



Thèse

Approche semi-covalente pour la préparation de polymères imprimés par la technique de polymérisation en mini-émulsion

Présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Spécialité : Chimie Organique

Par

Pasquale Curcio

Soutenue le 26 juin 2009 devant la commission d'examen :

Prof. Jean-François NIERENGARTEN (Université de Strasbourg) Rapporteur interne

Prof. Karsten HAUPT (Université de Technologie de Compiègne) Rapporteur externe

Prof. Stéphane VINCENT (Université de Namur) Rapporteur externe

Dr. Rachid BAATI (Université de Strasbourg) Membre invité-Encadrant

Dr. Alain WAGNER (Université de Strasbourg) Directeur de thèse

Dr. Charles MIOSKOWSKI (Université de Strasbourg) Directeur de thèse

Remerciements

Le travail scientifique décrit dans ce manuscrit a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie des Systèmes Fonctionnels de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg sous la direction du Dr. Charles Mioskowski puis du Dr. Alain Wagner. Cette thèse a fait parti du projet européen IBAAC (Integrated Biomimetic Approach to Asymmetric Catalysis) sous le numéro de contrat: MCRTN-CT-2003-505020. Je voudrais en premier remercier l'Union Européenne qui par le biais de ce projet IBAAC, a soutenu le financement de cette thèse.

Je tiens également à remercier les professeurs Karsten Haupt, Jean-François Nierengarten et Stéphan Vincent de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

Ensuite, c'est avec une certaine émotion et beaucoup de sincérité que je voudrais remercier toutes les personnes suivantes qui ont donné beaucoup de leur temps et de leur expertise pour le développement, les tests, la méthodologie et la gestion de ce travail de thèse.

Je tiens d'abord à rendre hommage à Miko et lui exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je garderai toujours avec moi le souvenir des discussions scientifiques passionnées et chaleureuses que j'ai eu avec lui. Ainsi le souvenir d'une personne d'une grande créativité, n'hésitant pas à aborder des sujets nouveaux et parfois difficiles, autant de qualités qui définissent les grands chercheurs.

Je voudrais remercier le Dr. Alain Wagner qui a pris avec le même enthousiasme montré par Miko, le poste de directeur du laboratoire. Mon sujet de thèse étant déjà dans un stade avancé, il a été en mesure d'apporter des idées novatrices et très importantes pour la réussite de ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude au Dr. Rachid Baati. J'ai partagé avec Rachid la totalité de ce projet de thèse. Je le remercie pour son aide à mon arrivée ici à Strasbourg, pour ces encouragements constants pendant toutes les années de thèse ainsi que pour la correction de ce manuscrit.

Je remercie également le Dr. Stéphane Meunier pour son aide et son professionnalisme mais surtout pour les nombreuses signatures de papiers dont j'ignore la signification

encore aujourd'hui. Un grand merci à Michel Mosser, notre habile permanent, dont la présence est d'une extrême importance dans la vie du laboratoire.

Je souhaite remercier le service d'analyse de la Faculté de Pharmacie. Cyril pour les analyses RMN et pour son précieuse aide dans l'interprétation des spectres des monosaccharides. Patrick et Pascale pour les analyses de masse de mes composés.

Je tiens à remercier Nathalie, Marianne et notre "sicilienne" Liliane pour leur gentillesse et disponibilité, ainsi que pour toutes les démarches administratives.

Au cours de ce travail de thèse, j'ai eu l'occasion de discuter et de collaborer avec de nombreuses personnes à l'extérieur du laboratoire. J'exprime ma gratitude au Dr. Patrick Schultz et à Mme Christine Ruhlmann (IGBMC, Strasbourg) pour le service de microscopie à transmission électronique, le Dr. Céline Cakir-Kiefer pour son aide concernant l'utilisation du logiciel Prism, le Dr. Dominique Bégin (ECPM, Strasbourg) pour les mesures de surface spécifique.

Il est maintenant temps de remercier tous les collègues du laboratoire. Au cours de ces années de travail, j'ai eu le plaisir de rencontrer beaucoup de gens, et aujourd'hui c'est avec regrets que je me rends compte que je ne peux pas tous les citer. La première place du podium (et croyez-moi ça n'arrive pas souvent) est occupée par Cédric, mon grand ami ainsi que colocataire pendant ma dernière année à Strasbourg. Merci Cédric d'avoir partagé toutes les difficultés rencontrées au cours de cette thèse, aussi bien dans le travail que dans la vie quotidienne. Je n'oublie pas non plus ta disponibilité dans la réalisation des photos de microscopie électronique.

Un remerciement particulier à Christelle, Belén, Stefan avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer et travailler sur le sujet des polymères imprimés. Sans oublier Corinne ma première guide d'CLHP. Ensuite, j'embrasse fort fort fort Cynthia, Olivier, Ghyslain, Manu, "la portugaise" Sylvie, Géraldine, Cédric, qui m'ont apporté leur aide pendant tout le cours de la thèse. Je tiens également à les remercier pour tous les bons moments passés ensemble hors du laboratoire : les diners, les soirées, les nombreuses sorties dans Strasbourg...que de bons souvenirs que je garderai toujours avec moi.

Merci aussi aux immigrants du labo, le grand (en taille) Damien, le "rital" manqué Jeremy, "il montagnolo" Cyril, Renaud, Carine et Vanessa, pour tous les bons moments passés

ensemble. Pour Jeremy: je pas oublié ton injection d'acide acétique..." stai attento che la vendetta é un piatto che va servito freddo!!!"

Je ne peux pas oublier et donc adresser un remerciement à tous les amis rencontrés à Strasbourg. Vous n'imaginez pas combien il est difficile de tous les citer. Merci merci beaucoup à Pauline (peut-être un jour je te pardonnerai ☺ !!!), Irene la lucana super à la mode qui n'est pas mal non plus à la cuisine !!! Puis je tiens à citer tous mes amis espagnols qui ont été toujours prêt à faire la fête et à me faire changer les idées.

Je ne peux pas oublier les nombreuses défaites mais également les innombrables victoires sur les terrains de foot d'Illkirch. Pour cette raison, que je remercie tous mes amis footballeurs.

Puis un remerciement chaleureux est adressé à une personne rencontrée il n'y a pas longtemps, mais qui est déjà très spéciale pour moi. Merci infiniment Laurence pour ton précieuse aide dans la rédaction de ce manuscrit. Ti sei meritata tanti tanti bacini, più di 40 milioni !

Le dernier remerciement est dédié à ma famille qui pendant toutes ces années passées loin de la maison, a toujours été près de moi, et qui n'a pas manquer d'encouragements dans les moments difficiles et qui a trouvé à chaque fois que cela été nécessaires les mots justes pour me reconforter.

Grazie infinitamente a tutti quanti.

Pasquale.

Leonardo da Vinci



"Meglio è la piccola certezza che la gran bugia"

SOMMAIRE

ABRÉVIATIONS	13
INTRODUCTION GENERALE	15
PUBLICATIONS	17
PRINCIPE ET APPLICATIONS DES POLYMERES IMPRIMES	19
1. Principe général et applications des polymères imprimés	21
1.1. Introduction	21
1.2. Principe général des empreintes moléculaires	21
1.3. Méthodes pour l'introduction des sites d'interactions dans les cavités de reconnaissance	23
1.3.1. Approche covalente	23
1.3.2. Approche non-covalente	24
1.3.3. Approche semi-covalente	25
1.3.4. Approche avec des liaisons de coordination	27
1.4. Facteurs intervenant dans la synthèse des MIPs	28
1.4.1. Influence de l'agent de réticulation	28
1.4.2. Influence du solvant	30
1.4.3. Influence de la température de polymérisation	31
2. Polymérisation en mini-émulsion	32
2.1. De la polymérisation en «bulk» à la polymérisation en mini-émulsion	32
2.2. Principes généraux de la polymérisation en mini-émulsion	35
2.2.1. Etudes sur l'homogénéisation de la mini-émulsion	36
2.3. Préparation des empreintes moléculaires <i>via</i> la polymérisation en mini-émulsion	38
3. Évaluation des propriétés des MIPs	40
3.1. Description de la méthode du « batch process»	40
3.2. Analyse de l'effet d'empreinte et de la sélectivité dans les polymères imprimés	41
3.3. Les courbes isothermes de complexation	42
4. Introduction des travaux de thèse	46
NOUVELLE APPROCHE POUR LA SYNTHÈSE DES EMPREINTES MOLECULAIRES	49

5. Combinaison de l'approche semi-covalente avec la méthode de polymérisation en mini-émulsion «one-stage»	51
5.1. Descriptions du procédé d'impression moléculaire	51
5.2. Antécédent bibliographique des MIPs préparés avec des templates phosphorés	53
5.2.1. Réactions d'hydrolyse d'esters	53
5.2.2. MIPs comme récepteurs d'analytes phosphorés	56
5.3. Synthèse des template phosphorés T1-T3	58
5.3.1. Synthèse du template tensioactif T1	58
5.3.2. Synthèse du template tensioactif T2	59
5.3.3. Synthèse du template tensioactif T3	61
5.4. Préparation des polymères imprimés	64
5.4.1. Définition des composantes du système de polymérisation	64
5.4.2. Formulation du mélange de polymérisation	64
5.4.3. Procédure de préparation de la mini-émulsion	66
5.4.4. Extraction de la molécule template	67
5.4.5. Préparation des polymères de contrôle	68
5.5. Caractérisation des polymères imprimés IP _{T1-T3} et des contrôles CP _{T1-T3}	70
5.5.1. Analyses élémentaires du phosphore	71
5.6. Test de reconnaissance moléculaire par la méthode du « batch process »: Evaluation de la capacité du polymère imprimé à complexer les analytes, effet d'empreinte, sélectivité	72
5.7. Evaluation des propriétés de reconnaissance moléculaire du polymère imprimé IP _{T1}	74
5.7.1. Capacité et effet d'empreinte	74
5.7.2. Étude de la sélectivité du polymère imprimé IP _{T1}	76
5.8. Evaluation des propriétés de reconnaissance moléculaire du polymère imprimé IP _{T2}	78
5.8.1. Capacité et effet d'empreinte	78
5.8.2. Étude de la sélectivité du polymère imprimé IP _{T2}	79
5.9. Evaluation des propriétés de reconnaissance moléculaire du polymère imprimé IP _{T3}	80
5.9.1. Capacité et effet d'empreinte	80
5.9.2. Étude de la sélectivité du polymère imprimé IP _{T3}	82
5.10. Test de reconnaissance du polymère imprimés IP _{T1} avec l'analyte 4	84
5.11. Application des polymères imprimés IP _{T1-T3}	85
6. Application de polymères imprimés IP_{T1-T3} comme catalyseurs asymétriques	86
6.1. Introduction: chiralité et catalyse asymétrique	86
6.2. MIPs comme catalyseur dans la réduction des cétones	88
6.3. Réduction énantiosélective des cétones prochirales	90
6.3.1. Définition de la chiralité en deux dimensions	90

6.3.2. Tentative de conception des polymères imprimés chiraux pour la réduction asymétrique des cétones	91
6.4. Tests de reconnaissance moléculaire des cétones C1 et C2 par les polymères imprimés IP _{T1} et IP _{T2}	94
6.5. Préparation d'un polymère imprimé pour la reconnaissance moléculaire de la cétone C2	95
6.5.1. Tests de reconnaissance moléculaire du polymère IP _{MAA} et CP _{MAA} avec la cétone C2	98
6.6. Synthèse du template T2 _{ch} chiral	99
6.7. Synthèse du polymère imprimé avec le template chiral T2 _{ch}	101
6.8. Tests préliminaires de réduction asymétrique avec le polymère imprimé IP _{ch}	102
6.9. Conclusion première partie	104

