAKAHASHI
J. Chem. Soc. ; Chem. Commun. (1984), 645
- 22 M. OTAGIRI, T. MIYAJI, K. UEKAMA, K. IKEDA
Chem. Pharm. Bull. (1976), 51 , 343
- 23 S. TAKAJI, KIMURA, M. MAEDA
Thermochim. Acta (1985), 88 , 247
- 24 J. SZEJTLI
"Cyclodextrin Technology", Kluwer Academic Publ. (1988)
- 25 F. M. MENGER, M. LADIKA
J. Am. Chem. Soc. (1987), 109 , 3146
- 26 R.I. GELB, L.M. SCHWARTZ, B. CARDELINO, H.S. FUHRMAN, R.F. JOHNSON
J. Am. Chem. Soc. (1981), 103 , 1750
- 27 D. H. ANDREWS, R. J. KOKES
"Notions fondamentales de Chimie", Dunod, (1965), 543
- 28 A. HARADA, M. FURUE, S. NOZAKURA
Macromolecules (1976), 9 , 705
- 29 V. S. PSHEZHETSKII, A.P. LUKYANOVA, V. A. KABANOV
J. Molec. Catal. (1977), 2 , 49
- 30 E.M. KOSOWER, H. DODIUK, K. TANISAWA, M. OTTOLENGHI, N. ORBACH
J. Am. Chem. Soc. (1975), 97 , 2167
- 31 K. DIMROTH, C. REICHARDT
Justus Liebig Ann. Chem. (1963), 663 , 1
- 32 C. J. SELISKAR, L. BRAND
J. Am. Chem. Soc. (1971), 93 , 5405
- 33 Z.R. GRABOWSKI, K. ROTKIEWICZ, A. SIEMARCZUK, D. COWLEY, W. BAUMANN
Nouv. J. Chim. (1979), 3 , 443
- 34 W. O. McCLURE, G. M. EDELMAN
J. Biol. Chem. (1971), 246 , 1185
- 35 H. KONDO, H. NAKATANI, K. HIROMI
J. Biochem. Jpn. (1976), 79 , 393

-
- 36 A. HARADA, M. FURUE, S. NOZAKURA
Macromolecules (1977), 10 , 676
- 37 F. V. BRIGHT, G. C. CATENA, J. HUANG
J. Am. Chem. Soc. (1990), 112 , 1343
- 38 G. C. CATENA, F. V. BRIGHT
J. Fluorescence (1991), 1 , 31
- 39 G. C. CATENA, F. V. BRIGHT
Anal. Chem. (1989), 61 , 905
- 40 A. HARADA, M. FURUE, S. NOZAKURA
Polym. J. (1980), 12 , 29
- 41 D. J. JOBE, R.E. VERRAL, R. PALEPU, V.C. REINSBOROUGH
J. Phys. Chem. (1988), 92 , 3582

CHAPITRE V

UTILISATION DES PVAm BENZYLEES DANS LA CATALYSE DE L'HYDROLYSE DU PNPA

INTRODUCTION

Parmi les fonctions des biopolymères (les réactions enzymatiques, l'immunologie, les phénomènes de transport), les interactions des macromolécules ou des protéines avec des composés de faible poids moléculaire ont une grande importance. Beaucoup de travaux ont été effectués dans ce domaine, utilisant diverses molécules comme substrats tels les colorants ou autres sondes fluorescentes. La fluorimétrie donne des informations sur la polarité et la rigidité de l'environnement ou encore sur le pouvoir de solubilisation de ces sondes. Cette technique a été appliquée à la mise en évidence de changements de conformation de polymères synthétiques utilisés comme modèles des protéines. Ainsi, on a étudié l'influence du pH^{1,2} sur la conformation de l'acide polyméthacrylique ou encore l'environnement hydrophobe du NaPSS^{3,4} et de la vinyl pyrrolidone^{5,6}.

La polyvinyl pyridine est un exemple classique de polyélectrolyte cationique. Lorsqu'elle est quaternisée par de longues chaînes alkyles, elle possède un domaine hydrophobe en solution aqueuse qui lui donne les propriétés de polysavon. La formation de micelles intramoléculeaires compactes a été prouvée par viscosité⁷, diffusion de la lumière⁸, et mesure de tension de surface⁹... En étudiant le mécanisme d'interaction entre les colorants et les polysavons¹⁰ ainsi que de la mobilité de sondes radicalaires en solution contenant des polysavons¹¹, IJIMA et al. ont démontré que le microenvironnement des polysavons était beaucoup plus hydrophobe et rigide que celui des micelles de tensio-actifs de faible poids moléculaire. On sait que le micro-domaine hydrophobe formé par les polysavons est un site qui privilégie l'accélération des réactions d'hydrolyse et de décarboxylation^{12,13}. D'autre part, KOLTZ et al. ont rapporté que la PEI branchée (b-PEI) greffée par des groupements hydrophobes a un bon pouvoir solubilisant vis à vis des petites molécules qui est proche de celui de la sérum albumine bovine, et est dotée d'excellentes capacités catalytiques, proches de celles des enzymes^{14,15,16,17}. Les interactions entre le pyrène et les résidus hydrophobes de la b-PEI ont été étudiées¹⁸. SISODO et al. ont également étudié ces polymères en présence de radicaux libres stables, ils ont conclu que la structure du domaine est constituée de deux parties : un domaine hydrophobe de faible mobilité et un milieu environnant où la mobilité est importante¹⁹. PSHEZHETSKII et al. ont trouvé un fort pouvoir hydrolysant à la PEI linéaire (l-PEI) greffée par des groupes alkyles ou benzyles. Ils ont expliqué cette activité par la formation de structures globulaires proches de celles des protéines^{20,21}.

SEO a rapporté une forte amélioration des propriétés catalytiques de la PAA par greffage de groupements benzyliques, ceux-ci forment un domaine capable d'inclure le substrat et d'accélérer son hydrolyse^{22,23}. Le milieu réactionnel de ces

dérivés de la PAA a été étudié par fluorescence²⁴ de diverses sondes chargées ou non chargées. La nature du substituant influe sur la conformation de ces polycations en solution et d'autre part, la variation du pH fait changer la conformation en affectant le pouvoir d'inclusion du substrat.

Après avoir mis en évidence les propriétés catalytiques assez faibles de la PVAm en comparaison à d'autres polybases (voir Chapitre IV), et vu les conséquences positives apportées par le greffage de groupements hydrophobes sur les autres polyamines (voir ci-dessus), nous allons à présent tenter d'observer si cette même modification apportera également une amélioration du pouvoir catalytique de la PVAm.

A/ CATALYSE

I CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les conditions expérimentales dans lesquelles nous avons travaillé sont identiques à celles que nous avons utilisées pour les systèmes catalytiques précédents :

- Tampon Tris- HCl pH = 8,74
- (PNPA) = 10^{-4} M ; 0,5% en acétonitrile
- T° = 25°C

II RESULTATS ET DISCUSSION

1 Résultats expérimentaux

La Figure 1.V montre une évolution linéaire de la constante de vitesse k_{obs} en fonction de la concentration en polymère et indique que la réaction suit une loi cinétique de second ordre.

On voit d'après la pente de ces droites que le taux de benzyltion des polymères a une influence sur leurs propriétés catalytiques ; la Figure 2.V montre que cette influence n'est pas proportionnelle à la quantité de noyaux benzyliques greffés.

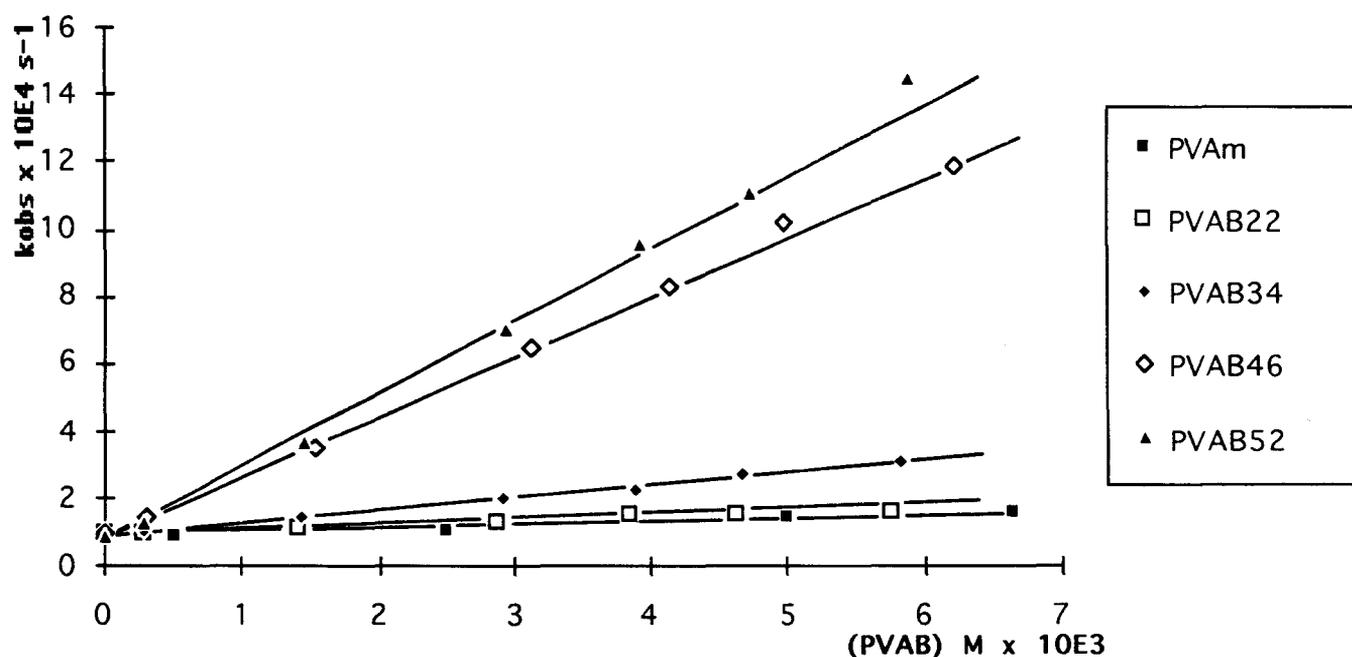


Figure 1.V : Evolution de k_{obs} en fonction de la concentration en unités monomères pour des systèmes catalyseurs dont le taux de benzyltion varie.

La courbe représentée sur la Figure 2.V indique que l'activité catalytique des polymères de la série PVAB ne devient vraiment sensible qu'à partir d'un DS supérieur à 40%. En deçà de cette valeur, l'activité catalytique reste voisine de celle de la PVAm.

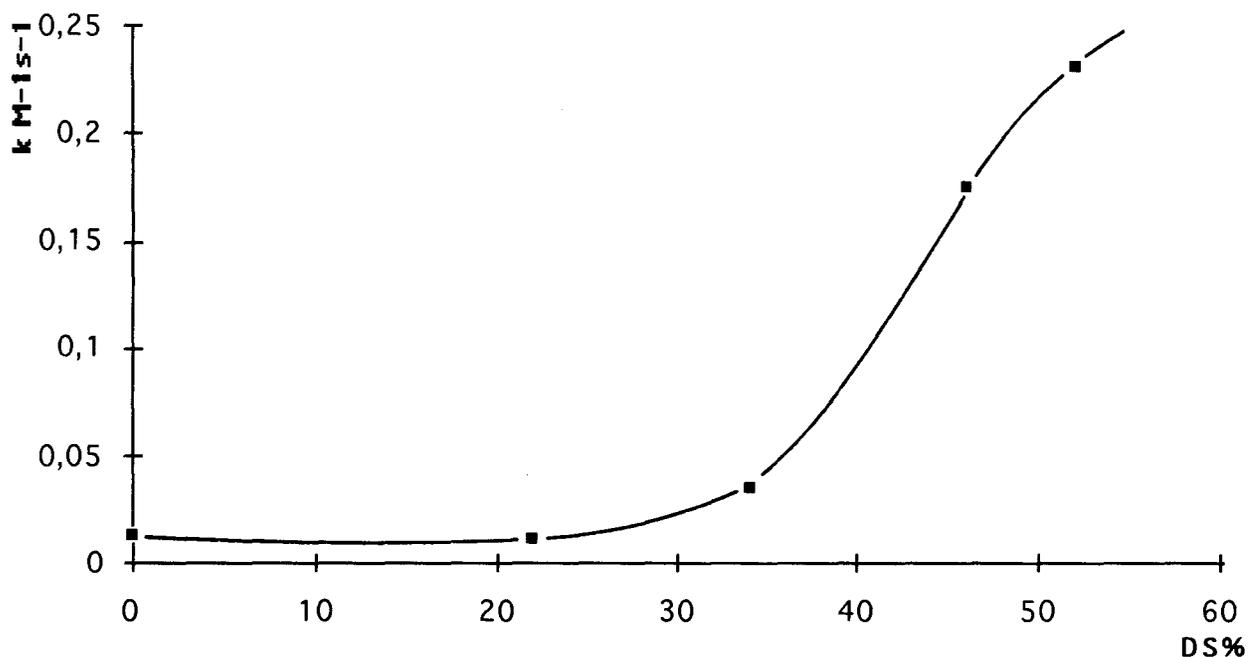


Figure 2.V : Variation de la constante de vitesse du second ordre en fonction du degré de substitution du polymère en groupements benzyles exprimé en %.