UTILISATION DE POLYMERES IMPRIMES COMME RECEPTEURS ARTIFICIELS DE SUCRES **107**

7. MIP comme récepteurs artificiels des monosaccharides	109
7.1. Introduction: les sucres dans le monde biologique	109
7.2. Description de différentes approches pour la préparation des MIP	110
7.2.1. Approche covalente	110
7.2.2. Approche non-covalente	111
7.2.3. Approche avec des liaisons de coordination	115
7.3. Polymères hydrogels comme récepteurs artificiels de monosaccharide	117

PREPARATION DE RECEPTEURS ARTIFICIELS DE MONOSACCHARIDES PAR POLYMERISATION EN MINI-EMULSION EN UTILISANT L'APPROCHE SEMI-COVALENTE **119**

8. Introduction	121
8.1. Structure du template polymérisable tensioactif T4 à base de glucose	121
8.2. Synthèse du template tensioactif T4	122
8.3. Préparation des polymères imprimés avec le template T4	123
8.3.1. Formulation des polymères imprimés IP _{T4-T5}	123
8.3.2. Procédure de préparation de la mini-émulsion	124
8.3.3. Extraction de la molécule template T4	125
8.3.4. Préparation du polymère de contrôle CP _{T4}	128
8.4. Caractérisation des polymères imprimés IP _{T4-T5} et du polymère de contrôle CP _{T4}	128
8.5. Evaluation des propriétés de reconnaissance des polymères imprimés IP _{T4} et IP _{T5} .	130
8.5.1. Capacité et effet d'empreinte des polymères imprimés IP _{T4} et IP _{T5}	130
8.5.2. Inhibition de la reconnaissance moléculaire par estérification des fonctions acides	132

8.5.3. Evaluation de la sélectivité du polymère imprimé IP _{T4}	133
8.6. Etude cinétique pour le polymère imprimé IP _{T4}	135
8.7. Caractérisation de l'homogénéité des sites d'interaction du polymère imprimé IP _{T4}	136
8.8. Application des modèles Langmuir et Freundlich au polymère imprimé IP _{T4}	138
8.9. Conclusions deuxième partie	141
PARTIE EXPERIMENTALE	147
BIBLIOGRAPHIE	189

Abréviations

Ac : acétyle

Acry : méthacrylate

AIBN : azoisobutyronitrile

AMBN : 2,2'-azobis(2-méthylbutyronitrile)

°C : degré celsius

CCM : chromatographie sur couche mince

CLHP : chromatographie liquide haute performance

DCM : dichlorométhane

DDQ : 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMF : N,N-diméthylformamide

DVB : divinylbenzène

EA : acétate d'éthyle

EGDMA : éthylèneglycoldiméthacrylate

eq : équivalent

h : heure

K_D : constante de dissociation

IR : infrarouge

M : molaire

mg : milligramme

min : minute

ml : millilitre

MeOH : méthanol

MIP : polymères imprimés

MMA : acide méthacrylique

mM ou mmol : millimole

PMB : *p*-Methoxybenzyl

ppm : partie par million

SDS : dodécylsulfate de sodium

TA : température ambiante

TBAF : fluorure de tétra-*n*-butylammonium

THF : tétrahydrofurane

µl : microlitre

µmol : micromole

Introduction générale

L'impression moléculaire est une technique permettant de préparer des récepteurs artificiels dans une matrice polymérique réticulée. Cette technique a connu un développement remarquable au cours des dernières décennies, et compte aujourd'hui un grand nombre d'applications potentielles, notamment l'utilisation de ces polymères comme phase stationnaire de colonnes chromatographiques, comme support dans l'extraction sur phase solide (SPE), comme nanoréacteurs pour la synthèse et comme catalyseurs chimiques. Les polymères imprimés (Molecular Imprinted Polymers: MIP) sont des matériaux préparés à partir de monomères fonctionnels, qui s'organisent autour de la molécule template pour former un complexe de pré-polymérisation. Celui-ci co-polymérise avec les différents monomères et agents de réticulation présents. Par la suite, l'extraction de la molécule template, conduit à la formation de sites ayant en théorie une complémentarité de forme et/ou de fonction avec la dite molécule. À ce jour, différentes molécules templates ont été utilisées pour préparer des polymères imprimés telles que des acides aminés, des peptides, des protéines, des composés biologiquement actifs, ainsi que des mono et oligosaccharides. La « qualité » des empreintes moléculaires dépend en grande partie de la force et de la spécificité des interactions entre les monomères fonctionnalisés et le template avant l'étape de polymérisation. La nature de ces interactions dans le complexe de pré-polymérisation permet de classer les différentes approches de fabrication des empreintes moléculaires. Deux approches basées sur des interactions covalentes et non-covalentes se distinguent. Dans l'impression covalente le template est lié de façon covalente à la matrice polymérique par un ou plusieurs groupes polymérisables, présents sur le template. Après extraction de la molécule cible par rupture de ces liaisons, la reconnaissance s'effectue également par des interactions de type covalentes entre l'empreinte et la molécule cible. Dans l'approche non-covalente les interactions entre les monomères et la molécule cible sont des liaisons faibles de type liaisons hydrogène, liaisons ioniques, π - π stacking, liaisons de Van Der Waals et interactions hydrophobes. Après extraction de la molécule imprimée, la reconnaissance s'effectue également par des interactions non-covalentes entre l'empreinte et la molécule cible. Une troisième approche, appelée semi-covalente, a été développée pour combiner les avantages des deux approches précédentes. La méthode consiste à utiliser un template ayant des groupements polymérisables (par exemple des esters méthacryliques), liés de façon covalente au polymère à la fin de la co-polymérisation. Ensuite, l'hydrolyse des esters méthacryliques laisse dans les cavités du polymère des fonctions acides carboxyliques capables de former des interactions non-covalentes (liaisons hydrogène) avec le template. Ces approches,

covalente, non-covalente et semi-covalente sont utilisées pour la synthèse des polymères imprimés généralement par une technique de polymérisation en masse ou polymérisation en «bulk». À la fin du procédé, le polymère est récupéré sous la forme d'un bloc, nécessitant une étape de broyage et de tamisage afin d'obtenir une poudre prête à l'utilisation. Une conséquence de ce procédé est que la forme des particules est très irrégulière et que la distribution des tailles est large. Cette hétérogénéité est généralement avancée comme principale cause de la large polydispersité des constantes d'affinité observées. De plus certains auteurs estiment que seulement 20% des sites de reconnaissance sont conservés après l'étape de broyage. Pour circonscrire ces limitations, différentes techniques de polymérisation ont été récemment développées. Ainsi, les polymérisations par précipitation et en émulsion ont été utilisées pour obtenir des empreintes moléculaires avec un meilleur contrôle de la taille des particules, des sites d'interaction mieux définis et ayant une meilleure affinité.

Ainsi, dans le cadre de mes travaux de thèse nous avons développé une nouvelle méthode qui combine l'approche semi-covalente et la méthode de polymérisation en mini-émulsion «one-stage». Cette combinaison permet d'obtenir des nanosphères imprimées en surface, avec un faible indice de polydispersité et surtout avec une population de sites d'affinité très homogène. De plus, l'impression moléculaire en surface des nanosphères préparées par polymérisation en mini-émulsion «one-stage», devrait assurer une meilleure accessibilité et extraction du template après polymérisation, qui reste à ce jour, l'un des principaux inconvénients de l'approche semi-covalente.

Dans la première partie de nos travaux de thèse, nous avons décidé d'étudier davantage les phénomènes qui régissent cette nouvelle technique d'impression moléculaire. Nous nous sommes intéressés à l'influence de l'augmentation du nombre d'acides carboxyliques, capables de faire ou de donner des liaisons hydrogène à l'intérieur des sites de reconnaissance, sur la sélectivité.

La série des MIP synthétisée a été caractérisée par des mesures physico-chimiques telles que l'analyse infrarouge, la détermination de la surface spécifique (BET), la mesure de la polydispersité (par diffusion de la lumière) et la microscopie électronique à transmission (MET).

Dans la deuxième partie de mes travaux de thèse, nous avons décidé d'appliquer la nouvelle technique de polymérisation, décrite ci-dessus, pour la préparation de nouveaux MIP capables de lier spécifiquement des monosaccharides, en particulier des dérivés du glucose.

Les glucides constituent une vaste famille de composés impliqués dans un grand nombre de processus biologiques, et la préparation de récepteurs artificiels pour ce type de composés représente à l'heure actuelle un challenge synthétique important.

Publications

- a) Pasquale Curcio, Christelle Zandanel, Alain Wagner, Charles Mioskowski[†] and Rachid Baati “**Semi-Covalent Surface Molecular Imprinting of Polymers by One-Stage Mini-emulsion Polymerization: Glucopyranoside as Model Analyte**”. *Macromol. Biosci.*, **2009**, 9, (N.A.). DOI: 10.1002/mabi.200900056.
- b) Pasquale Curcio, M. Belén Suárez Jiménez, Rachid Baati, Charles Mioskowski[†] and Alain Wagner “**H-bond effect on the selectivity of MIPs synthesized by miniemulsion/semi-covalent imprinting approach**”. *J. Mol. Recognit* (en cours de rédaction).

Communications orales

- 1) *Molecular Imprinted Polymer as Synthetic Receptors for Glucose.*
IBAAC Meeting- Strasbourg – 2004.
Université Louis Pasteur, Strasbourg, France, 23-24 mai 2005.
- 2) *Molecular Imprinted Polymer Nanospheres as Synthetic Receptors.*
IBAAC Meeting - Oxford – 2005.
Oxford University, Royaume-Uni, 8-9 décembre 2005.
- 3) *Synthetic Receptors and Stereoselective Reactions of Planar Compounds via MIP.*
IBAAC Meeting - Ljubljana – 2006.
National Institute of Chemistry, Slovenia, 1-2 juin 2006.
- 4) *Development of Molecular Imprinted Polymers for 2D-3D Chirality Transfer: Application to the Stereoselective Reduction of Planar Compounds.*
IBAAC Meeting- Bologna 2006. Université de Bologne, Italie, 1-2 décembre 2006.
- 5) *Development of Molecular Imprinted Polymers for 2D-3D Chirality Transfer: Application to the Stereoselective Reduction of Planar Compounds.*
IBAAC Meeting- Mülheim 2007. Max-Planck Institute, Allemagne, 24-25 mai 2007.

Introduction

Principe et applications des polymères imprimés

1. Principe général et applications des polymères imprimés

1.1. Introduction

Le nombre d'articles publiés ces vingt dernières années concernant la préparation de polymères imprimés ou empreintes moléculaires (notation: MIP, du terme anglais Molecular Imprinted Polymers) et leurs applications montre l'intérêt croissant porté par le monde scientifique à ce domaine de recherche (Figure 1)¹.

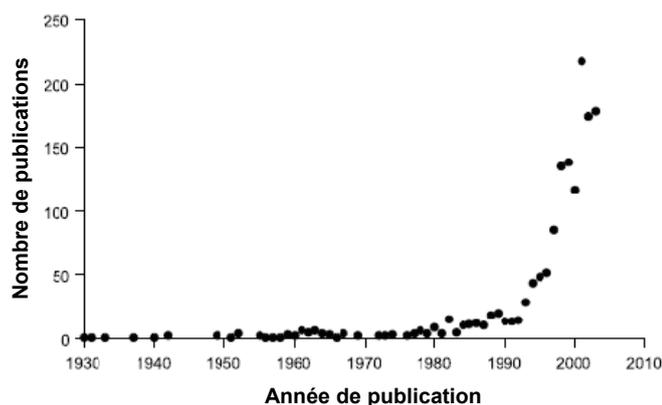


Figure 1. Nombre de publications parues sur les empreintes moléculaires depuis 1930 jusqu'en 2003 (d'après la référence 1).

Les premiers travaux sur les empreintes moléculaires ont été rapportés dans la littérature par le chimiste soviétique M.V. Polyakov². Ces travaux pionniers décrivent l'adsorption de substances à la surface de particules de silice. Il a ainsi démontré que la matrice de silice était en mesure d'adsorber différents composés tels que le benzène, le toluène ou le xylène utilisés comme template

Suite à cette découverte, le concept d'empreinte moléculaire a beaucoup évolué et il inclut aujourd'hui une grande variété de polymères organiques préparés selon différentes techniques de polymérisation.