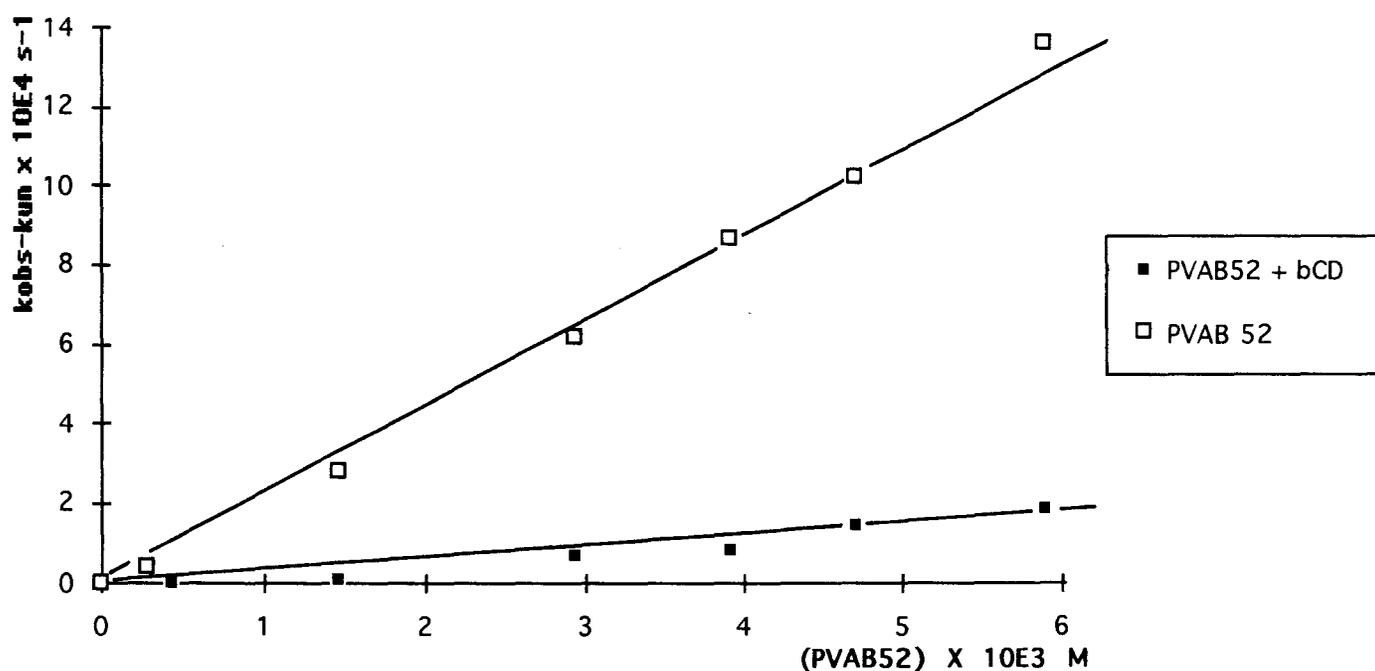


Figure 3.V : Constantes du pseudo premier ordre en fonction de la concentration en PVAB52 en présence ou en absence de βCD.

Enfin, la Figure 3.V montre que l'hydrolyse du PNPA par les polymères benzylés en présence de cyclodextrine $10^{-2}M$, révèle une inhibition de l'activité de ceux-ci quelque soit leur DS. Ainsi l'activité catalytique de PVAB52 est divisée par 20 en présence de β CD.

2 Interprétations

La substitution de 40-50 % des fonctions amines du polymère par des benzyles conduit à une augmentation considérable des propriétés catalytiques : grâce à une forte concentration en noyaux aromatiques, le polymère possède un domaine hydrophobe apolaire qui favorise l'inclusion du substrat en l'accumulant à proximité des fonctions amines qui ont le rôle de sites actifs. Au contraire, les polymères de DS inférieurs ont, comme l'ont montré les mesures de viscosité, une structure non compacte. Ceci implique que le domaine hydrophobe est "ouvert" au solvant, et plus polaire et a un pouvoir d'inclusion réduit par rapport à celui des structures plus compactes (nous étudierons cet aspect dans la partie suivante). On peut aussi évoquer pour cette catégorie de polymères le fait que leur domaine hydrophobe ne serait pas réparti de manière statistique sur la longueur de la chaîne, mais formerait des séquences relativement courtes. On peut expliquer ceci par la formation de sites préférentiels de greffage en supposant qu'une molécule de chlorure de benzyle viendrait réagir à proximité d'une fonction amine déjà benzylée. En plus du faible pouvoir d'inclusion du domaine hydrophobe de ces PVAm faiblement benzylées, notons que la diminution du nombre de fonctions amines primaires et donc du nombre de sites de réaction est également la cause de la faible augmentation des propriétés catalytiques (PVAB34) voir de leur stagnation (PVAB22). On pourra s'attendre au même phénomène pour des polymères de DS supérieur à 50 % qui certes auront un pouvoir d'inclusion important, mais auront également une très faible concentration en sites catalytiques ; d'ailleurs nous pouvons remarquer sur la Figure 2.V que la constante de vitesse du second ordre correspondant au catalyseur de DS = 52% qu'elle ne confirme pas l'augmentation "exponentielle" qui est amorcée pour les DS inférieurs.

Contrairement à ce qu'a rapporté PSHEZHETSKII à propos des PEI greffées par des substituants hydrophobes²⁵(voir Chapitre III), le pKa des amines primaires de la polyvinylamine augmente légèrement lorsqu'elle subit le greffage (voir Chapitre I). La modification des propriétés catalytiques n'est donc pas due à une concentration supérieure en groupements nucléophiles, mais ne provient que du caractère hydrophobe apporté par les résidus benzyliques.

La présence de β CD dans le milieu inhibe l'activité des PVAm benzylées : connaissant les propriétés de la cyclodextrine, celle-ci peut intervenir de deux façons : 1) elle peut encapsuler le substrat et donc l'empêcher de se combiner et de réagir avec le système catalyseur²⁶. 2) la β CD peut inclure les benzyles du polymère et ainsi détruire son caractère hydrophobe. C'est pour mettre en évidence une éventuelle destruction de la structure compacte du polymère PVAB52 par la β CD que nous avons procédé à une mesure complémentaire de viscosité : contrairement à nos attentes, la viscosité réduite est passée de 26 cm³/g pour le polymère seul à 6 cm³/g pour le mélange. Ainsi la β CD crée des interactions intramoléculaires supplémentaires. En fait, le même phénomène a été observé récemment au Laboratoire avec des polymères dérivés de la phényl alanine et a été expliqué par la formation d'un domaine concentré en complexes supramoléculaires dont la cohésion serait maintenue par liaisons hydrogène entre cyclodextrines ou entre cyclodextrine et amines. L'ajout d'urée dans le milieu provoque la rupture de ces liaisons et l'extension de la chaîne polymère.

En résumé, nous pouvons désormais avancer que l'inhibition de l'activité catalytique des PVAm benzylées par la β CD provient de la destruction de son domaine hydrophobe puis de l'augmentation de sa compacité qui empêche le substrat d'accéder jusqu'aux sites catalytiques.

B/ MESURE DU POUVOIR SOLUBILISANT PAR FLUORESCENCE DU TNS

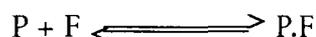
I CONDITIONS EXPERIMENTALES

La sonde fluorescente que nous avons utilisée est le TNS ; étant donné que le spectre d'absorption du polymère benzylé ne vient pas se superposer à celui du TNS, nous avons conservé les réglages du fluorimètre (bandes passantes, filtres...) et la longueur d'excitation de 315 nm utilisés dans l'étude des cyclodextrines greffées sur la PVAm (Chapitre IV).

II CALCUL DE Kd A PARTIR DES MESURES

La constante de dissociation Kd a été obtenue à partir de mesures d'intensité de fluorescence pour des solutions à concentration variable en polymère ($C_p = \text{(PUAB)}$), la concentration en TNS étant fixée à 5.10^{-6}M (C_0).

Le système consiste en un équilibre exprimé par :



Où P, F et P.F représentent respectivement le polymère, la sonde fluorescente et le complexe polymère-sonde.

Si la concentration en TNS libre est C_f et la concentration en TNS inclus dans le polymère est C_b , on obtient l'équation (1) quand $C_p \gg C_0$ et $C_0 = C_f + C_b$:

$$K_d = \frac{(P)(F)}{(P.F)} = (C_f (C_p - C_b))/C_b \# (C_p C_f)/C_b \quad (1)$$

En supposant que la fraction molaire en TNS inclus dans le polymère est $X_b = (I - I_0)/(I_\omega - I_0)$ et $C_b/C_f = X_b/(1-X_b)$ l'équation (1) donne :

$$I = K_d(I_0 - I)/C_p + I_\omega \quad (2)$$

Où I est l'intensité de fluorescence mesurée pour une concentration C_p donnée, I_0 et I_ω sont respectivement les intensités mesurées pour $C_p = 0$ et pour une complexation totale de toutes les molécules de TNS.

Kd est obtenue en traçant I en fonction de $(I - I_0)/C_p$ et l'intersection de la droite avec l'axe des ordonnées donne I_ω . Comme l'intensité de fluorescence du TNS

seul en solution est négligeable par rapport à celle que l'on mesure en présence de polymère ($I \gg I_0$), nous tracerons I en fonction de I/C_p .

III RESULTATS

La méthode de transformation des données expérimentales énoncée ci-dessus est appliquée, le diagramme obtenu pour chacune des PVAm benzylées est représenté sur la Figure 4.V :

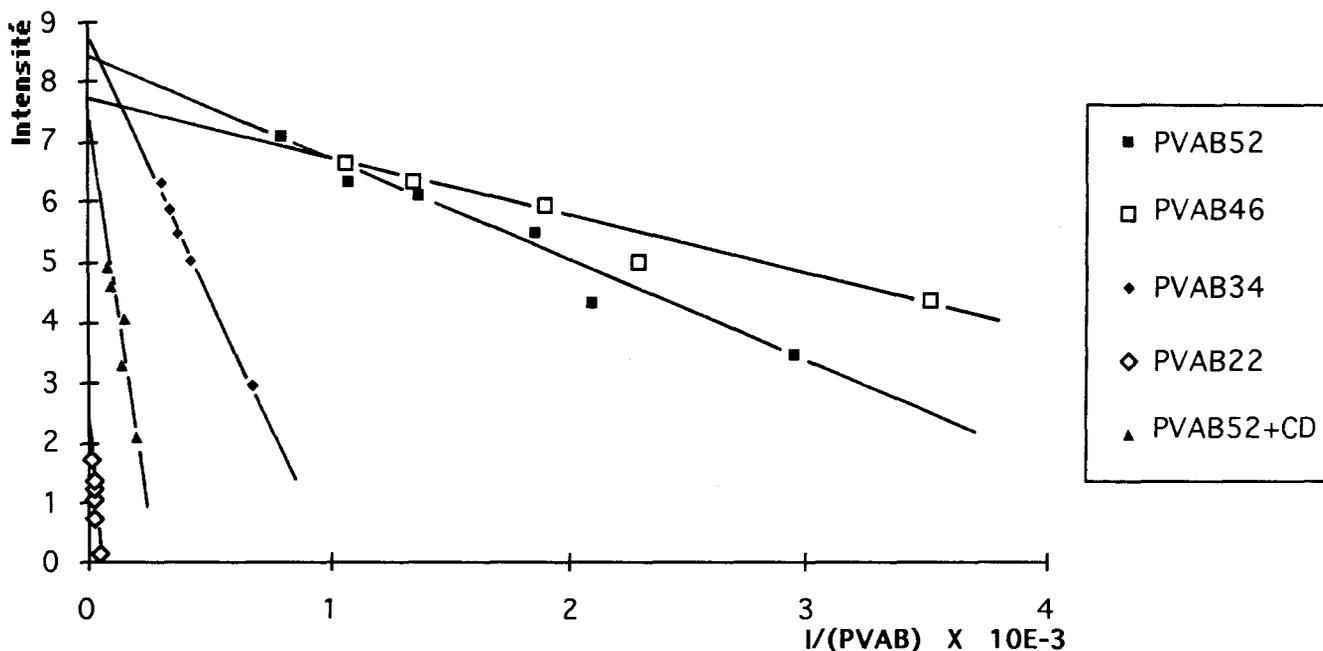


Figure 4.V : Diagramme I en fonction de $I/(PVAB)$ pour déterminer les constantes de dissociation de l'inclusion du TNS par les polymères de la série PVAB à pH 8,74(tris-HCl).