1.2. Principe général des empreintes moléculaires

Les empreintes moléculaires sont des polymères préparés à partir de monomères fonctionnels polymérisés autour d'une molécule, également appelée template. Cette dernière sert de gabarit pour la formation de sites de reconnaissance présentant une complémentarité de forme avec la molécule imprimée (Figure 2). L'extraction de la molécule template laisse vacant des sites de reconnaissance à haute affinité pour la molécule cible. La forme et la taille de l'empreinte ainsi que la disposition

spatiale des groupes fonctionnels à l'intérieur de la cavité de reconnaissance sont complémentaires à la molécule template (Figure 2).

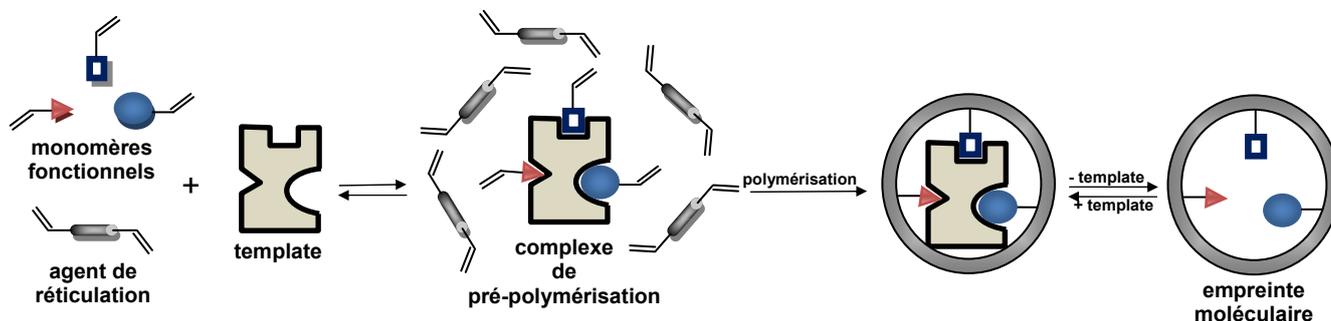


Figure 2. Représentation schématique du concept d'empreinte moléculaire.

De nos jours, différentes molécules sont utilisées comme template pour synthétiser des empreintes moléculaires : des mono et oligosaccharides, des acides aminés, des peptides, des protéines, des composés biologiquement actifs tels que la théophylline et le diazépam, la morphine, la leu-enkephalin et la nicotine notamment. Cette diversité de substrats ainsi que la stabilité et la facilité de préparation des MIPs ont rendu ces récepteurs artificiels extrêmement attractifs pour résoudre les problèmes de séparation chimique³, d'extraction sur phase solide (SPE)⁴ et de détection des molécules d'intérêt biologique⁵. De plus, leur capacité à éliminer des composés indésirables dans les aliments ou dans les fluides biologiques⁶ a été démontrée.

Un résumé de toutes les applications potentielles des MIP est représenté dans la figure 3⁷.

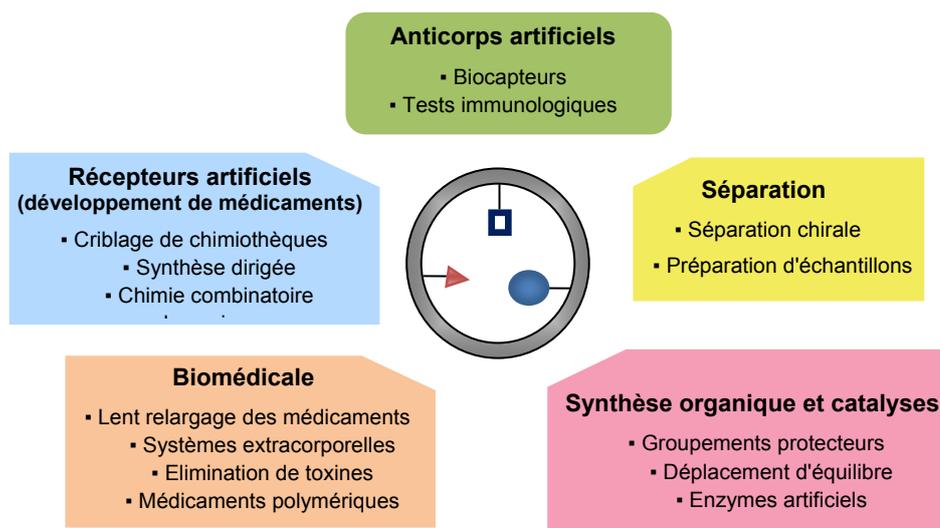


Figure 3. Applications des empreintes moléculaires (d'après la référence 7).

1.3. Méthodes pour l'introduction des sites d'interactions dans les cavités de reconnaissance

Comme représenté dans la figure 2, le principe des empreintes moléculaires repose sur les interactions entre les monomères fonctionnels et le template avant l'étape de polymérisation. La nature des interactions dans le complexe de pré-polymérisation, permet de définir différentes approches pour la conception d'empreinte moléculaire. Ces approches sont soit covalentes, non-covalentes, semi-covalente ou basées sur des liaisons de coordination.

1.3.1. Approche covalente

Dans ce type d'approche^{8,9}, le template est lié de façon covalente à la matrice polymérique grâce à la présence d'un ou de plusieurs points d'ancrages présents sur le template (Figure 4). Après extraction de ce dernier par rupture des liaisons covalentes, des sites d'interactions restent dans la cavité et la reconnaissance du template s'effectue alors par la formation de liaisons covalentes entre les fonctions chimiques dans l'empreinte et la molécule cible (Figure 4).

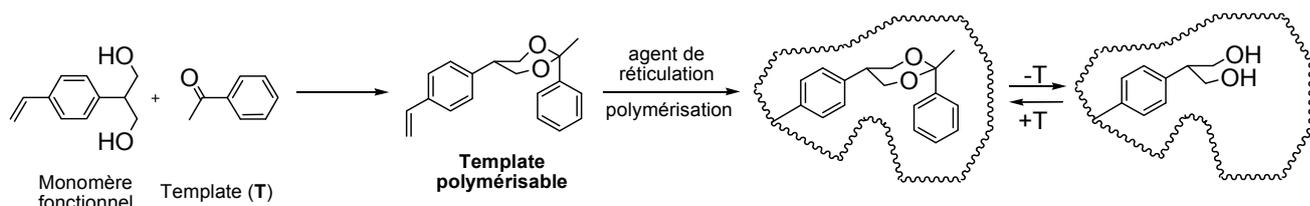


Figure 4. Exemple de préparation de polymère imprimé basé sur des interactions covalentes.

La méthode classique d'impression covalente repose donc sur la formation de liaisons covalentes réversibles entre le monomère template et la matrice polymérique. Les plus utilisées sont les bases de Schiff¹⁰, les acétals/cétals^{11,12} et les esters boroniques^{13,14,15}. Cette approche présente deux principaux avantages. Premièrement, les interactions entre le template et les monomères sont beaucoup moins sensibles à la polarité des solvants et à la température au cours du processus de polymérisation¹. Deuxièmement, les groupements fonctionnalisés sont uniquement situés à l'intérieur de la cavité et non statistiquement répartis sur toute la matrice de polymère, comme dans le cas de l'approche non-covalente où un grand excès de monomère fonctionnel doit être utilisé^{16,17,18}. Les interactions non-spécifiques sont ainsi minimisées. De plus, récemment, le groupe de Munõz-Olivas a montré une grande homogénéité des cavités formées pour des polymères imprimé préparés par voie covalente, avec une affinité élevée de ces dernières pour la molécule empreinte¹⁹.

Toutefois, le nombre de composés pouvant être imprimés par cette méthode reste limité (alcools, aldéhydes, cétones, amines et acides carboxyliques). La sensibilité à l'eau des liaisons covalentes entre le monomère fonctionnel et le template (imine, esters boroniques), peut poser problème car elle rend cette approche non envisageable dans des procédés de polymérisation en émulsion ou par précipitation.

1.3.2. Approche non-covalente

L'approche non-covalente a été rapportée pour la première fois par le groupe de Mosbach^{20,21} en 1981. Dans cette méthode d'impression, les interactions entre les monomères et le template dans le complexe de pré-polymérisation (Figure 5), sont des interactions faibles par rapport à l'énergie des liaisons covalentes. Ces interactions sont de type liaison hydrogène, liaison ionique, π - π stacking, liaison de Van Der Waals. L'étude et la compréhension des phénomènes d'interactions entre les monomères et le template est très important pour obtenir des cavités ayant une bonne affinité pour la molécule cible. Ainsi, différents techniques spectroscopiques ont été développées pour caractériser ces interactions, tels que la spectroscopie UV-VIS²², les expériences de titrage RMN²³, la spectroscopie FT-IR²⁴, la spectroscopie de fluorescence et la calorimétrie²⁵.

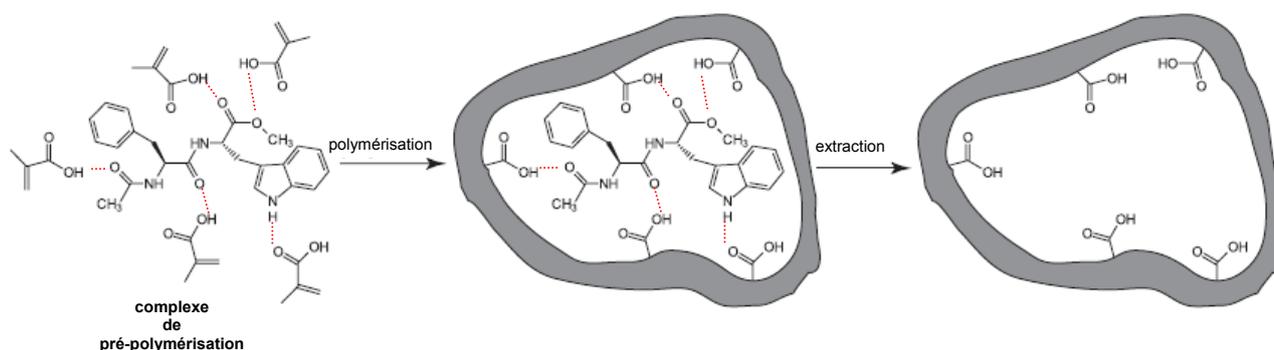


Figure 5. Représentation schématique de l'impression non-covalente d'un dipeptide par liaisons hydrogènes avec l'acide méthacrylique (d'après la référence 21).

Après polymérisation du complexe template-monomère en présence d'un agent de réticulation et extraction du template par lavage avec un solvant approprié (Figure 5), la reconnaissance moléculaire s'effectue également par des interactions non-covalentes entre les fonctions chimiques dans l'empreinte et la molécule cible.

Du fait de sa mise en œuvre aisée et du grand nombre de monomères fonctionnalisés commerciaux²⁶ disponibles, cette méthode reste la plus utilisée dans la synthèse d'empreintes moléculaires.

Les principales limites de l'approche non-covalente sont liées à la formation du complexe de pré-polymérisation entre les monomères et le template (Figure 5)²⁶. Tout d'abord, les sites de reconnaissance sont très hétérogènes du fait de l'utilisation d'une grande quantité de monomères fonctionnels pour la formation du complexe de pré-polymérisation. Cette hétérogénéité se traduit par une large gamme des valeurs de constantes d'affinité (K_D)^{73,74} et elle est également à l'origine des pics larges et asymétriques dans les applications chromatographiques²⁷.

Le deuxième problème est la quantité de monomère fonctionnalisé dispersé de façon aléatoire dans la matrice polymérique en dehors de la cavité de reconnaissance, en raison de l'excès de monomère utilisé pendant la polymérisation. Cet excès entraîne un grand nombre d'interactions non-spécifiques avec la molécule cible.