Le Tableau 1.V nous permet de constater que la stabilité de l'inclusion de la sonde augmente avec le degré de benzylation. Pour les DS les plus importants, on constate que K_d se rapproche des valeurs qu'a observées SEO sur une polyallylamine benzylée à 75%. λ_{max}^E est stable dans le domaine de concentration que nous avons utilisé pour le mélange TNS/PVAB22, mais varie en fonction de la concentration dans le cas des polymères plus substitués. Enfin, I_0 est faible pour le polymère le moins greffé et sa valeur se stabilise autour de 8 pour les DS supérieurs, y compris en présence de cyclodextrine qui fait cependant augmenter sensiblement K_d .

Polymère	$K_d \times 10^4 M$	λ_{max}^E nm	I_{ω}
PVAB22	45,1(4,5)	437	2,5
PVAB34	8,37(0,53)	442-436	8,58
PVAB46	0,92(0,41)	434-437	7,56
PVAB52	1,68(0,38)	432-436	8,44
PVAB52+CD	28,5(1,5)	427-432	7,34
PAABz (DS=0,75)(a)	0,31	432	-

Tableau 1.V : Valeurs de K_d , λ_{max}^E et I_{ω} relatives aux interactions PVAB-TNS en solution pH = 8,74. Entre parenthèses : l'incertitude sur les mesures. (a) : Référence 24.

IV INTERPRETATION DES RESULTATS

La stabilité des complexes augmente rapidement avec le taux de benzilation. On attribuera ceci à l'étendue croissante du domaine hydrophobe qui interagit avec des quantités croissantes de TNS, mais, étant donné que cette évolution n'est pas monotone, comme le montre la Figure 5.V, il convient d'en déduire que la conformation évolutive du polymère est responsable de la brusque hausse du pouvoir d'inclusion (première partie de la courbe). Pour les DS qui dépassent 45%, K_d semble se stabiliser ; il conviendrait d'élaborer des polymères de DS supérieurs pour savoir si la légère augmentation de la seconde partie de la courbe se confirme ou si la stagnation existe vraiment. Dans la première hypothèse, on pourrait interpréter la diminution du pouvoir d'inclusion par une compacité croissante des micelles qui n'autoriserait plus la pénétration de la sonde à l'intérieur ; dans le second cas, on peut avancer la possibilité d'un phénomène de saturation des micelles, qui ne pourraient accueillir davantage de TNS. La stabilité supérieure de l'inclusion du TNS par la PAACD²⁴ (voir Tableau 1.V) pourrait être due à l'existence du groupement méthylène espaceur supplémentaire entre la fonction amine et la chaîne qui, en éloignant les groupements benzyliques de celle-ci réduirait l'encombrement stérique du milieu hydrophobe.

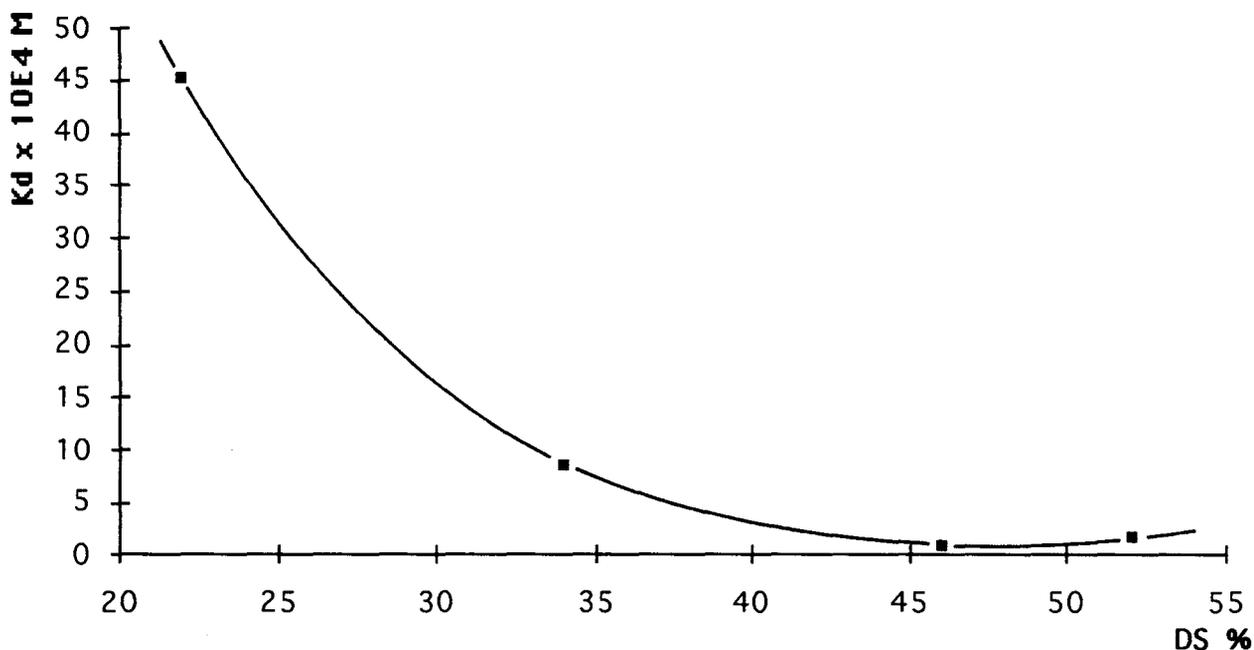


Figure 5.V : Courbe de variation de K_d en fonction du pourcentage de groupements benzyles greffés sur la PVAm. Sonde : TNS, pH = 8,74.

La valeur de λ_{max}^E de la sonde fluorescente étant en corrélation avec le degré hydrophobe du milieu dans lequel elle est incluse, nous constatons que, d'une manière générale, le microenvironnement de la PVAm benzylée est moins polaire que celui que nous avons mesuré dans le cas des cyclodextrines greffées ou non greffées ($\lambda_{\text{max}}^E \# 455\text{nm}$). En comparaison avec des systèmes micellaires tensio-actifs tels que les bromures de dodécyltriméthylammonium ou d'acétyl triméthylammonium ou encore le chlorhydrate de dodécylamine²⁴, on peut remarquer que le polymère forme un domaine hydrophobe moins polaire que ceux-ci.

La diminution de λ_{max}^E pour une concentration croissante en polymère (Figure 6.V) indique que sa structure subit une variation caractéristique de celle des polyélectrolytes : les forces de répulsions intramoléculaires diminuent lorsque la concentration du milieu augmente, les interactions hydrophobes peuvent alors s'exercer pour imposer le repliement des chaînes. Ainsi, on peut constater que ce repliement est accompagné d'une hausse du degré hydrophobe et d'une baisse de la polarité du microenvironnement.

Toutefois on peut voir sur la Figure 6.V que λ_{max}^E est moins influencé par la concentration lorsque le polymère est moins substitué et en déduire que le microenvironnement subit moins de changement. En effet, les mesures de viscosité ont révélé que, pour les faibles taux de benzylation, la structure du polymère reste relativement étendue, et que par conséquent les interactions hydrophobes ne sont pas suffisamment intenses pour pouvoir stabiliser une conformation micellaire. On

en déduit que la faible variation de la polarité que nous observons est due à la stabilité de conformation non compacte alors que pour les polymères davantage substitués, la variation importante accompagne la transition d'une structure étendue vers une structure compacte.

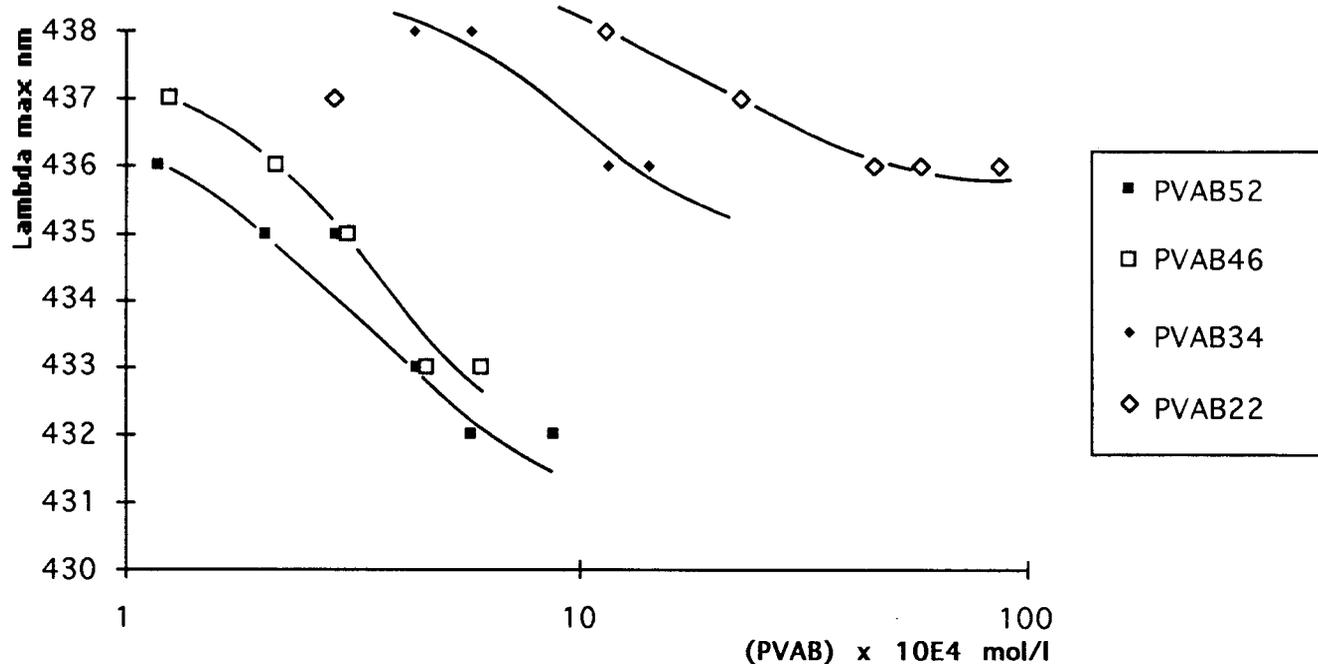


Figure 6.V : Influence de la concentration en polymère sur λ^E_{\max} du TNS. pH = 8,74.

Le décalage entre les courbes de la Figure 6.V suit l'ordre des taux de benzylation des polymères : λ^E_{\max} diminue lorsque DS augmente. Ces résultats indiquent que la polarité du microenvironnement des polymères dépend également de leur richesse en groupements benzyles. On peut établir sans problème et en accord avec ce qu'a observé SEO pour des PAA de divers DS²⁴ qu'il existe un lien entre la polarité et l'importance des forces hydrophobes qui régissent le pouvoir d'inclusion du polymère : autrement dit K_d et λ^E_{\max} évoluent de façon dépendante. En revanche, ω est faible pour PVAB22 et se stabilise à une valeur plus élevée pour les DS supérieurs. On attribuera ceci à la faiblesse des interactions hydrophobes qui laissent un degré de liberté important à la chaîne polymère et donc une faible rigidité du domaine hydrophobe qui autorise la relaxation du TNS par rotation intramoléculaire ; cette relaxation est défavorisée dès que les interactions hydrophobes sont suffisantes pour réduire les mouvements intrachaines.

Enfin, les mesures faites sur le mélange (Tableau 1.V) PVAB/ β CD/TNS apportent des informations concernant les interactions que nous avons remarqué au cours des applications catalytiques. La cyclodextrine fait augmenter fortement K_d qui

est multiplié par 30 par rapport à la mesure faite sur le système PVAB52/TNS : ainsi nous confirmons la diminution de l'affinité du polymère pour le substrat. La β CD, en venant complexer les résidus hydrophobes du polymère détruit son pouvoir d'inclusion ; la faible valeur de $\lambda_{\text{max}}^{\text{E}}$ et l'intensité de fluorescence importante indiquent que la fluorescence que l'on observe n'est pas typique des complexes β CD-TNS mais correspond plutôt à la fois aux caractéristiques d'un environnement très hydrophobe ($\lambda_{\text{max}}^{\text{E}}$) et très rigide (I_{ω}). La présence de la β CD au sein des micelles provoque leur resserrement (voir mesures de viscosité) donc un très fort encombrement et une rigidité qui ne permettent plus l'inclusion de quantités de substrat aussi importantes.

C/ CONCLUSION DU CHAPITRE V

Les investigations réalisées dans ce chapitre nous ont permises de mettre en évidence les effets du greffage de groupements hydrophobes sur la PVAm. Les conséquences sont à la fois d'ordre chimique et d'ordre conformationnel ; la variation des propriétés chimiques a été mise en évidence par potentiométrie et par le suivi d'une cinétique de réaction tandis que les changements conformationnels ont été observés par fluorescence et par viscosimétrie. Les propriétés chimiques varient non seulement à cause du caractère hydrophobe accru du polymère, mais aussi par la modification de sa conformation. Ainsi nous pouvons constater la complémentarité entre les Courbes 2.V et 5.V qui font clairement apparaître la relation entre les propriétés catalytiques et le pouvoir d'inclusion du polymère. L'ajout de cyclodextrine dans des solutions contenant ces polymères a pour effet de détruire leur microdomaine hydrophobe par encapsulation des noyaux aromatiques, ceci se traduit par l'inhibition de leurs propriétés catalytiques.

Pour compléter ces travaux, il serait intéressant de faire une étude systématique des polymères de la série PVAB en faisant varier le pH du milieu ainsi qu'en utilisant une sonde fluorescente non chargée afin de mettre en évidence l'influence du degré de charge sur la conformation et le pouvoir d'inclusion du polymère. D'autre part une synthèse de polymères plus substitués ($DS > 50\%$) pourrait nous permettre de connaître l'évolution des propriétés catalytiques et complexantes et de confirmer ou non si elles tendent effectivement vers un palier comme notre étude le laisse prévoir. De cette façon nous pourrions établir pour quel degré de substitution l'activité catalytique atteindrait sa valeur optimale, valeur qui dépendrait du meilleur compromis entre le nombre de sites catalytiques et le pouvoir d'inclusion du polymère.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE V

- 1 B. ERNY, G. MULLER
Polym. Sci., Polym. Chem. Ed. (1979), 17 , 4011
- 2 Y. WANG, H. MORAWETZ
Macromolecules (1986), 19 , 1925
- 3 Y. KURIMURA, H. YOKOTA, K. SHIGEHARA, E. TUSHIDA
Bull. Chem. Soc., Jpn. (1982), 55 , 55
- 4 N..J. TURRO, T. OBUKO
J. Am. Chem. Soc. (1982), 104 , 2985
- 5 E. KILLMANN, R. BITTLER
J. Polym. Sci., Part C (1972), 39 , 247
- 6 T. TAKAGISHI, Y. NAOI, N. KUROKI
J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed. (1977), 15 , 2789
- 7 U. P. STRAUSS, N. L. GERSHEFELD
J. Phys. Chem. (1954), 58 , 747
- 8 H. INOUE
Kolloid Z.Z. Polym. (1964), 195 , 102
- 9 H. E. JORGENSEN, U. P. STRAUSS
J. Phys. Chem. (1961), 65 , 1873
- 10 Y. ANDO, J. KOMIYAMA, T. IIJIMA
Nippon Kagaku Kaishi (1981), 432
- 11 Y. MAKINO, K. HAMADA, T. IIJIMA
Polym. J. (1987), 19 , 737
- 12 T. RODULFO, J. A. HAMILTON, E. H. CORDES
J. Org. Chem. (1974), 39 , 2281
- 13 T. KUNITAKE, S. SHINKAI, S. HIROTSU
J. Org. Chem. (1977), 42 , 306
- 14 I. M. KOLTZ, V. H. STRYKER
J. Am. Chem. Soc. (1968), 90 , 2717
- 15 G. P. ROYER, I. M. KOLTZ
J. Am. Chem. Soc. (1969), 91 , 5885
- 16 I. M. KOLTZ, G. P. ROYER, A. R. SLONIEWSKY
Biochemistry (1969), 8 , 4752
- 17 T. W. JOHNSON, I. M. KOLTZ
Macromolecules (1973), 6 , 788

-
- 18 R. A. PRANIS, I. M. KOLTZ
Biopolymers (1977), 16 , 299
- 19 M. SISIDO, K. AKIYAMA, Y. IMINISHI, I.M. KOLTZ
Macromolecules (1984), 17 , 198
- 20 V. S. PSHEZHETSKII, A.P. LUKYANOVA, V. A. KABANOV
J. Molec. Catal. (1977), 2 , 49
- 21 V. S. PSHEZHETSKII, G. M. NIKOLAEV, A. P. LUKJANOVA
Eur. Polym. J. (1977), 13 , 423
- 22 T. SEO, T. KAJIHARA, T. IIJIMA
Makromol. Chem. (1990), 191 , 1665
- 23 T. SEO, T. KAJIHARA, K. MIWA, T. IIJIMA
Makromol. Chem. (1991), 192 , 2357
- 24 T. SEO, S. TAKE, K. MIWA, K. HAMADA, T. IIJIMA
Macromolecules (1991), 24 , 4255
- 25 V. S. PSHEZHETSKII, G. A. MURTAZAEVA, V. A. KABANOV
Eur. Polym. J. (1974), 10 , 581
- 26 T. SEO, T. KAJIHARA, K. MIWA, T. IIJIMA
Makromol. Chem. (1991), 192 , 2357

CONCLUSION GENERALE

La polyvinylamine a été synthétisée puis fonctionnalisée par la β -cyclodextrine ainsi que par des groupements benzyliques.

La réaction de greffage de la β CD sur la PVAm a pu être contrôlée par la stoechiométrie des réactifs de départ ou par la durée de réaction, cependant le rendement obtenu est assez faible puisque le degré de substitution ne dépasse pas 5%. Ces copolymères ont été utilisés comme catalyseurs dans l'hydrolyse du PNPA et la cinétique de la réaction suit la loi de *Michaelis-Menten* (contrairement aux mélanges de β CD et de PVAm). L'activité catalytique mesurée est toujours supérieure à celle de la β CD non greffée ; une action coopérative des cavités hydrophobes avec les fonctions amines du polymère a été mise en évidence. L'existence de liaisons hydrogène entre la β CD et la PVAm provoque la désactivation de ces systèmes en diminuant la quantité de fonctions amines libres disponibles pour l'attaque du substrat ; c'est pourquoi nous avons mesuré l'activité la plus importante pour les polymères possédant le plus de fonctions amines en excès, autrement dit, les plus faiblement substitués. La photoluminescence s'est révélée être un moyen efficace pour démontrer que malgré une distance moyenne importante entre deux motifs porteurs de cyclodextrine, les repliements de la chaîne autorisaient ceux-ci à se rapprocher suffisamment pour inclure coopérativement le TNS pour former des complexes ternaires stables. Nous pouvons conclure que bien que n'ayant pas obtenu de polymères aussi abondamment greffés que nous pouvions l'espérer par rapport à ceux décrits dans la littérature, nous avons mesuré des activités catalytiques et un pouvoir d'inclusion du même ordre et parfois supérieur à ces derniers.

L'étude menée sur les PVAm benzylées a répondu aux attentes que nous pouvions formuler en comparaison avec les résultats parus concernant d'autres polyamines identiquement fonctionnalisées. Les renseignements apportés par la technique de fluorescence ou la viscosimétrie nous ont aidés à comprendre comment les groupements benzyliques modifiaient la conformation du polymère en formant un microdomaine hydrophobe plus ou moins apolaire capable de solubiliser des quantités variables de composés aromatiques tels que le TNS ou le PNPA. La cyclodextrine associée à ces polymères provoque une forte baisse de leur activité catalytique en détruisant leur pouvoir solubilisant par encapsulation des groupements hydrophobes, apportant une preuve supplémentaire de leur action coopérative avec les sites catalytiques.

Les deux systèmes catalytiques que nous venons d'étudier, en dehors du polymère de base, possèdent des caractéristiques communes quant à leur mode d'action : leur efficacité est liée à la coexistence dans un domaine restreint d'un

milieu hydrophobe complexant (micelle ou cavité) combiné à un site catalytique (fonction amine).

Des investigations supplémentaires sont à envisager pour compléter ce travail : des essais supplémentaires de purification conduisant à une β CD monotosylée nous permettraient de maîtriser davantage les propriétés du polymère greffé ; en effet nous nous sommes peu intéressés à l'effet des groupements tosyles résiduels qui sont probablement inhibiteurs puisqu'ils peuvent être soupçonnés d'occuper une partie des cavités de la cyclodextrine. La mise en évidence des interactions électrostatiques ou hydrophobes qui régissent l'action de nos deux types de polyvinylamines greffées est à approfondir en faisant varier la nature de l'ester de nitrophénol, en utilisant des substrats chargés, ou encore en testant des sondes fluorescentes non chargées (pyrène). Enfin, l'effet stéréosélectif propre aux réactions catalysées par les cyclodextrines pourrait être mis en évidence par l'utilisation d'autres isomères du nitrophénol (ortho, méta) ou encore par des fonctions ester portant des radicaux tels que des acides aminés estérifiés par le nitrophénol.

ANNEXES

ANNEXE 1

Bull. Soc. Chim. Belg. vol. 99 / n° 11-12 / 1990
EUROPEAN SECTION

0037-9646 / 90 / \$ 2.00 + 0.00
© 1990 Comité van Beheer van het Bulletin v.z.w.

SORPTION OF ORGANIC COMPOUNDS FROM WATER WITH NEW POLYMER SORBENTS

Bernard Martel, Michèle Delporte, Yahya Lekchiri, Joëlle Morcellet, Michel Morcellet*
Laboratoire de Chimie Macromoléculaire, URA 351 du CNRS, Université des Sciences et Techniques
de Lille, 59655 Villeneuve D'Ascq Cédex

Dedicated to Professor G. Smets on the occasion of his 75th birthday

ABSTRACT

New organic polymer sorbents based on macroporous polymers containing amino groups and β -cyclodextrin residues have been synthesized by suspension polymerization. The sorption capacity of these sorbents with respect to organic pollutants such as phenol has been determined and discussed in terms of polarity and specific interactions.

KEYWORDS

Sorbents, polymers, pollutants, aromatic compounds, β -cyclodextrin .

INTRODUCTION

Organic pollutants, especially aromatic compounds, are toxic even at low concentration in water and thus it is necessary to dispose of sorbents able to quantitatively recover these compounds from water even at very low concentration. For qualitative and quantitative analyses, preconcentration is also generally required.

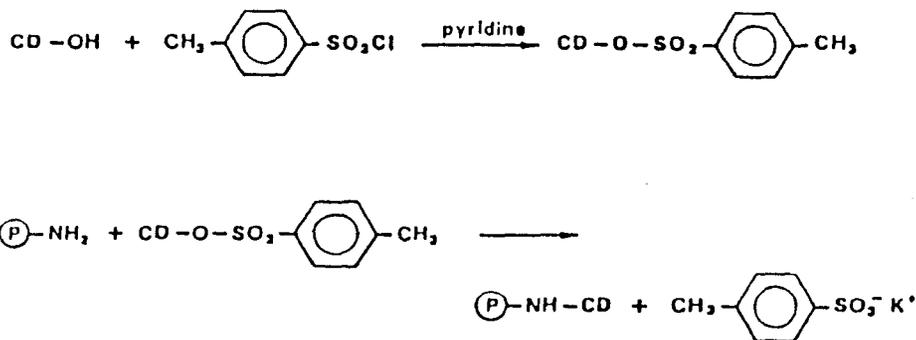
Porous organic polymers sorbents (Amberlite XAD [1, 2], Tenax GC [2], Separon [3], Hitachi gels [4]) are widely used for this purpose. In water, the degree of interaction between organic solutes and these polymers which are mostly hydrophobic rest upon hydrophobic interactions. As a consequence, the capacity of the sorbent is closely related with its specific surface. In addition, it has been reported that the degree of interaction between organic compounds and these polymers generally increases with increasing boiling point of the solute. Therefore it is difficult to sorb specific organic solutes selectively [5].