Beaucoup d'efforts ont été accomplis ces dernières années pour tenter de surmonter les problèmes d'interactions entre les monomères fonctionnalisés et le template dans l'approche non-covalente²⁶. En plus de l'acide méthacrylique, d'autres monomères fonctionnalisés²⁶ ont été impliqués dans la tentative d'augmenter la force d'interaction avec la molécule template. Cette augmentation permet l'utilisation d'une quantité contrôlée de monomère fonctionnel, qui se traduit par une diminution des interactions non spécifiques.

Dans l'approche non-covalente stoechiométrique²⁸, la force des interactions entre les monomères fonctionnalisés et le template est très grande et conduit à la formation d'un complexe très stable (K_a de l'ordre de 10^3 M^{-1})²⁸. Dans ce cas, la quasi-totalité des monomères fonctionnalisés interagit avec la molécule template, et donc seulement un faible pourcentage est placé de façon aléatoire dans la matrice polymérique. Cette approche a été bien étudiée par le group de Wulff, avec l'introduction d'amidines polymérisables capable d'interagir fortement avec des acides carboxyliques et avec des acides phosphoriques²⁹. De plus, ce dernier groupe des monomères s'avèrent particulièrement efficaces dans la préparation de polymères imprimés utilisés comme catalyseurs dans les réactions d'hydrolyse^{29,30}.

1.3.3. Approche semi-covalente

Cette approche vise à combiner les avantages des deux méthodes précédentes (covalente et non-covalente)^{26b}. Dans un premier temps, le template polymérisable est lié de façon covalente au polymère. Suite à l'extraction de ce dernier par rupture des liaisons covalentes, on forme des fonctions chimiques (comme des acides carboxyliques) pouvant par la suite reconnaître la molécule cible *via* des interactions non covalentes comme des liaisons hydrogènes. Notons par ailleurs qu'étant donné que le template est initialement lié de façon covalente à la matrice polymérique, le clivage de ce dernier permet de laisser des groupes de reconnaissance situés uniquement à

l'intérieur des empreintes formées. Par conséquent, la distribution de ces groupes est plus uniforme que dans le cas de l'approche non-covalente. Cela induit une diminution de la reconnaissance non spécifique du polymère^{26,31}.

Deux variantes de cette approche sont décrites dans la littérature :

(i) le template et les monomères polymérisables sont directement liés entre eux. Cette méthode a été rapportée par Sellergren et Andersson pour l'impression du *p*-aminophénylalanine éthyle ester³² (Figure 6).

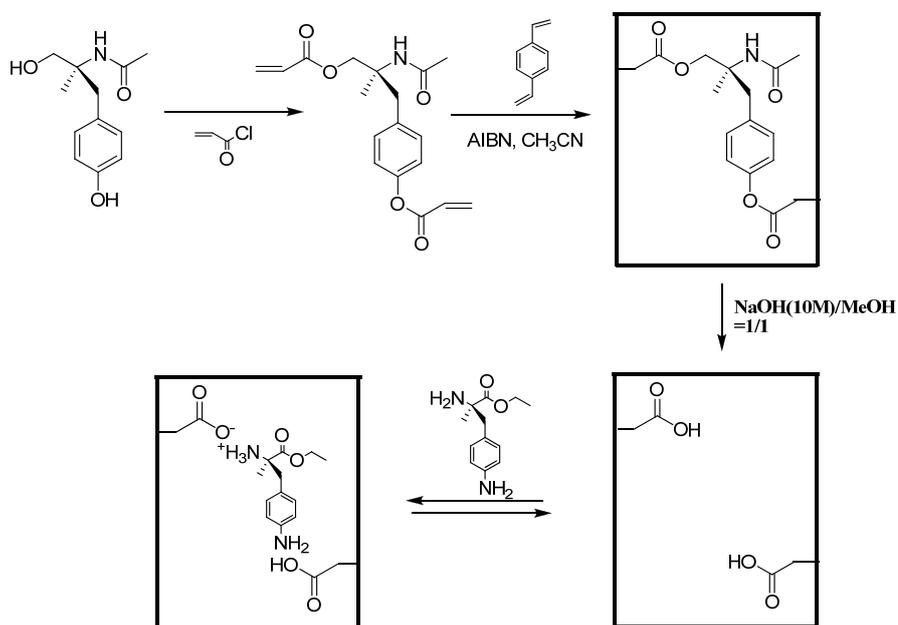


Figure 6. Exemple d'impression moléculaire par l'approche semi-covalente dans laquelle le template polymérisable est lié directement au polymère (d'après la référence 32).

(ii) le template et les monomères sont liés par l'intermédiaire d'un groupement dit espaceur. Whitcombe et Coll. ont mis en place l'approche *via* un espaceur de type carbonate pour l'impression du cholestérol³³. L'hydrolyse du polymère qui en résulte, avec NaOH dans le méthanol, libère la molécule modèle (cholestérol) avec la perte simultanée de l'espaceur sous la forme de CO₂ (Figure 7). Ceci permet de réaliser une empreinte avec un espace plus grand que la dimension du template, favorisant généralement la recomplexation de la molécule cible.

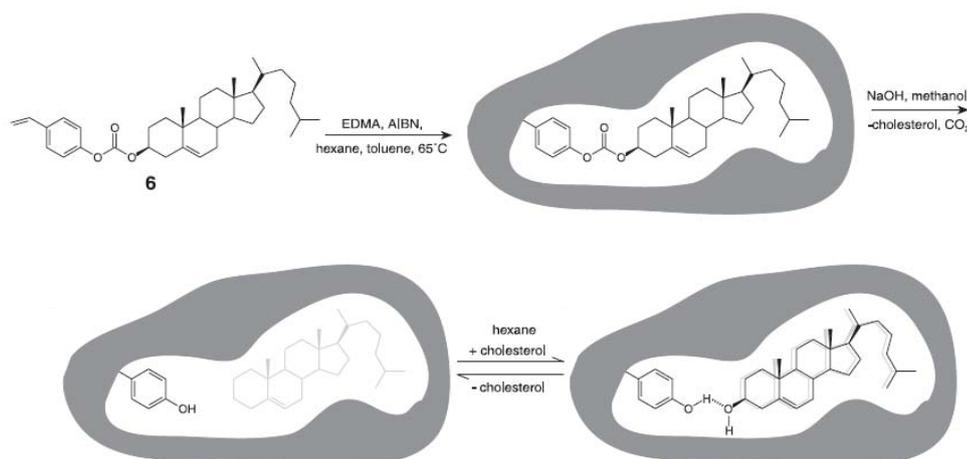


Figure 7. Exemple d'impression par l'approche semi-covalente dans laquelle le template et les monomères sont liés par un groupe espaceur (d'après la référence 33).

Le plus grand inconvénient de l'approche semi-covalente est l'étape d'hydrolyse du template après polymérisation. Dans le cas des fonctions esters, les conditions d'hydrolyse sont très drastiques (MeOH / NaOH conc. à reflux pour plusieurs jours)^{32,34}, et dans certains cas, elles ne suffisent pas à cliver la liaison entre le template et la matrice polymérique. Pour surmonter ce problème, le clivage est parfois réalisé en conditions réductrices (utilisation de LiAlH_4)^{35,36}, ce qui entraîne la formation des fonctions alcools dans l'empreinte.

1.3.4. Approche avec des liaisons de coordination

De nombreux processus de reconnaissance biologique utilisent des métaux de transition (oligoéléments) pour former des liaisons de coordination avec les molécules cibles³⁷. Le même principe est appliqué pour la synthèse d'empreintes moléculaires. Les complexes fonctionnalisés sont alors composés d'un ion métallique et d'un ligand polymérisable, formant un complexe ternaire *via* des liaisons de coordination avec la molécule cible à imprimer (Figure 8).

Le premier exemple utilisant cette approche a été rapporté par Fujii et Coll.³⁸ dans l'impression moléculaire d'acides aminés avec du cobalt (III). Différents métaux et ligands polymérisables de types styréniques ont été testés par le group d'Arnold et de Striegler dans des matrices organiques et des supports solides^{39,40,41,44}. Les ions cuivriques (Cu^{2+}) sont utilisés pour la synthèse d'empreintes moléculaires capables de reconnaître sélectivement les sucres comme le glucose^{42,43,44}.

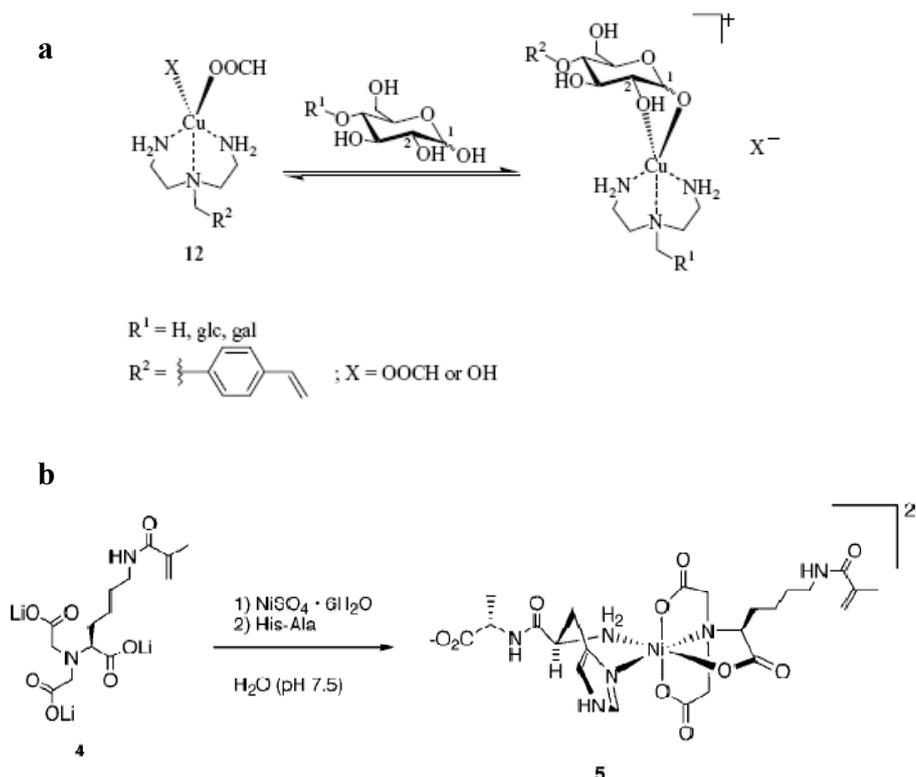


Figure 8. Exemples de complexes ternaires dans le cas du Cu^{2+} (a) et du Ni^{2+} (b).

Les liaisons de coordination sont en général plus fortes que les interactions non-covalentes (liaisons hydrogènes, π - π stacking, liaison de Van Der Waals) utilisées dans les empreintes moléculaires. La stabilité des complexes de métaux de transition permet d'obtenir des sites d'interactions sans utiliser un excès de monomère fonctionnel, ce qui permet une diminution des interactions non-spécifiques⁴⁵. Enfin, différents métaux de transition sont utilisés tant pour leurs propriétés de complexation des analytes que pour leurs propriétés catalytiques pour des réactions chimiques^{39,46}.

1.4. Facteurs intervenant dans la synthèse des MIPs

1.4.1. Influence de l'agent de réticulation

Les agents de réticulation sont des molécules organiques possédant plusieurs groupements polymérisables, capables d'apporter une structure tridimensionnelle plus ou moins rigide à la matrice polymérique. La structure rigide de la matrice est nécessaire pour maintenir l'arrangement spatial de la cavité après extraction du template^{77b}. Les polymères doivent également avoir une certaine flexibilité pour permettre au ligand d'accéder aux cavités avec des cinétiques d'équilibre rapides. Donc, un bon compromis entre rigidité et flexibilité de la matrice polymérique est nécessaire pour obtenir un matériau avec une bonne sélectivité et une bonne cinétique de

reconnaissance. Des travaux d'optimisation du ratio monomère/agent de réticulation utilisé ont été réalisées en comparant les sélectivités obtenues avec différents polymère imprimés. Par exemple, Wulff et coll. ont montré que, pour des MIP préparés par l'approche covalente, la sélectivité augmente avec la quantité d'agent de réticulation⁴⁷ (Figure 9a). Dans cette étude des polymères imprimés ont été préparés avec différents rapports entre les agents de réticulation tel que le diméthacrylate butane diol (BDMA), le diméthacrylate d'éthylène glycol (EGDMA), le divinylbenzène (DVB) et des monomères fonctionnels de même nature (le méthacrylate de méthyle et le styrène respectivement). Les résultats ont montré que les polymères à base d'acrylates sont plus performants que les polymères d'origine styrénique (Figure 9a).