When using more polar sorbents such as Amberlite XAD-7 containing acrylic esters, better results are obtained with more polar solute (for example phenol) than with Amberlite XAD-2 based on polystyrene [6] and thus a higher selectivity may be foreseen.

In order to further increase the selectivity with respect to aromatic polar compounds, cyclodextrin based resins have been proposed [6]. Cyclodextrins are torus-shaped oligosaccharides made up of 6, 7 or 8 glucopyranose units which are noted α , β or γ -CD. They have the ability to form specific inclusion complexes with organic compounds, especially aromatics, the stability of the complex depending on how the guest molecule fits into the cavity of the CD. In that work [6], CD was cross-linked with diisocyanates of various nature and the efficiency of the resulting CD-polyurethane resins was compared with that of Amberlite XAD.

In this paper we described the synthesis and sorption properties of a new type of polymer sorbent combining the following features :

- a high specific surface
- a rather polar character due to the presence of an amino group
- a CD moiety not directly involved in the polymer network in order to retain its flexibility and ensure maximum efficiency in the formation of the inclusion complexes.



SCHEME 3.

Methods

The surface area of the porous polymers were obtained from nitrogen adsorption-desorption measurements following the B.E.T. method [15]. Porous volume was obtained from mercury porosimetry.

Sorption measurements: Sorption capacities of the polymers were determined by the following batch method: 20 mg of the polymer was mixed with 10 ml of an aqueous solution of benzene or phenol (concentration range: 50-1000 ppm) in a tight closed flask. From time to time, the residual concentration of the organic compound in aqueous solution was determined spectrophotometrically and the sorption capacity calculated.

RESULTS AND DISCUSSION

Starting from NVTBC and styrene as comonomers, different series of polymers were prepared, varying the ratios of comonomers and using pure DVB, DMG or mixtures as the cross linking agent [10]. Some of these polymers were used for modification with β -CD, especially those containing the higher amounts of $-\text{NH}_2$ groups, after solvolysis.

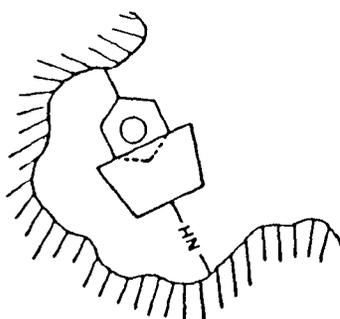
We only report here the results obtained with two samples referred to thereafter as GD701010 and G70 obtained by using starting mixtures containing 70, 10, 10, 10 and 70, 0, 0, 30 weight % of NVTBC, Styrene, DVB and DMG respectively. These samples contain 3.23 and 3.84 meq/g of the carbamate residue and have a specific surface of 128 and 28 m^2/g (Tab. 1). The removal of the protecting carbamate group is not always complete (about 60% for GD 701010). For the β -GD samples, the amount of immobilized β -CD increases with reaction time and molar ratio β -CD/VA but remains low compared to the similar reaction on linear poly(vinylamine) [16]. In addition, the amount of immobilized β -CD is not correlated with the physical

TABLE 1.

Sample	meq/g NVTBC or VA	S m^2/g	V _p cm^3/g	CD $\mu\text{mol/g}$	Reaction time (h)	$\beta\text{CD}/\text{VA}$
GD 70	3.84	28	1.49	-	-	-
GD 70-s	3.75	16	1.32	-	-	-
β -GC 70-1	"	-	-	45	24	.2
β -GC 70-2	"	-	-	50	48	.2
β -GC 70-3	"	-	-	85	48	.5
GD 701010	3.23	128	1.86	-	-	-
GD 701010-s	2.35	170	1.67	-	-	-
β -GD 701010-1	"	103	-	7	24	.2
β -GD 701010-2	"	85	-	32	48	.2
β -GD 701010-3	"	77	-	60	48	.5

features of the macroporous bead (specific area and porous volume) but is directly related with the concentration of VA groups.

The solvolysis reaction, i.e. the removal of the bulky t-butylcarbamate residue increases the specific area and has little effect on the porous volume. On the contrary, the incorporation of β -CD decreases the specific area. This is due to the bulky size of β -CD and also to its interaction with the aromatic groups of the polystyrene matrix which leads to a partial covering of the internal surface of the pores (Scheme 4).



SCHEME 4.

Sorption Experiments were carried out with benzene and phenol as solutes. None of the G70's samples was able to sorb appreciable amounts of these compounds. This is in relation with their low specific area. Thus the following discussion concerns the GD701010 samples. FIG. 1 shows a typical curve obtained when recording the change with time of the optical density of a benzene solution in contact with the sorbent. The efficiency of the β -CD sorbent is slightly higher within the first period of contact which suggests that this sorbent should be better in column experiments. This is not the case when using phenolic solutions (FIG. 2). Otherwise, the maximum capacity is surprisingly obtained with the unmodified sorbent (Tab. 2). This is in relation with the decrease of the specific area. When the sorption capacity is calculated per g of sorbent and per m^2 of area (Tab. 2), it is clear that the incorporation of β -CD increases strongly the capacity.

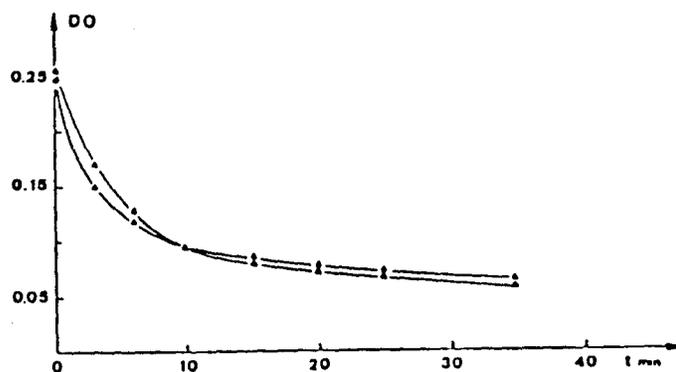


FIG. 1.

Time increase of the optical density of a 500 ppm benzene solution (10 ml) in contact with 20 mg of sorbent : (Δ) GD 701010-s; (\blacktriangle) β -GD 701010-3.

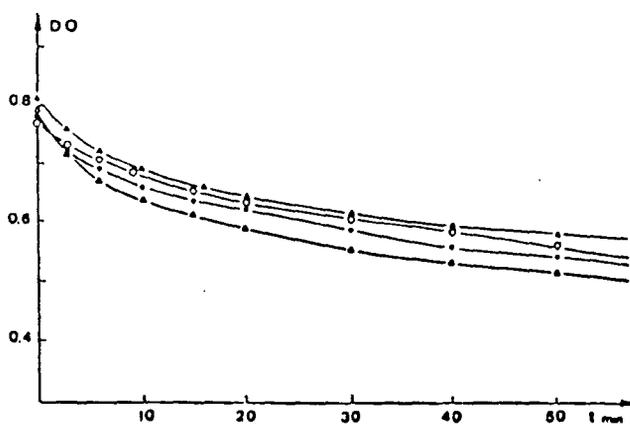


FIG. 2.

Time increase of the optical density of a 50 ppm phenol solution (10 ml) in contact with 20 mg of sorbent : (Δ) GD 701010-s; (o) β -GD 701010-1; (□) β -GD 701010-2; (\diamond) β -GD 701010-3.

TABLE 2.

Sample	S M ² /g	CD μ mole/g	Phenol μ mole/g b)	Phenol μ mole/g/m ²
Amberlite Beads				
XAD-2	330	-	28	0.085
Polystyrene				
XAD-7	450	-	75	0.165
Acrylic esters				
Cyclodextrin crosslinked by isocyanates	b)		c)	
1	250		60	0.24
2	260	= 750	53	0.20
3	170		55	0.32
GD701010	174	-	100	0.57
GD701010/ β CD				
1	103	7	88	0.85
2	85	32	82	0.96
3	77	60	80	1.03

Our results may be compared to those obtained with Amberlite XAD-2 and -7 and with β -CD polyurethane resins [6].

All our sorbents show higher absolute sorption capacity.

The effect of the polarity of the sorbent appears clearly when comparing XAD-2, XAD-7 and GD701010. XAD-7 has a capacity three times higher than XAD-2 because of the presence of polar ester functions. The

capacity of GD 701010 is still higher because of the presence of amino groups, despite of its lower specific area.

Another interesting point is to compare GD 701010 with the polyurethane resin of Ref [6] which derives from butanediol crosslinked by a diisocyanate and contains no β -CD (PU-0 of Table 2). Despite of its highly polar nature and of its rather good specific area, this polymer is unable to sorb phenol. This should be assigned to differences in the physical nature of these polymers : in the latter case, the polymer is of the gel type, whereas GD 701010 has a macroporous structure, much more rigid, making easier the access of the solvent inside the bead.

Though they contain much more β -CD than our samples β -GD 1, 2 and 3, polyurethane resins PU-1, 2, or 3 (about 750 μ mol β -CD/g), have a lower capacity towards phenol. In the PU resins, about 7 among the 21 hydroxyl groups of β -CD are involved in crosslinking [6], thus strongly reducing the mobility of the β -CD cavity.

From these results, it follows that an efficient β -CD sorbent for solutes like phenol should present these features :

- to be of macroporous rather than gel type
- to have as high specific area as possible
- to contain polar groups- when β -CD is present, it should be attached to the matrix in such a way to keep the mobility of the CD cavity i.e. it should be attached by only one of the hydroxyl groups.

In order to further increase the efficiency of the sorbent used in this study, the following modifications could be tested :

- replace styrene by another comonomer to avoid the interaction of the aromatic ring of the support with the CD cavity.
- use a starting material with a higher specific area, for example crosslinked by pure DVB instead of a mixture of DVB and DMG
- place a spacer between the matrix and the CD cavity to increase its mobility.

The sorbents used in this study can be easily regenerated by Soxhlet extraction with methanol and the sorption capacity remain unchanged after this treatment.

REFERENCES

1. J.D. White, D.P. Schwarz, *J. Chromatogr.*, **196**, 303 (1980).
2. N. Picer, M. Picer, *J. Chromatogr.*, **193**, 357 (1980).
3. Z. Voznakova, M. Popl, *J. Chromatogr. Sci.*, **17**, 682 (1979).
4. L.M. Majid, O. Samuelson, *J. Chromatogr.*, **193**, 197 (1980).
5. Y. Mizobuchi, M. Tanaka, T. Shono, *J. Chromatogr.*, **194**, 153 (1980).
6. Y. Kawaguchi, Y. Mizobuchi, M. Tanaka, T. Shono, *J. Chem. Soc. Jpn.*, **55**, 2611 (1982).
7. R. Hart, *Makromol. Chem.*, **32**, 51 (1959).
8. A.R. Hughes, T. St Pierre, *Macromolec. Synth.*, **6**, 31 (1977).
9. H. Jacobelli, M. Barthollin, A. Guyot, *J. Appl. Polym. Sci.*, **23**, 927 (1979).
10. H. Tbal, J. Morcellet, M. Delporte, M. Morcellet, *Eur. Polym. J.*, **25**, 331 (1989).
11. Y. Matsui, T. Yokoi, K. Mochida, *Chem. Lett.*, 1037 (1976).
12. R.D. Guthrie in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, **1**, 432.
13. M. Vikmon, *Proc. 1st Int. Symposium on Cyclodextrins, Budapest*, p. 69 (1982), Ed. J. Szejtli
14. C.K. Jue, P.N. Lipke, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **11**, 109 (1985).
15. S. Brunauer, P. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 309 (1938).
16. L. Januś, unpublished results.

ANNEXE 2

ETUDE THEORIQUE DE LA PHOTOLUMINESCENCE

I DESCRIPTION DES PHENOMENES

Les substances dites "photoluminescentes" ont la propriété de réémettre sous forme lumineuse une partie de l'énergie acquise par absorption d'un rayonnement lumineux.

Le spectre de la lumière émise se situe le plus souvent dans le domaine ultraviolet visible et il se trouve toujours déplacé, par rapport au spectre d'absorption, vers les plus grandes longueurs d'ondes.

Suivant la nature chimique du composé, l'état physique de l'échantillon (solution liquide, solution rigide, solide) et la température, on peut observer divers phénomènes de luminescence :

- Fluorescence normale ou rapide,
- Phosphorescence,
- Fluorescence retardée,

qui se distinguent soit par le domaine de longueur d'onde de l'émission (Figure A.1), soit par l'intervalle de temps qui sépare l'émission de l'absorption (durée de vie).

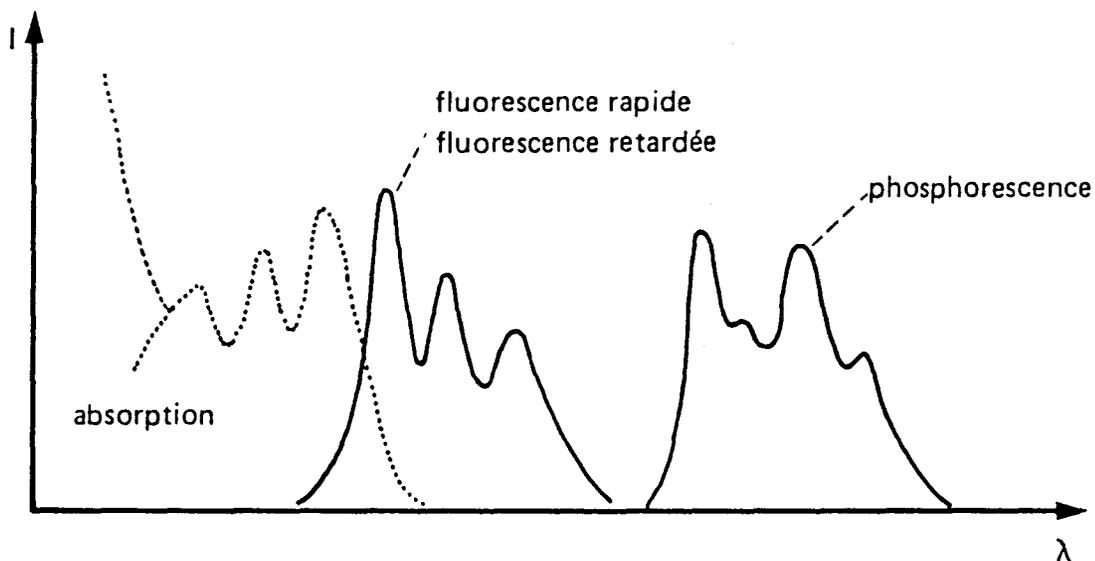


Figure A.1 : Position relative des spectres d'absorption, de fluorescence et de phosphorescence.

La fluorescence normale s'observe en général quel que soit l'état physique du composé et aussi bien à la température ordinaire qu'à basse température. Cette fluorescence se caractérise par un spectre d'émission dont les plus courtes longueurs d'onde sont égales ou même inférieures aux plus grandes longueurs d'onde du spectre d'absorption. La durée de vie de la fluorescence est toujours très courte (de 10^{-10} à 10^{-8} seconde), de sorte que, dans la plupart des dispositifs de mesure, cette émission ne peut être séparée, dans le temps, de l'excitation ; on parle souvent de *fluorescence rapide*.

Lorsqu'une substance présente de la phosphorescence, celle-ci se manifeste essentiellement à l'état solide, en solution rigide, à basse température. La *phosphorescence* se différencie de la fluorescence rapide, tout d'abord par la position de son spectre qui est déplacé vers les plus grandes longueurs d'onde. En outre la durée de vie de phosphorescence est considérablement plus longue (de 10^{-4} seconde à quelques secondes), ce qui permet, à l'aide d'un système mécanique, de séparer dans le temps, l'émission de phosphorescence de l'excitation. Ainsi, alors qu'avec une observation simultanée on voit à la fois la fluorescence et la phosphorescence, l'introduction d'un déphasage de l'observation permet d'éliminer la fluorescence.

Quant au phénomène de *fluorescence retardée*, il se rencontre seulement pour quelques substances dans les états physiques où se manifeste la phosphorescence. Le spectre de cette émission est identique à celui de la fluorescence rapide. Par contre l'intervalle de temps qui sépare l'émission de l'excitation est, dans ce cas, de l'ordre de la grandeur de la durée de vie de la phosphorescence. En conséquence, la fluorescence retardée et la phosphorescence apparaissent ensemble lorsque l'observation est déplacée par rapport à l'excitation.

L'intensité des phénomènes peut être diminuée par certains composés appelés inhibiteurs. En particulier pour certains systèmes, l'oxygène possède un effet inhibiteur important, ce qui oblige à dégazer soigneusement les solutions à étudier.

Pour des concentrations élevées en substances luminescentes, on observe également une diminution de l'intensité émise. Il s'en suit que l'intensité de luminescence n'est proportionnelle à la concentration que dans un certain domaine de concentration, la valeur limite dépendant du composé et de l'état physique de l'échantillon.

Les spectres de fluorescence et de phosphorescence décrits ci-dessus sont, comme d'ailleurs les spectres d'absorption, caractéristiques pour un composé pour des conditions expérimentales déterminées. Ces spectres peuvent donc être utilisés pour identifier des substances et effectuer une analyse qualitative. D'autre part l'intensité de l'émission est, pour des conditions expérimentales données, proportionnelle à la concentration du produit, ce qui rend possible une analyse quantitative.

Pour de telles analyses, qualitatives ou quantitatives, les méthodes de luminescence présentent, par rapport aux techniques d'absorption, l'intérêt d'une sensibilité environ 10^3 supérieure. Ce gain considérable en sensibilité résulte de ce que la longueur d'onde d'observation diffère de plusieurs dizaines de nanomètres de la longueur d'onde d'excitation.

Le domaine d'application de la luminescence ne se limite pas, en réalité à l'aspect analytique. Ainsi les phénomènes de fluorescence et de phosphorescence dépendent étroitement de l'environnement de la molécule considérée et des conditions expérimentales (nature chimique du solvant, pH, viscosité, concentration, température...). Le déplacement des spectres de luminescence et leurs intensités permettent d'analyser au niveau électronique, l'état de la molécule et ses interactions avec le milieu.

II ORIGINE ELECTRONIQUE DU PHENOMENE DE FLUORESCENCE

Lorsque une molécule reçoit une radiation lumineuse de longueur d'onde convenable, il se produit un phénomène d'absorption. Suivant la longueur d'onde de la lumière absorbée, l'énergie acquise par la molécule est convertie soit en mouvement de rotation (longueurs d'onde supérieures à 30μ , soit en mouvements de vibrations (longueurs d'onde comprises entre 1 et 30μ), éventuellement accompagnés de rotations, soit enfin, pour des énergies plus élevées (longueurs d'onde inférieures à 1μ) en une modification de la structure électronique de la molécule.

Les phénomènes de luminescence correspondant à des émissions dans l'ultraviolet ou le visible, mettent en jeu des changements de la distribution électronique au sein de la molécule.

Si l'on considère les énergies associées aux différents états électroniques d'une molécule, on peut construire un diagramme des niveaux énergétiques (Figure A.2).

Il faut remarquer que chaque niveau est séparé en un certain nombre de sous-niveaux correspondant aux divers états de vibration de la molécule dans la distribution électronique considérée.

Le niveau d'énergie le plus faible correspond à l'état *fondamental* de la molécule, les autres sont relatifs aux états excités. Parmi ceux-ci, on distingue généralement deux catégories : les états singulet et les états triplet.

Les états ou niveaux singulet se caractérisent par le fait qu'ils peuvent être atteints directement à partir de l'état fondamental par absorption d'une longueur d'onde convenable. Au contraire, les états ou niveaux triplets ne peuvent être obtenus par absorption directe à partir du niveau fondamental ; ils résultent d'une transformation, interne à la molécule, à partir d'un état excité singulet.

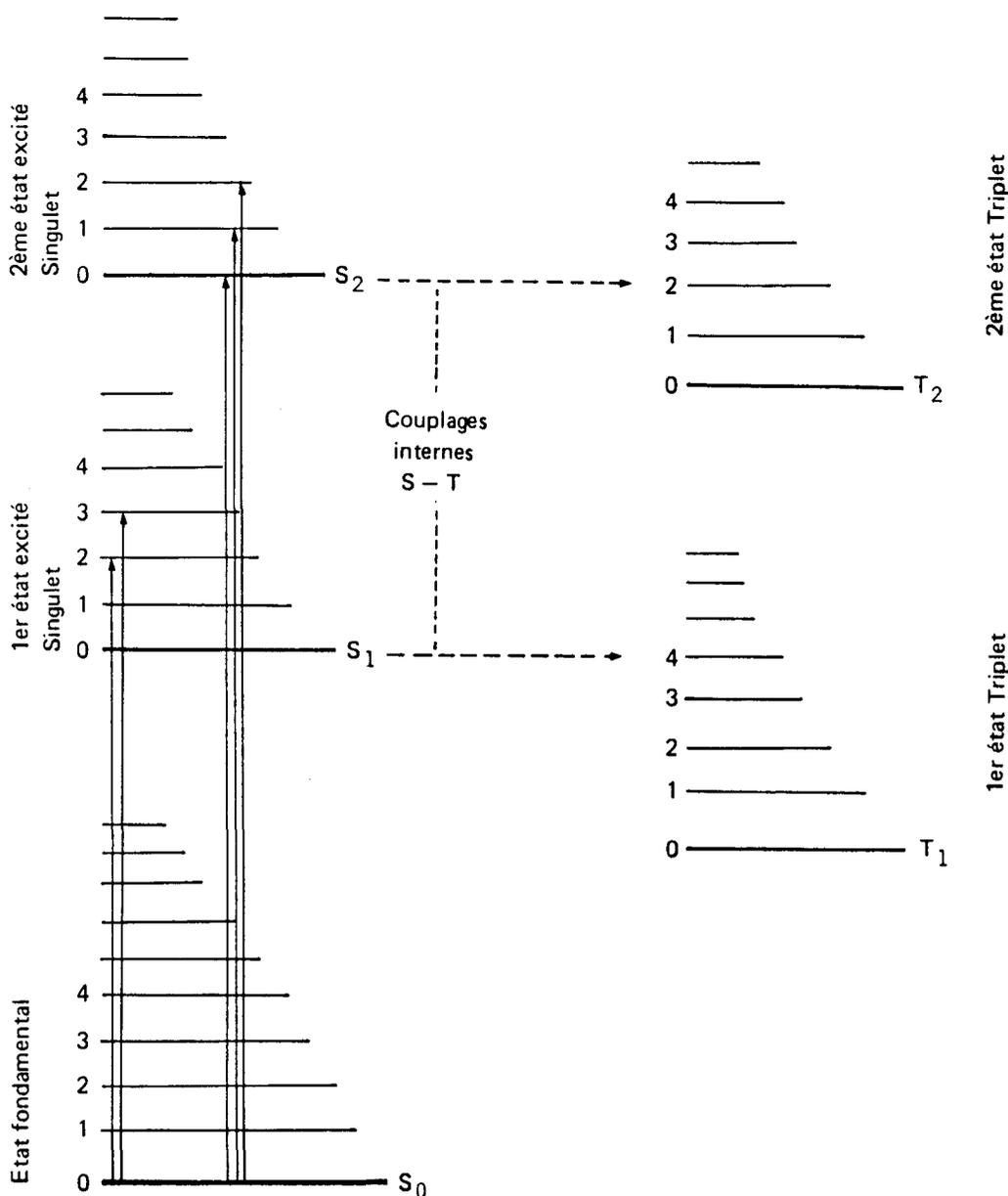


Figure A.2 : Diagramme des niveaux d'énergie des divers états électroniques d'une molécule

1 Absorption

La molécule se trouvant généralement dans le plus bas niveau d'énergie, c'est à dire le niveau vibrationnel 0 de l'état fondamental, l'absorption d'une radiation lumineuse la fait passer selon la longueur d'onde envisagée dans l'un des états excités singulets.

Le spectre d'absorption d'un composé est donc constitué d'une succession de bandes correspondant aux diverses transitions électroniques (Figure A.3). Suivant les cas, il peut apparaître ou non une structure vibrationnelle de la bande relative à une transition déterminée ; cette structure vibrationnelle traduit le passage de la

molécule de l'état fondamental aux différents niveaux vibrationnels de l'état excité considéré (Figure A.3, 1ère transition).