Pour l'approche non-covalente, Sellergren a étudié l'influence du rapport entre le monomère fonctionnel et l'agent de réticulation pour des polymères préparés avec une quantité fixe de template⁴⁸. Initialement, la sélectivité des polymères augmente avec le pourcentage de monomère fonctionnel, pour diminuer lorsque le taux de monomère dépasse environ 25% par rapport à la quantité d'agent de réticulation (Figure 9b). Deux principales raisons peuvent expliquer ce phénomène. Tout d'abord, un excès de monomère fonctionnel augmente la reconnaissance non-spécifique, abaissant la moyenne générale de sélectivité des MIPs. Deuxièmement, une certaine quantité d'agent de réticulation est nécessaire pour maintenir une structure définie des sites d'interactions, ainsi la diminution du taux de réticulation conduit à une moins bonne stabilité physique des cavités dans le polymère imprimé.

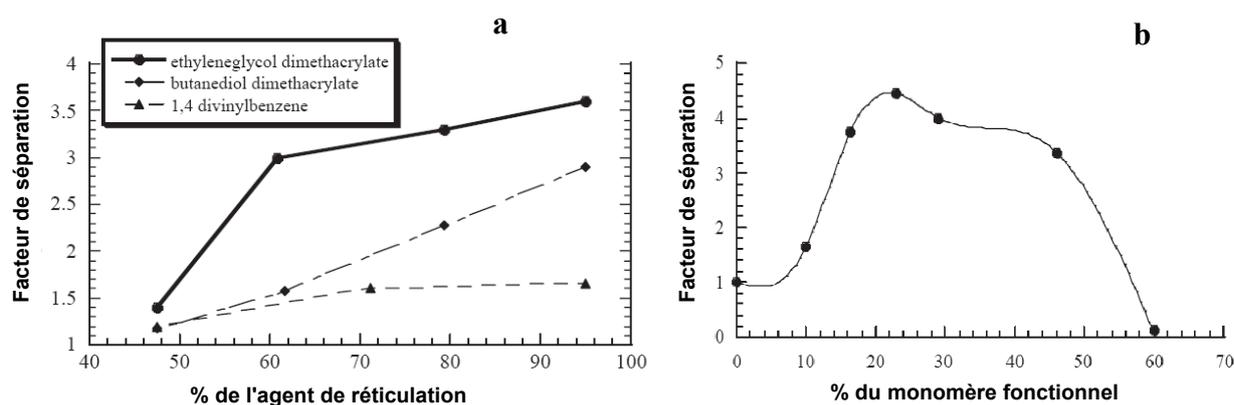


Figure 9. Influence de la quantité d'agent de réticulation sur la sélectivité pour des polymères imprimés préparé avec une approche covalente (a) et une approche non-covalente (b) (d'après la référence 77b).

1.4.2. Influence du solvant

Dans la synthèse des empreintes moléculaires, le solvant joue un rôle très important pour la formation des macropores à l'intérieur de la matrice polymérique^{49,50}. Selon la nature du solvant (appelé dans ce cas porogène), différentes dimensions et structures de pores peuvent être obtenues mais ces différences n'ont pas beaucoup d'influence sur la sélectivité des MIPs. Les meilleurs résultats en terme de sélectivité sont souvent obtenus lorsque du chloroforme est utilisé comme porogène, ce qui conduit à la formation de polymères avec un faible indice de porosité et surface spécifique^{77b}. Généralement, les polymères préparés en absence de porogène sont très denses et les sites de reconnaissance résultants ne sont pas facilement accessibles par les analytes^{50a}.

La nature du solvant joue également un rôle important dans la complexation des monomères fonctionnels avec le template, surtout dans le cas d'une approche non-covalente, où la formation du complexe de pré-polymérisation est influencée par la polarité du solvant. Une étude réalisée par Sellergren and Shea⁵¹ a permis de corréler la polarité du solvant à la sélectivité du polymère final (Tableau 1).

Les solvants peu polaires comme le chloroforme et le benzène favorisent les interactions de type liaison hydrogène et liaison de coordination avec un métal de transition, entre le monomère fonctionnel et le template dans l'étape de formation du complexe de pré-polymérisation.

Quant aux solvants polaires et protiques, ils défavorisent les interactions (liaisons hydrogènes et liaisons de coordination avec un métal de transition) dans le complexe de pré-polymérisation, entraînant la formation d'un polymère moins sélectif, du fait de la diminution des interactions avec le template dans les cavités du polymère imprimé.

Tableau 1. Effet de la polarité du solvant sur la sélectivité (d'après la référence 51).

Entrée	Solvant	Facteur de separation	Force de la liaison hydrogène
1	Acide acétique	1.9	Forte
2	Diméthylformamide	2.0	Modérée
3	Tétrahydrofurane	4.1	Modérée
4	Chloroforme	4.5	Faible
5	Acétonitrile	5.8	Faible
6	Benzène	6.8	Faible

1.4.3. Influence de la température de polymérisation

La température de polymérisation est un facteur qui influence la sélectivité des MIP^{77b}. Les matrices réticulées formées après polymérisation sont, quant à elles, très stables thermiquement, jusqu'à 200°C dans certains cas⁵². Les températures de polymérisation dépendent de l'initiateur radicalaire utilisé. L'AIBN (azoisobutyronitrile) est l'initiateur radicalaire de polymérisation le plus employé dans la synthèse des MIPs, et sa température de décomposition est de 65°C. Autre initiateur de la même famille que le précédent, l'ABDV (2,2'-azo-bis-(2,4-diméthylvaléronitrile) présente une température de décomposition plus basse de 40°C. Enfin, les initiations photochimiques permettent la formation de polymère à température ambiante voire à 0°C⁵³. Il a été démontré que les empreintes moléculaires préparées à basse température étaient plus sélectives que celles préparées à plus haute température^{53,54}. En effet, surtout dans le cas de l'approche non-covalente, la stabilité du complexe de pré-polymérisation étant défavorisée à hautes températures.

2. Polymérisation en mini-émulsion

2.1. De la polymérisation en «bulk» à la polymérisation en mini-émulsion

Les différents types d'approche pour la préparation des empreintes moléculaire peuvent être adaptés aux différentes méthodes de polymérisation. La plus utilisée, pour sa simplicité et sa facilité de mise en œuvre, est la polymérisation en masse (ou « bulk »). Les monomères, l'agent de réticulation et le template sont mélangés en présence d'un initiateur radicalaire et dans certain cas, d'un solvant organique. La polymérisation est initiée thermiquement ou photochimiquement selon le type d'initiateur radicalaire utilisé^{67,68}. A la fin du processus, le polymère est récupéré en un bloc monolithique qui nécessite une étape de broyage et de tamisage avant d'être utilisé. Pour cette raison, la forme des particules est très irrégulière et présente une large distribution de taille (Figure 9a) ainsi que la rupture de certaines cavités. Il est estimé que seulement 20% des sites de reconnaissance sont conservés après l'étape de broyage⁵⁵. L'une des plus importantes limitations de la polymérisation en bulk est la grande quantité de template restant dans la matrice polymérique sans pouvoir en être extraite dans le cas de l'approche covalente⁵⁶.

D'autres méthodes ont été utilisées pour obtenir des empreintes moléculaires avec un meilleur contrôle de la taille des particules et une distribution plus homogène de la forme des sites. Par exemple, la polymérisation en suspension permet la formation de particules monodisperses de taille micrométrique (5-50 μm)^{57,58}. Comme son nom l'indique, le polymère est obtenu en suspension dans le solvant. Les liquides perfluorés sont beaucoup utilisés pour leur capacité à disperser les particules formées, évitant ainsi la formation d'un bloc comme dans le cas de la polymérisation en masse. Ces solvants peuvent facilement être recyclés par distillation afin de diminuer le coût de la polymérisation, qui reste l'un des principaux inconvénients^{50,59}. Quant à la taille des particules, elle est contrôlée par la vitesse d'agitation et la quantité de stabilisant utilisée.

Une autre méthode pour obtenir des particules de taille micrométrique est la polymérisation par précipitation. Cette technique, appliquée aux empreintes moléculaires, a été rapportée pour la première fois par Ye et Mosbach^{60,61} et permet d'obtenir des microsphères de taille comprise entre 0.3-10 μm (Figure 9b). Le principe est basé sur la précipitation des particules de polymère, qui lorsqu'elles atteignent une certaine taille ou une certaine masse molaire deviennent insolubles dans le solvant et précipitent. La forte dilution des monomères (le solvant représentant 95% du milieu réactionnel) avec une bonne quantité d'agent de réticulation permet l'obtention de chaînes polymériques plus courtes et empêche le phénomène de coalescence.

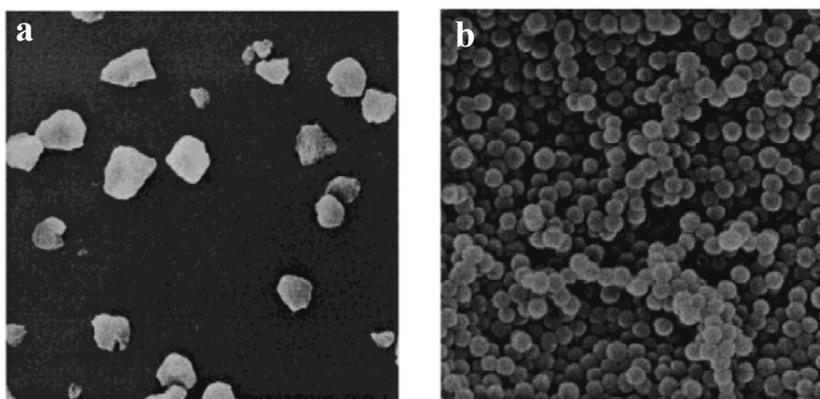


Figure 10. Microscopie électronique à transmission (MET) pour un polymère préparé par polymérisation en bulk (a), et pour un polymère préparé avec la polymérisation par précipitation (b).

La méthode de polymérisation en émulsion^{62,63} a également été étudiée pour la préparation des empreintes moléculaires. Elle permet d'obtenir des particules de forme et de taille plus homogènes que celles obtenues par la polymérisation en masse. De plus, il est possible d'obtenir des nanosphères fonctionnalisées en surface⁷⁰, ce qui permet une amélioration au niveau de l'extraction du template après polymérisation et des phénomènes de diffusion de la molécule cible vers les sites de reconnaissance. Whitcombe *et coll.* ont préparé des empreintes moléculaires du cholestérol avec une méthode de polymérisation «core-shell» en émulsion⁶⁴. Cette polymérisation s'effectue en deux étapes. Dans la première, un latex de particules sphériques est préparé avec différentes variétés de monomères fonctionnels, comme par exemple le styrène, le divinylbenzène (DVB), ou les alkyles acrylates. Les particules formées ont généralement une taille comprise entre 50 nm et 1 µm de diamètre. Le latex ainsi obtenu est mélangé avec une certaine quantité de monomères fonctionnalisés et de «template» lors de la seconde étape de polymérisation. La taille, la morphologie et les propriétés physico-chimiques des particules finales sont contrôlées par la composition, la structure des monomères et les conditions réactionnelles⁶⁴.