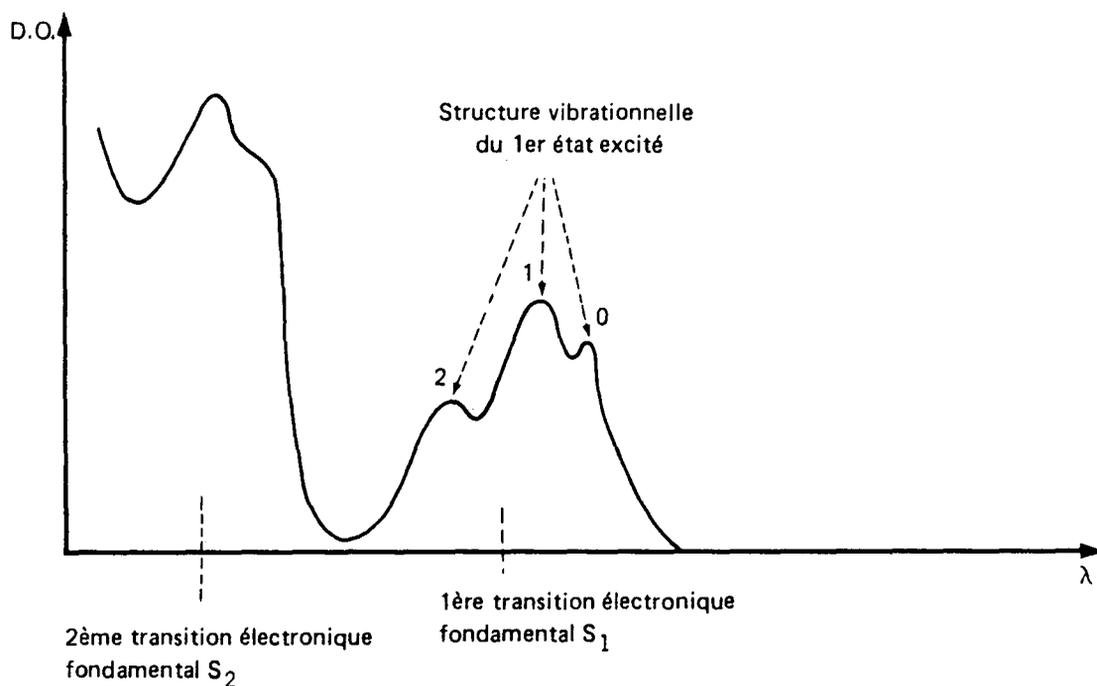


Figure A.3 : Spectre d'absorption avec 2 transitions électroniques séparées.

2 Fluorescence

Considérons le diagramme des niveaux énergétiques singulet d'une molécule (Figure A.3) :

La molécule étant supposée dans le plus bas niveau vibrationnel de l'état fondamental, l'absorption d'un photon d'énergie convenable la fait passer dans l'un des niveaux vibrationnels d'un état excité donné (Figure A.4 (a)). Le temps nécessaire pour une telle transition est de l'ordre de 10^{-15} secondes.

En réalité, la molécule ne peut rester dans un état excité ou vibrationnel élevé et des processus de reconversion d'énergie intramoléculaire la ramènent au plus bas niveau vibrationnel du 1^{er} état excité singulet (Figure A.4 (a-b)) . La durée de reconversion est de 10^{-13} à 10^{-11} seconde.

Dans le niveau vibrationnel du 1er état excité ainsi atteint, la molécule atteint une stabilité suffisante pour y demeurer, suivant les conditions, de 10^{-10} à 10^{-8} seconde. Le retour au plus bas niveau de l'état fondamental peut se faire de trois façons :

- Emission d'une radiation lumineuse ramenant la molécule à l'un des niveaux vibrationnels de l'état fondamental, suivie d'une reconversion d'énergie conduisant au plus bas niveau vibrationnel. Ce phénomène correspond à la *fluorescence* (Figure A.4(c)).

- Reconversion d'énergie soit au sein de la molécule, soit avec les autres molécules du milieu, sous forme d'énergie de rotation ou de vibration (Figure A.4 (c)).

Ce sont les transitions non radiatives.

- Transfert de l'énergie à une autre molécule qui passe alors, à son tour, dans un état électronique excité (Figure A.4(c)).

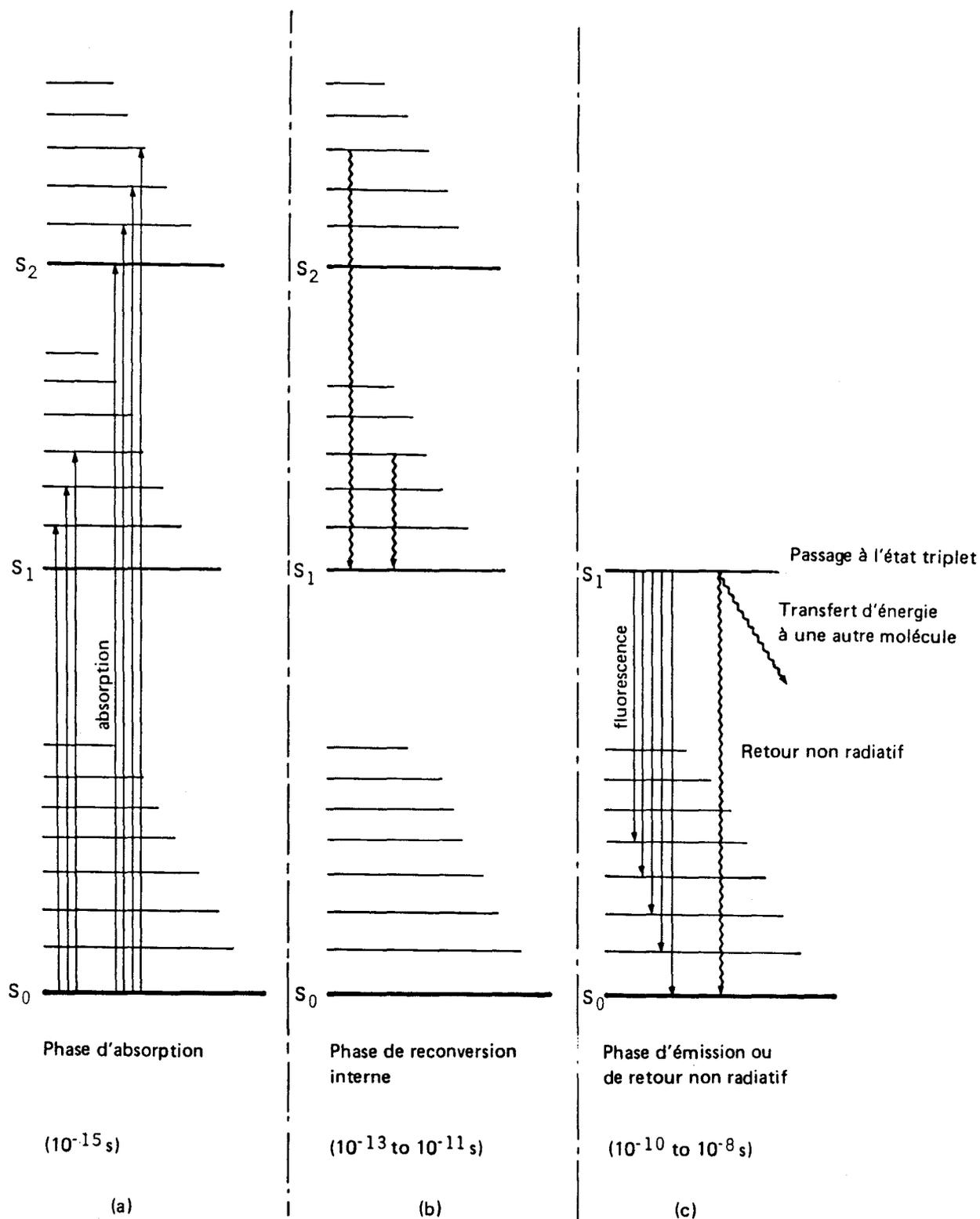


Figure A.4: Schéma de l'émission de fluorescence.

D'après le diagramme des niveaux d'énergie considéré ci-dessus, on voit que le spectre d'émission de fluorescence se situe toujours dans un domaine de fréquences inférieur (ou un domaine de longueur d'onde supérieur) à celui du spectre d'absorption (Figure A.1).

La durée de vie du premier état excité est une grandeur importante car c'est durant cet intervalle de temps que doivent agir les phénomènes physiques modifiant l'émission de fluorescence (transitions non radiatives, transfert d'énergie...).

Pour caractériser l'importance relative de l'émission de fluorescence par rapport aux autres processus, on définit le rendement quantique de fluorescence :

- Fraction des molécules excitées qui retournent à l'état fondamental par émission d'une radiation lumineuse.

Ou également :

- Rapport du nombre de photons émis par fluorescence au nombre de photons absorbés.

Il est intéressant de remarquer que, d'après l'analyse du phénomène de fluorescence qui a été faite, les processus qui affectent le rendement quantique interviennent presque exclusivement à partir du 1er état excité, en raison de la rapidité de reconversion d'énergie des états excités supérieurs (10^{-13} à 10^{-11} seconde). En conséquence, le rendement quantique ne dépend pas, normalement, de l'état excité atteint après l'absorption, c'est à dire de la longueur d'onde de la lumière excitatrice, pourvu qu'elle soit dans le domaine d'absorption du composé.

III ETUDE QUANTITATIVE DE LA FLUORESCENCE

La lumière de fluorescence est émise dans toutes les directions de l'espace et sur un assez large domaine de longueur d'onde. En conséquence, pour faire une étude quantitative du phénomène, il est nécessaire de considérer l'ensemble des photons émis dans tout l'espace sur l'étendue du spectre d'émission.

1 Intensité de fluorescence

La fluorescence totale, F , exprimée en quantas par seconde, émise dans tout l'espace sur l'ensemble des longueurs d'onde du spectre d'émission est liée à l'intensité I_a absorbée par l'échantillon, exprimée en quantas par seconde et au rendement quantique de fluorescence Φ_f , par :

$$F = I_a \cdot \Phi_f$$

Si l'on a affaire à une solution du composé fluorescent, en désignant par I_0 l'intensité incidente qui atteint l'échantillon, par I_t , l'intensité transmise, on a :

$$I_a = I_0 - I_t$$

Or l'intensité transmise I_t est donnée par la loi de BEER-LAMBERT :

$$I_t = I_0 e^{-2,3\epsilon.c.l}$$

Dans laquelle :

- ϵ est le coefficient d'extinction molaire du composé
- c la concentration molaire du composé dans la solution
- l la longueur du parcours en cm

Il s'ensuit donc :

$$I_a = I_0 (1 - e^{-2,3\epsilon.c.l})$$

Dans le cas de solutions très diluées, on peut développer le terme en exponentielle :

$$I_a = I_0 (2,3 \cdot \epsilon.c.l - 1/2 (2,3 \epsilon.c.l)^2 + \dots)$$

et, en négligeant le terme du 2ème ordre, écrire :

$$I_a = I_0 \cdot 2,3 \cdot \epsilon.c.l$$

Le tableau suivant donne l'erreur commise lors de cette approximation, pour différentes valeurs de la densité optique :

Densité Optique	Erreur sur I_a en %
0,001	+0,1
0,01	+1,1
0,05	+5,5
0,1	+10,6
0,2	+20

En supposant que l'on soit dans les conditions où l'approximation est valable, il vient :

$$F = I_0 (2,3 \cdot \epsilon.c.l) \Phi_f$$

Le coefficient d'extinction dépend de la longueur d'onde de la lumière incidente excitatrice λ_e , de sorte que l'on doit écrire : $\varepsilon(\lambda_e)$.

En ce qui concerne le rendement quantique de fluorescence Φ_f , on a vu dans l'origine électronique de la fluorescence qu'il ne dépend normalement pas de la longueur d'onde excitatrice.