Pour améliorer la méthode et avoir un contrôle du processus d'impression uniquement à la surface des nanosphères, le même groupe de recherche a synthétisé des empreintes moléculaires avec un monomère tensioactif (PS) et un template tensioactif (TS)⁶⁵. Ce type de template a été envisagé pour se positionner à la surface des nanoparticules formées dans la première étape de polymérisation. Suite à la deuxième étape de polymérisation et à l'extraction du template, des cavités hydrophobes sont obtenues à la surface hydrophile des nanosphères (Figure 11).

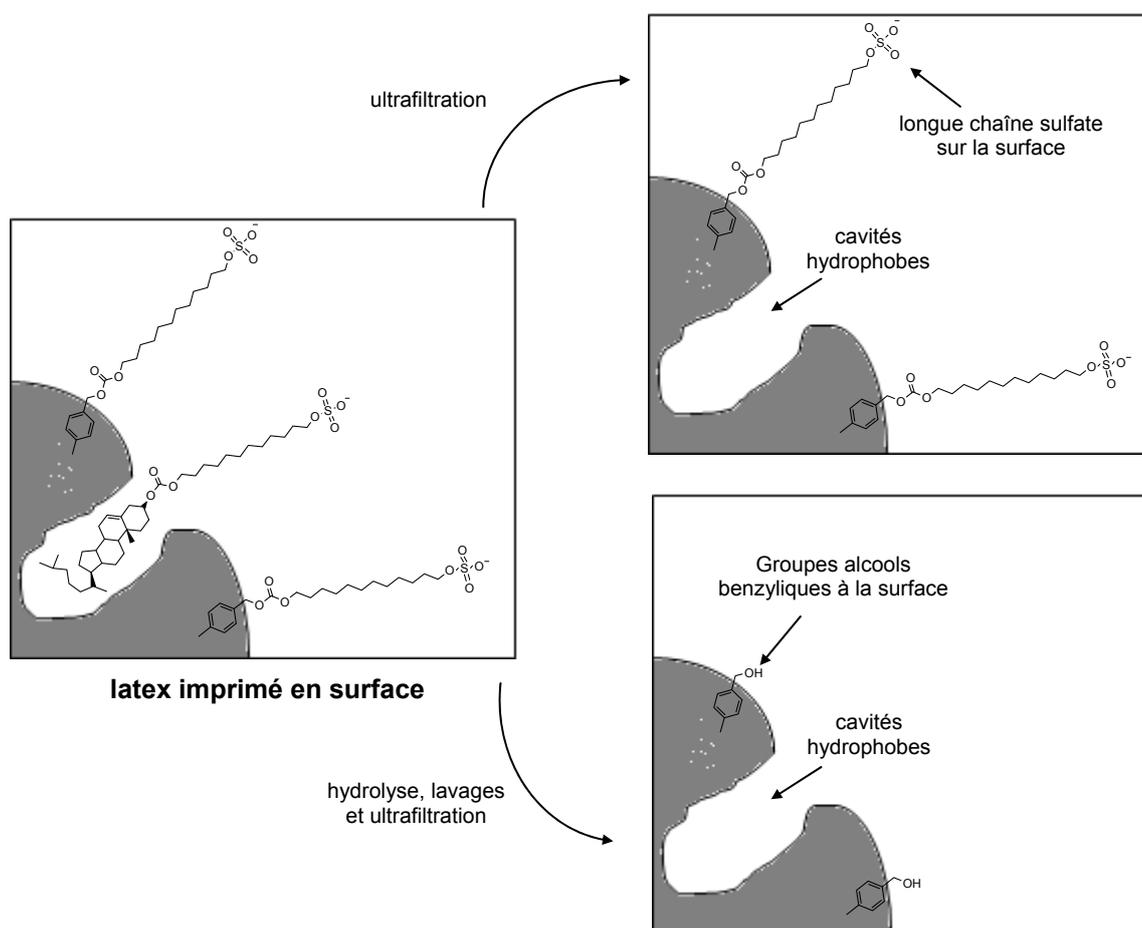
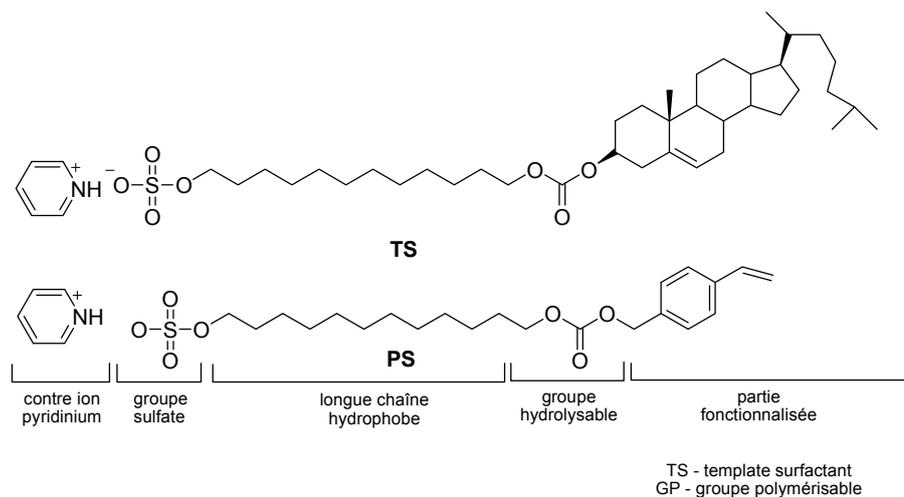


Figure 11. Représentation schématique de la formation des cavités hydrophobes à la surface des nanosphères avec l'utilisation d'un template tensioactif (TS) (d'après la référence 65)

Carter et Rimmer ont récemment rapporté la préparation d'empreintes moléculaires avec une polymérisation «core-shell», pour la reconnaissance sélective de la caféine dans l'eau⁶⁶. Après polymérisation, 100% du template est extrait de la matrice polymérique, ce qui représente un gros avantage comparée à la préparation habituelle des empreintes par polymérisation en «bulk».

Un cas particulier de la polymérisation en émulsion est la technique de polymérisation en mini-émulsion⁶⁷ qui permet également d'obtenir des nanoparticules monodisperses, très régulières en forme, et avec des tailles de particules comprises entre 50 et 500 nm.

2.2. Principes généraux de la polymérisation en mini-émulsion

La formulation et l'application des nanoparticules de polymère bénéficient d'une grande popularité dans le monde de la recherche et de l'industrie^{67,68}. Une des méthodes pour obtenir des nanoparticules consiste en une procédure de polymérisation particulière: la polymérisation en mini-émulsion. Dans la procédure de préparation d'une mini-émulsion huile dans l'eau, deux phases liquides non miscibles sont fortement agitées (Figure 12).

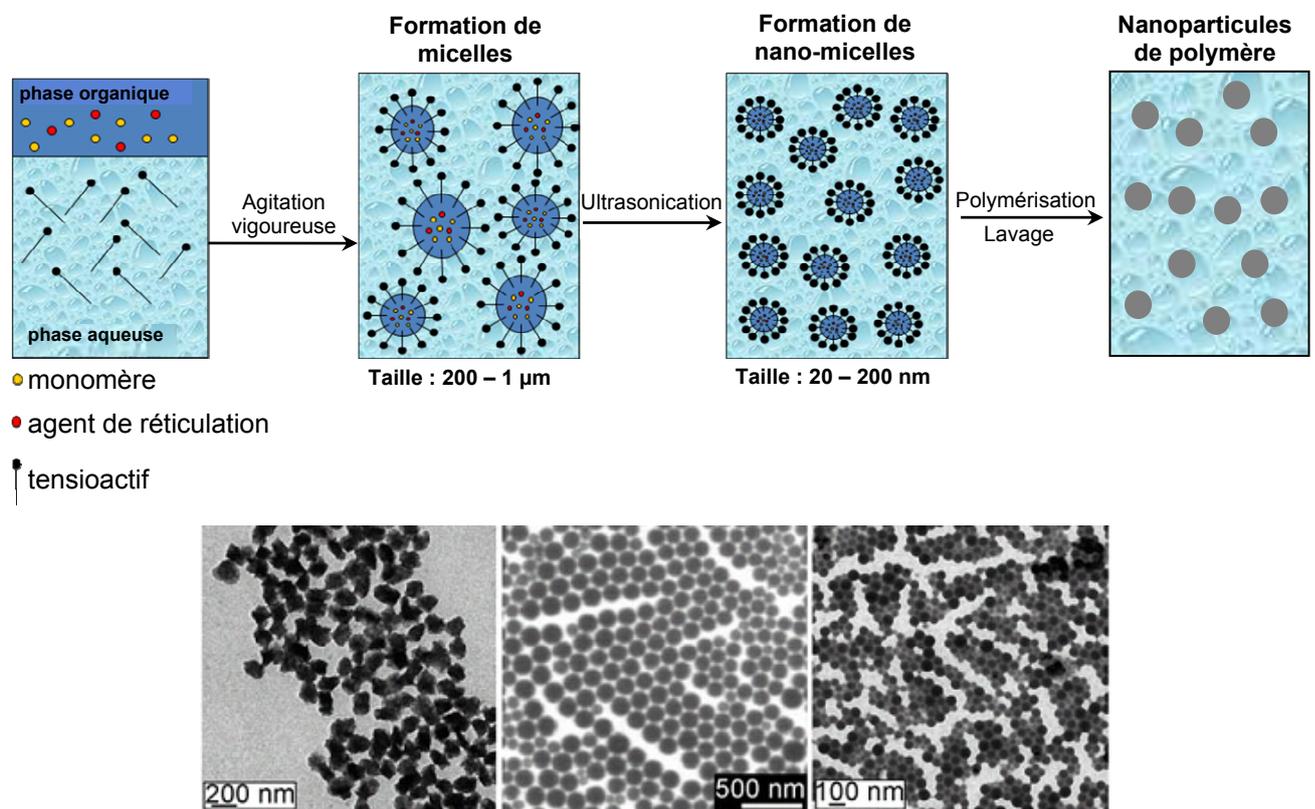


Figure 12. Procédure pour la formation de nanoparticules *via* mini-émulsification et photos de nanosphères de polymère prises par microscopie électronique à transmission (d'après la référence 67a)

L'une organique contenant les monomères fonctionnels, un initiateur radicalaire de polymérisation et un agent hydrophobe (pour éviter le phénomène du mûrissement d'Ostwald)^{68a}, et l'autre aqueuse contenant un tensioactif. Pendant l'agitation et grâce à cette dernière, la phase organique se disperse dans l'eau sous forme de gouttelettes (Figure 12). La taille des micelles varie entre 200 nm et 1 μm.

Après traitement par ultrasonication^{60,68}, elles deviennent plus homogènes du point de vue de leur forme, et leur diamètre est réduit entre 20-200 nm (nano-micelles).

Les nano-gouttelettes ainsi formées, stabilisées par l'agent hydrophobe, sont ensuite polymérisées par initialisation thermique ou photochimique, pour obtenir un latex de nanoparticules (Figure 12). La forme et la taille de ces nanosphères ne changent pas après polymérisation comme le montrent les photographies prises au microscope électronique (Figure 12) et ce contrairement à la polymérisation en émulsion. En effet, dans ce cas, la taille des particules est établie par la cinétique des processus d'agitation, par la température ou la quantité de l'initiateur⁶⁹. Ces facteurs ont peu d'importance dans la polymérisation en mini-émulsion où la taille des particules est essentiellement déterminée par le processus de dispersion de la phase organique dans l'eau, et par la stabilité des micelles⁶⁹.

2.2.1. Etudes sur l'homogénéisation de la mini-émulsion

Le processus d'homogénéisation par ultrasonication (US) de la mini-émulsion est initié par agitation de l'échantillon, afin d'obtenir une taille des gouttelettes qui est dix fois plus grande que la taille des gouttelettes finales après ultrasonication (Figure 13)^{68a}.