L'expression de F devient donc :

$$F = I_0 (2,3 \cdot \varepsilon(\lambda_e) \cdot c \cdot l) \Phi_f$$

En pratique, dans le montage expérimental, on observe seulement la lumière émise dans un certain angle solide défini par la géométrie de l'appareil et, en outre on sélectionne, à l'aide d'un monochromateur ou d'un filtre, un certain intervalle de longueurs d'onde $d\lambda_f$ du spectre de fluorescence. Le nombre de quanta émis par seconde et par unité de largeur de bande passante d'émission est, dans ces conditions :

$$\frac{dF}{d\lambda_f} = K_1 I_0 (2,3 \cdot \varepsilon(\lambda_e) \cdot c \cdot l) \frac{d\Phi_f}{d\lambda_f}$$

où K_1 est la constante liée à la géométrie de l'appareil.

2 Spectre d'émission de fluorescence

On a vu que l'émission de fluorescence s'étendait sur un certain domaine spectral et, sur ce domaine l'émission n'est pas répartie de façon uniforme car parmi les transitions du plus bas niveau vibrationnel du premier état excité singulet aux divers niveaux vibrationnels de l'état fondamental, certaines sont favorisées.

La variation de l'intensité émise en fonction de la longueur d'onde d'émission constitue le spectre de fluorescence. Pour l'obtenir, on maintient constante la longueur d'onde λ_e de la lumière excitatrice et on fait varier la longueur d'onde λ_f du monochromateur analysant la lumière émise.

Le spectre d'émission consiste donc à déterminer la variation, avec λ_f , du nombre de quanta émis à λ_f pour une largeur de bande passante unitaire, à savoir avec les notations utilisées :

$$\frac{dF}{d\lambda_f} = f(\lambda_f) \quad \text{avec } \lambda_e = \text{constante}$$

$$\frac{dF}{d\lambda_f} = K_1 I_0 (2,3 \cdot \varepsilon(\lambda_e) \cdot c \cdot l) \frac{d\Phi_f}{d\lambda_f} = f(\lambda_f)$$

Or, comme I_0 et $\epsilon(\lambda_e)$ ne dépendent pas de la longueur d'onde d'émission, le spectre d'émission peut également s'exprimer par :

$$\frac{d\Phi_f}{d\lambda_f} = f(\lambda_f) \quad \text{avec } \lambda_e = \text{constante}$$

3 Spectre d'excitation de fluorescence

L'intensité de la lumière de fluorescence dépend du nombre de quanta de la lumière excitatrice qui ont été absorbés. Or on sait que l'absorption d'un composé varie avec la longueur d'onde λ_e ce que traduit la dépendance $\epsilon(\lambda_e)$ du coefficient d'extinction avec λ_e .

La variation de l'intensité de fluorescence avec la longueur d'onde de la lumière excitatrice constitue le spectre d'excitation. Pour l'obtenir on maintient constante la longueur d'onde λ_f de l'émission observée et fait varier la longueur d'onde λ_e de la lumière excitatrice.

Soit avec les notations utilisées :

$$\frac{dF}{d\lambda_f} = f(\lambda_f) \quad \text{avec } \lambda_f = \text{constante}$$

$$\frac{dF}{d\lambda_f} = K_1 I_0 (2,3 \cdot \epsilon(\lambda_e) \cdot c \cdot l) \frac{d\Phi_f}{d\lambda_f} = f(\lambda_e)$$

Pour obtenir l'influence réelle de la longueur d'onde d'excitation, il faut que l'intensité I_0 soit constante lorsque λ_e varie, de sorte que le spectre d'excitation se ramène à étudier :

$$\epsilon(\lambda_e) \cdot \frac{d\Phi_f}{d\lambda_f} = f(\lambda_e) \quad \text{avec } \lambda_f \text{ constante}$$

Dans le cas de composés isolés (par opposition aux mélanges composés), le rendement quantique de fluorescence Φ_f ne dépend généralement de la longueur d'onde d'excitation et le spectre d'excitation se réduit alors à :

$$\epsilon(\lambda_e) = f(\lambda_e)$$

Ce qui est précisément la définition du spectre d'absorption. Donc, pour un composé isolé, le spectre d'excitation est généralement identique au spectre d'absorption.

Il est à noter que dans le cas de mélanges de composés cette identité n'est plus respectée par suite, soit de phénomènes d'absorption supplémentaires soit de

transferts d'énergie entre les différents composés présents. Les spectres d'excitation sont donc extrêmement intéressants pour de telles études.

IV APPAREILLAGE

Nous avons accompli nos mesures de fluorescence avec un spectrophotomètre de marque PERKIN ELMER et dont le dispositif de mesure est organisé comme suit (Figure A.5) :

- Une source lumineuse émettant dans l'ultraviolet et le visible
- Un monochromateur destiné à choisir la longueur d'onde d'excitation
- Un dispositif optique permettant d'éclairer l'échantillon et de recueillir la lumière émise
- Un compartiment échantillon
- Un second monochromateur pour analyser la composition spectrale de la luminescence
- Un détecteur
- Un système de mesure et d'enregistrement

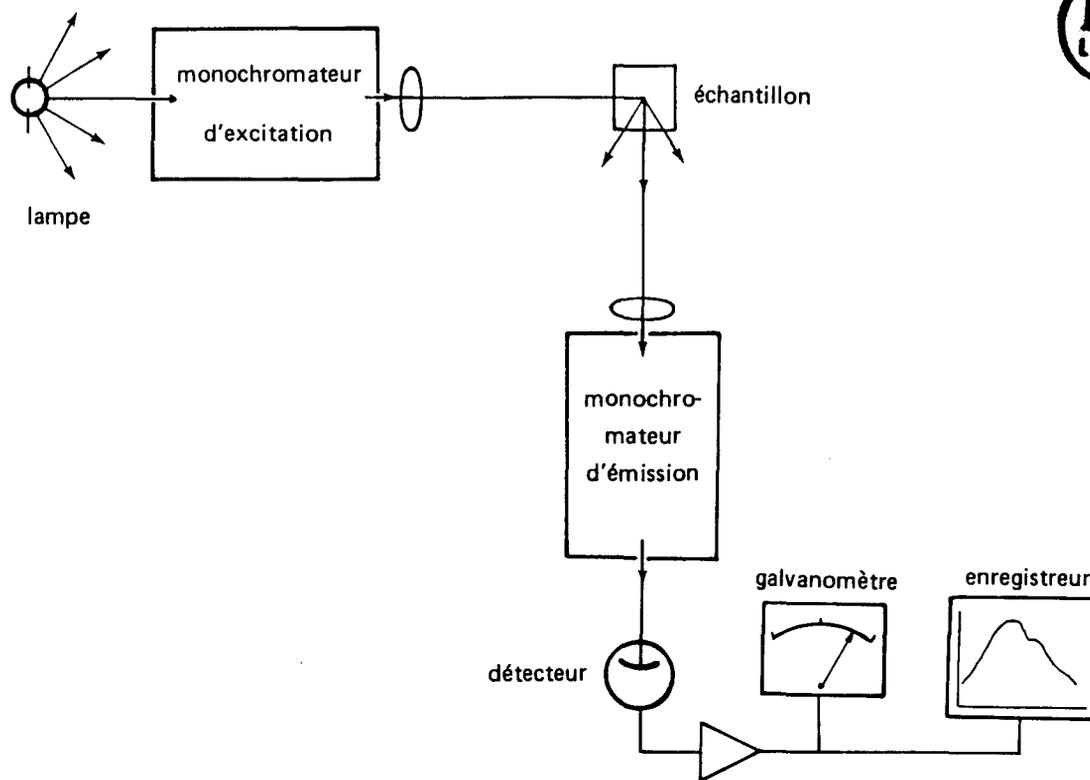


Figure A.5 : Schéma d'un appareil de luminescence.

ANNEXE 3

COMPTES RENDUS

HEBDOMADAIRES

DES SÉANCES

DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES

PUBLIÉS,

CONFORMÉMENT A UNE DÉCISION DE L'ACADÉMIE

En date du 13 Juillet 1835,

PAR MM. LES SECRÉTAIRES PERPÉTUELS.

TOME CENT-DOUZIÈME.

JANVIER — JUIN 1891.



PARIS,

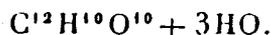
GAUTHIER-VILLARS ET FILS, IMPRIMEURS-LIBRAIRES
DES COMPTES RENDUS DES SÉANCES DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES,
Quai des Grands-Augustins, 55.

1891

CHIMIE ORGANIQUE. — *Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique.* Note de M. A. VILLIERS.

« J'ai montré dernièrement (*Comptes rendus*, février 1891, p. 435) que la fécule de pomme de terre peut, dans des conditions déterminées, fermenter sous l'action du *Bacillus amylobacter*, les produits principaux de cette fermentation étant constitués par des dextrines.

» Il se forme en même temps, mais en très petite quantité, soit environ 3^{es} pour 1000 de fécule, un hydrate de carbone qui se sépare en beaux cristaux radiés, au bout de quelques semaines, dans l'alcool ayant servi à la précipitation des dextrines. Ces cristaux renferment de l'eau et de l'alcool de cristallisation, la proportion de ce dernier étant très faible, environ 4 pour 100. Au contact de l'air, ils deviennent opaques, en perdant de l'alcool et absorbant de l'eau, sans que leur poids varie d'une manière notable. En les dissolvant dans une assez grande quantité d'eau chaude, on obtient, par refroidissement, de petits cristaux brillants, inaltérables à l'air, dont la composition est représentée par un multiple de la formule



La substance desséchée est très avide d'eau, et reprend au contact de l'air ses trois équivalents, l'absorption étant terminée au bout de un à deux jours, et le poids restant alors invariable. Cette hydratation est assez rapide pour qu'on ne puisse peser la substance sèche au contact de l'air.

» Quant aux cristaux formés dans l'alcool, leur composition répond à la formule



» Je donnerai ultérieurement les propriétés de ce nouvel hydrate de carbone, que je propose de désigner sous le nom de *cellulosine*, propriétés qui le différencient très nettement des diverses saccharines. J'indiquerai seulement aujourd'hui les caractères suivants :

» Cristaux blancs, d'une saveur à peine sucrée.

» La solubilité dans l'eau à la température ordinaire est très faible, ce qui ne m'a pas permis de déterminer le poids moléculaire par la méthode cryoscopique (100^{cc} d'eau à 15° ne dissolvent que 1^{er}, 3 de matière sèche). Cette solubilité augmente avec la température (à 70°, 100^{cc} dissolvent 15 à 16^{es}).

» Son pouvoir rotatoire est fort élevé ; il est même supérieur à celui de certaines dextrines qui se forment sous l'action du ferment butyrique. Rapporté à la matière déshydratée, il est égal à

$$\alpha_D = +159^{\circ},42,$$

valeur qu'il acquiert aussitôt après la dissolution.

» Soumis à l'action de la chaleur, il résiste sans fondre aux températures comprises dans l'échelle thermométrique. Si l'on continue à le chauffer, il noircit en se boursouflant.

» Il n'est pas fermentescible et ne réduit pas la liqueur cupropotassique.

» Les acides minéraux dilués le transforment complètement, à l'ébullition, en glucose. Cette transformation est très lente, et exige, pour être complète, environ vingt-quatre heures d'ébullition, c'est-à-dire un temps beaucoup plus considérable que la féculé et les dextrines.

» Il est sans action sur la phénylhydrazine.

» Je me suis assuré qu'il ne préexiste pas dans la féculé, et constitue bien, avec l'acide butyrique, un des produits secondaires de la fermentation de cette dernière, sous l'action du ferment butyrique.

» Je signalerai enfin un dernier produit secondaire, qui se forme simultanément. La fermentation de la féculé étant terminée, il reste un résidu insoluble, dont la proportion n'est pas constante (en moyenne 5 pour 100 de féculé), formé de flocons blancs, amorphes, volumineux, qui, après dessiccation, s'agglutinent entre eux. Ce résidu a la composition de la cellulose, ainsi que j'ai pu le constater par sa combustion, après l'avoir débarrassé, par un lavage à l'eau acidulée, des dextrines et des sels contenus dans l'eau. Il est transformé en glucose par les acides minéraux étendus bouillants; mais cette transformation ne se produit qu'avec une lenteur extrême.

» De même que la féculé de pomme de terre, les divers amidons et fécules fermentent, dans les mêmes conditions, sous l'action du ferment butyrique. Les produits résultants ne paraissent pas toujours identiques; avec un de ces amidons, j'ai pu obtenir deux cellulosines cristallisées distinctes; les dextrines ne sont pas non plus semblables dans tous les cas. Mais je me réserve de donner ultérieurement les résultats de cette étude, ceux que j'ai déjà obtenus indiquant la non-identité de la matière amylacée des divers amidons et des diverses fécules. »