Au cours de l'ultrasonication, la taille des gouttelettes diminue constamment jusqu'à atteindre un équilibre. Au début de l'homogénéisation, la polydispersité des gouttelettes est encore assez élevée, mais par une série de fusions et fissions, la valeur de polydispersité diminue. La mini-émulsion atteint un état stable appelé état stationnaire où la valeur de polydispersité devient constante (Figure 13).

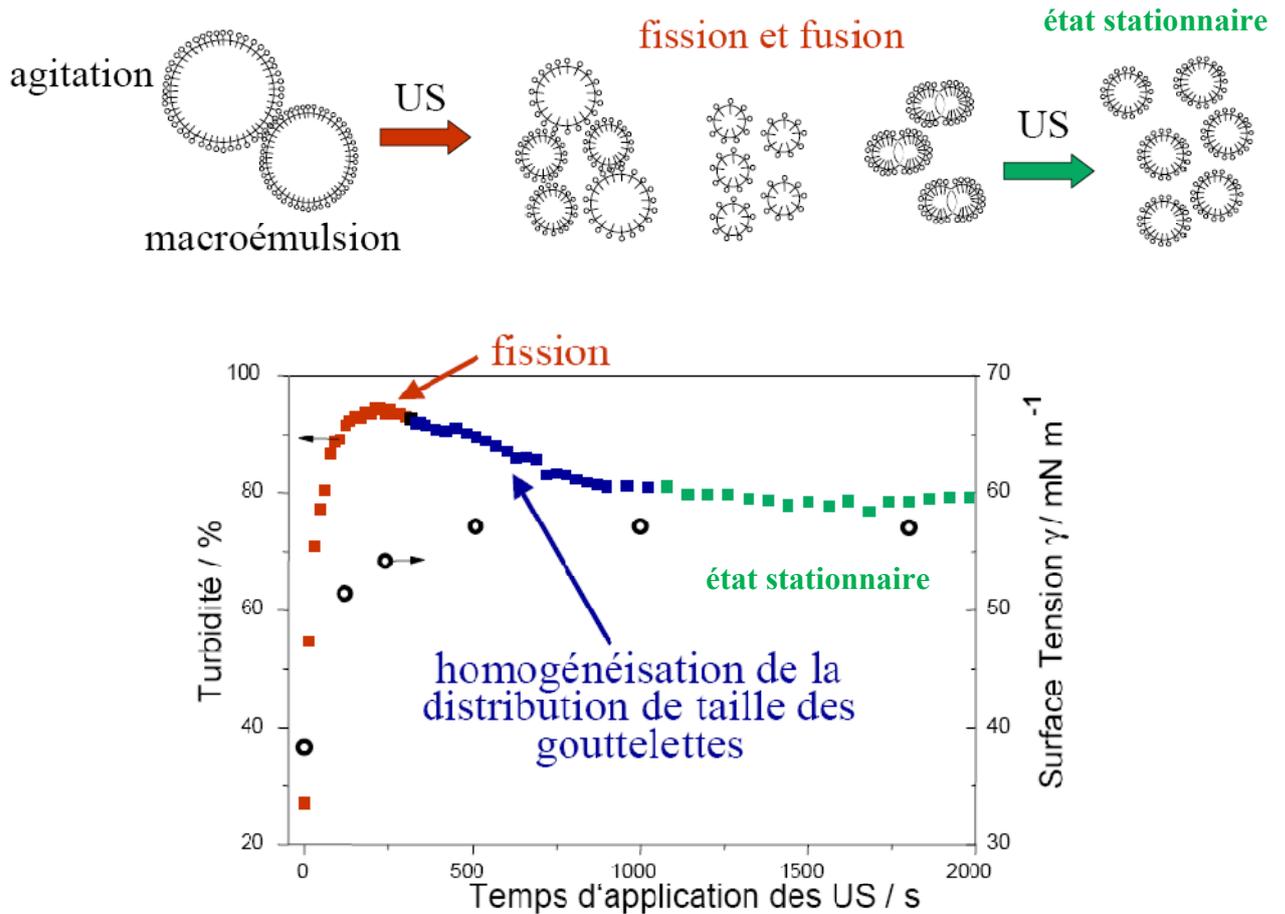


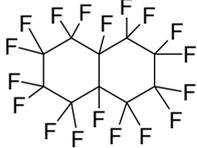
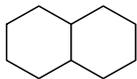
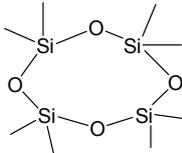
Figure 13. Représentation schématique du processus d'homogénéisation par ultrasons (US)^{68a}.

Le processus d'homogénéisation peut être suivi par différentes méthodes, comme par exemple, la mesure de la turbidité et de la tension superficielle. Avec l'augmentation du temps d'ultrasonication, la taille des gouttes diminue et, par conséquent, l'ensemble de l'interface micellaire augmente. La tension superficielle qui est sensible à la variation de la surface à l'interface huile / l'eau, augmente avec le temps d'ultrasonication pour atteindre une valeur de saturation correspondant à l'état stationnaire (Figure 13). L'homogénéisation de la distribution des tailles des micelles est atteinte après environ 1000 s. (Figure 13). Après le processus d'homogénéisation, les très petites gouttelettes formées ne sont pas dans un état thermodynamique stable, donc elles essaient d'augmenter leur taille par deux mécanismes : croissance par mûrissement d'Ostwald et croissance par coalescence^{68a}. La suppression de ces deux processus est nécessaire pour la réalisation d'une mini-émulsion stable. La coalescence peut être contrôlée par l'usage efficace d'un agent tensioactif. Le mûrissement d'Ostwald peut être supprimé de manière efficace par l'ajout d'un agent hydrophobe^{68a}.

Différentes molécules peuvent être utilisées comme hydrophobe pour supprimer le mûrissement d'Ostwald. La molécule standard la plus utilisée est l'hexadécane (HD). Les silanes, les siloxanes,

les isocyanates, les polyesters, les alcanes fluorés et de nombreux autres se sont révélés très efficaces dans la suppression du mûrissement d'Ostwald (Tableau 2).

Tableau 2. Exemples de molécules utilisées comme hydrophobe en mini-émulsion^{68a}.

Hydrophobe	Diamètre (nm)	Tension Superficielle	Hydrophobe	Diamètre (nm)	Tension Superficielle
$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_3$	102	67.2		88	68.7
Oligostyrene: $M_w = 1000$	96	68.2			
	78	68.4		86	69.2
$\text{H}_3\text{CH}_2\text{C}-\text{Si}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$	99	68.2	Huile d'olive	80	52.8
	109	58.9	Polyester	82	50.1

2.3. Préparation des empreintes moléculaires *via* la polymérisation en mini-émulsion

La polymérisation en mini-émulsion est bien adaptée pour la préparation de nanosphères imprimées par approche covalente ou non-covalente (Figure 14)^{70,71}.

La préparation des nanosphères *via* la polymérisation en mini-émulsion a été pour la première fois étudiée par le groupe de Tovar⁷⁰. Plusieurs formulations de particules ont été préparées en utilisant différents rapports entre l'agent de réticulation (EGDMA) et le monomère fonctionnalisé (acide méthacrylique, MMA), tout en faisant varier le template. Après polymérisation en mini-émulsion en présence d'un agent tensioactif (SDS), et d'hexadécane pour prévenir le mûrissement d'Ostwald, le latex résultant est caractérisé par plusieurs analyses physico-chimiques: analyse thermogravimétrique, la mesure de la polydispersité (par diffusion de la lumière), mesure de la surface spécifique (BET) et microscopie électronique à transmission (MET)^{70b}.

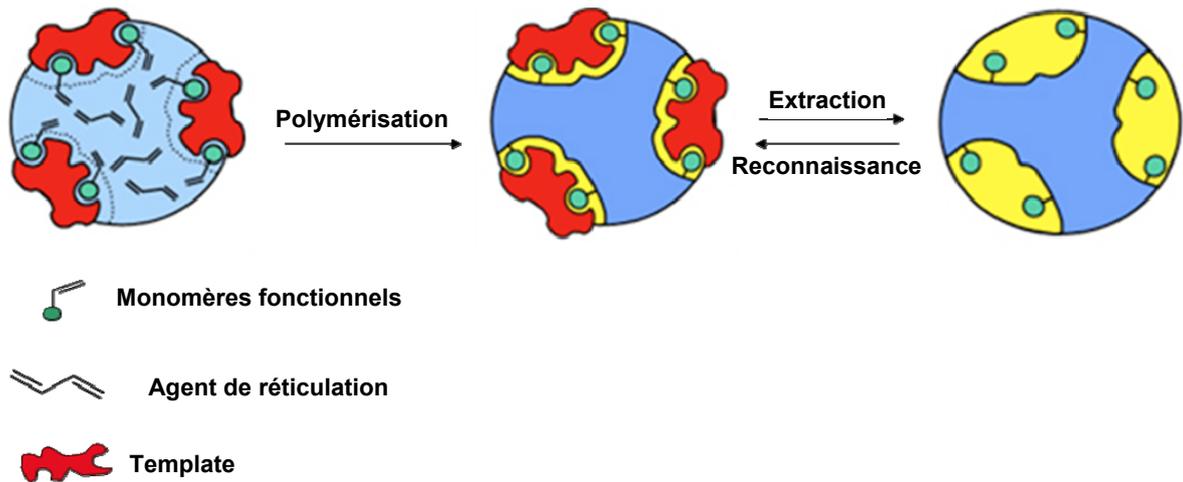


Figure 14. Préparation des nanosphères imprimées par la polymérisation «one-stage» en mini-émulsion (d'après la référence 70).

Les mesures spécifiques de surface (BET) ont montré une valeur presque identique ($\approx 55 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) entre les polymères préparés en présence et en absence de template. L'extraction du template entraîne une augmentation de la surface des nanoparticules pour atteindre une valeur de $80 \text{ m}^2/\text{g}^{70}$. L'augmentation de la surface spécifique, dans le cas du polymère imprimé, est interprétée comme une indication de la formation de nanopores suite à l'extraction du template après polymérisation. De plus, dans les études rapportées par Tovar, la quantité de template extraite est contrôlée par spectroscopie UV. Ainsi, le fait que plus de 95% du template initial soit extrait de la matrice polymérique met en évidence une extraction plus efficace du template dans ce système face à celui de la polymérisation en bulk.

Récemment, la polymérisation en mini-émulsion a été utilisée par le groupe de Tong pour l'impression de certaines protéines⁷¹. L'étude a permis de comprendre et de caractériser les interactions entre le tensioactif et les protéines utilisées pour réaliser l'empreinte moléculaire. En étudiant ces types d'interactions par la technique du dichroïsme circulaire, il a été constaté qu'un certain degré d'interaction entre la protéine-template et les micelles formées par le tensioactif est nécessaire pour maintenir les protéines à la surface des particules. Il a également été constaté que qu'une interaction protéine-template/surfactant trop importante entraîne un changement conformationnel ou une dénaturation de ces mêmes protéines. Cette étude a permis de définir des paramètres importants requis pour la préparation des polymères imprimés pour la reconnaissance des protéines *via* la polymérisation mini-émulsion.

3. Évaluation des propriétés des MIPs

La capacité des polymères imprimés à reconnaître les molécules à partir desquelles ils ont été préparés, est la propriété la plus importante de ces matériaux^{77a}. Compte tenu de la nature solide des MIPs, l'usage de ces polymères comme phase stationnaire en chromatographie est une des applications les plus importantes pour évaluer les propriétés de capacité et de sélectivité. Des équations régissant le processus de reconnaissance moléculaire permettent de déterminer les valeurs de la constante d'affinité, du facteur de séparation et du facteur d'impression des polymères préparés (la définition de ces paramètres sera expliquée en détail au cours de ce paragraphe). Comme il a été décrit et démontré par le groupe de Wulff⁷², et plus récemment par le groupe de Shimizu^{31,73} et Sellergren⁷⁴, les MIPs présentent une distribution de sites d'interaction, avec des sites à haute et d'autres de basse affinité. La méthode chromatographique, même en restant la plus simple à mettre en œuvre pour ces types de systèmes, ne permet pas d'évaluer en détail l'hétérogénéité des sites d'interactions des MIP^{77b}.

La méthode d'évaluation la plus utilisée pour déterminer les constantes d'affinités et de la sélectivité des polymères imprimés est la méthode de binding appelée « batch process ».

3.1. Description de la méthode du « batch process »

Cette méthode implique l'analyse du mélange hétérogène MIP / solution de l'analyte⁷⁵. Une quantité connue de polymère imprimé est ajoutée à une solution de concentration connue de molécules template (Figure. 15).

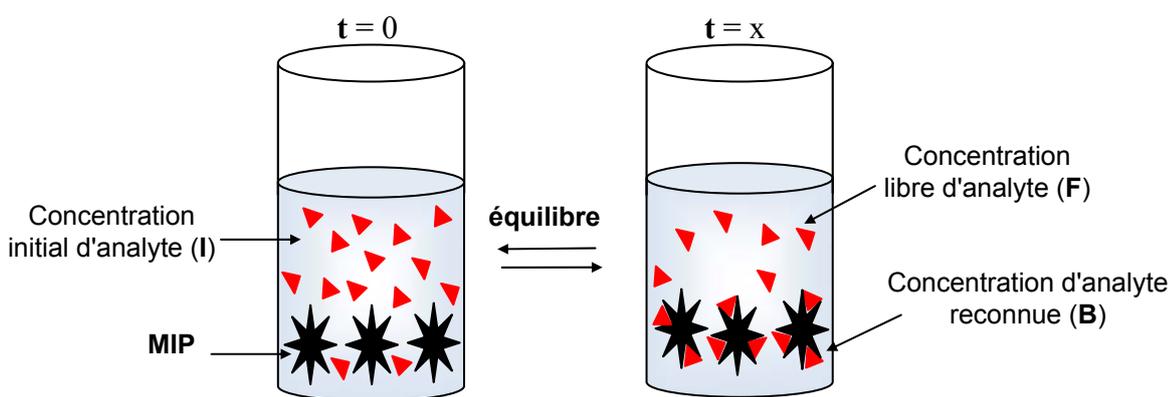


Figure 15. Equilibre de complexation par la méthode du « batch process ».

Après un certain temps d'incubation, l'équilibre MIP / template est atteint, et une certaine quantité d'analyte est complexée par le polymère imprimé (**B**). Le polymère peut être donc séparé par filtration ou centrifugation, et la quantité d'analyte non reconnue qui reste en solution (**F**) est mesurée et quantifiée par les méthodes classiques d'analyse comme la CLHP ou par toutes autres techniques de dosage quantitatif^{77a}. La concentration de template reconnu par le MIP (**B**) est facilement calculable par la différence entre la concentration initiale de l'analyte à $t = 0$ (**I**) et la concentration libre (**F**) après l'incubation avec le polymère (**B = I - F**). Les valeurs des concentrations mentionnées précédemment permettent d'effectuer une étude détaillée de la capacité et de la sélectivité, ainsi que de l'homogénéité des sites de reconnaissance des MIP. Cette méthode permet également de réaliser les isothermes de reconnaissance moléculaire pour déterminer l'homogénéité de la distribution des sites d'interaction et les constantes d'affinité K_D .

3.2. Analyse de l'effet d'empreinte et de la sélectivité dans les polymères imprimés

Le phénomène de reconnaissance moléculaire des polymères imprimés peut être résumé par l'équation suivante, similaire à celle qui régit les phénomènes de reconnaissance entre un enzyme et son substrat⁷⁵ :



La quantité de substrat partitionné entre le MIP et la solution est donnée par le coefficient de partition K_P :

$$\mathbf{K}_P = \mathbf{B} / \mathbf{F}$$

La sélectivité pour un polymère est donnée par la différence en énergie libre d'adsorption d'un substrat par rapport à un autre. L'énergie libre d'adsorption est définie par l'équation :

$$\Delta\mathbf{G} = -RT \ln K_P$$

La différence peut donc être écrite de la façon suivante :

$$\Delta\Delta\mathbf{G} = \Delta\mathbf{G}_1 - \Delta\mathbf{G}_2 = -RT \ln K_{P2} - (-RT \ln K_{P1}) = -RT \ln (K_{P2} / K_{P1})$$

Donc, le rapport entre les coefficients de partition correspond à la sélectivité du polymère imprimé entre deux substrats. Cette valeur est normalement définie comme le facteur de séparation (α) ou, dans certains cas, comme le facteur de sélectivité :

$$\alpha = (K_{P2} / K_{P1})$$

Le facteur de séparation indique combien de fois le substrat 2 s'est lié au polymère par rapport au substrat 1. Ceci est particulièrement intéressant pour comparer les énantiomères du même composé,

qui ont les mêmes propriétés mais une disposition spatiale différente. Pourtant, la valeur du α , ne se limite pas seulement aux énantiomères, et toutes les molécules peuvent être comparées par rapport au même polymère.

Une meilleure façon pour comparer l'effet d'impression de deux composés, est de prendre en compte le facteur d'impression ou effet d'empreinte (\mathbf{I})³⁴. Cette grandeur est une modification du coefficient de partition (\mathbf{K}_P), et peut être obtenue en effectuant le rapport entre le coefficient de partition d'un composé avec le polymère imprimé (\mathbf{K}_{MIP}), et le coefficient de partition du même composé avec le polymère de contrôle (\mathbf{K}_{NP}) :

$$\mathbf{I} = (\mathbf{K}_{MIP} / \mathbf{K}_{NP})$$

Dans ce cas, le facteur d'impression (\mathbf{I}) permet d'évaluer combien de fois le composé 1 est reconnu par le polymère imprimé par rapport au polymère de contrôle. De cette façon, les interactions non spécifiques avec le polymère sont enlevées, et on ne prend en compte que la quantité réelle de template reconnu par le polymère imprimé. A partir du rapport entre deux facteurs d'impression (\mathbf{I}_1 pour le composé 1 et \mathbf{I}_2 pour le composé 2) nous pouvons obtenir le facteur de sélectivité spécifique :

$$\mathbf{S} = (\mathbf{I}_1 / \mathbf{I}_2)$$

Il est clair que pour deux énantiomères la valeur \mathbf{K}_{NP} est la même et que par conséquent, la valeur de la sélectivité spécifique \mathbf{S} est réduite au facteur de sélectivité α .

Une autre manière, tout à fait comparable à la précédente, pour calculer le facteur de sélectivité a été proposée par le groupe de Striegler^{43,76}. Ils ont défini le facteur de sélectivité $\alpha_{i,j}$ pour deux analytes \mathbf{i} et \mathbf{j} comme :

$$\alpha_{i,j} = (c_{i,j=i} - c_{contrôle,i}) / (c_{i,j} - c_{contrôle,j}) \quad (1)$$

où $c_{i,j}$ est la concentration d'un carbohydrate \mathbf{j} reconnue par un polymère imprimé \mathbf{i} .

3.3. Les courbes isothermes de complexation

Les propriétés de reconnaissance et les distributions des sites d'interactions peuvent être calculées à partir des courbes isothermes de complexation correspondantes⁷⁷. Les courbes sont une mesure du comportement de la reconnaissance moléculaire des MIPs par rapport à la variation de concentration de l'analyte. Elles sont représentées comme la concentration reconnue par le polymère (\mathbf{B}) en fonction de la concentration libre d'analyte en solution (\mathbf{F}) (Figure 16). À première vue, la ligne courbe dans l'isotherme du polymère imprimé indique la présence de sites de liaisons

spécifiques à l'intérieur du MIP, tandis qu'une ligne droite dans le cas du polymère de contrôle, indique seulement l'existence de fixations non spécifiques de l'analyte^{77b}.

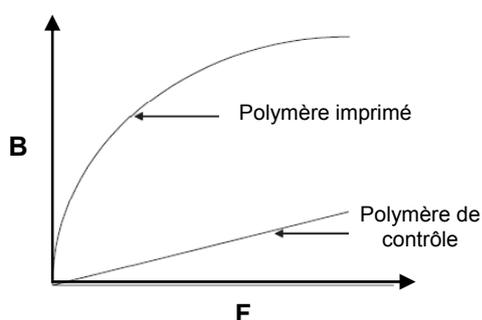


Figure 16. Courbes isothermes de complexation pour un polymère imprimé et un polymère de contrôle.

Différentes corrélations mathématiques ont été établies pour mettre en relation la quantité d'analyte reconnue par le polymère (**B**) et la quantité libre en solution (**F**). En général, ces corrélations sont basées sur deux modèles d'affinité : homogène et hétérogène. Le modèle d'affinité homogène suppose que les sites d'interaction à l'intérieur de la matrice de polymère ont seulement une certaine forme, avec une seule série de paramètres de reconnaissance (le nombre total des sites de reconnaissance **N**, la constante d'affinité **K**). Dans le deuxième cas, le modèle d'affinité hétérogène, on suppose l'existence de deux ou plusieurs types de sites d'interactions, chacun avec une constante d'affinité différente (**K_i**). Les deux types de modèles sont discutés brièvement.

Le modèle d'affinité homogène est le même que celui utilisé dans les structures homogènes des enzymes, des anticorps et des récepteurs artificiels⁷⁸ et, il est facilement applicable pour la caractérisation des MIPs, généralement sous la forme de droites de Scatchard. L'équation mathématique du Scatchard plots est directement dérivée de l'isotherme de Langmuir :

$$\frac{B}{F} = KN - KB$$

où **N** et **K** ont respectivement été définis comme le nombre total de sites de reconnaissance et comme la constante d'affinité.

Le premier essai, consiste à déterminer l'évolution du rapport **B/F** en fonction de la concentration reconnue par le polymère (**B**). Tous les systèmes d'empreintes moléculaires qui correspondent à une régression linéaire comme celui illustré dans la figure 17a, sont caractérisés par un modèle homogène de sites d'affinité.

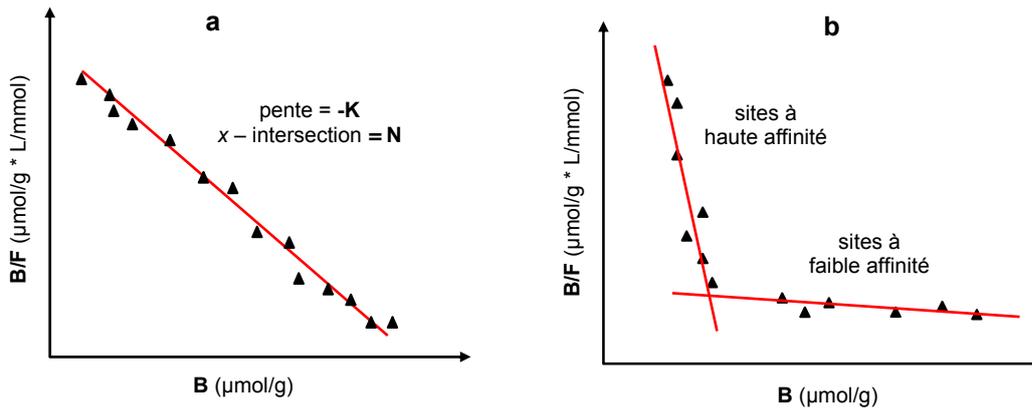


Figure 17. Scatchard plots pour un polymère imprimé contenant des sites d'interaction homogènes (a) et pour un polymère imprimé contenant de sites d'interaction hétérogènes (b).

La pente de la ligne correspond à la constant d'affinité (**K**) et la valeur $x - \text{intersection}$ correspond au nombre total des sites de reconnaissance **N**.

Malheureusement, la plupart des MIPs ne suivent pas le modèle homogène de sites d'affinité (Figure 17a). Cela peut être attribué au fait que les sites d'interaction des polymères imprimés, contrairement aux enzymes ou aux anticorps, présentent de grandes différences dans la taille, la forme, la rigidité et l'affinité. Le graphique du Scatchard plots ressemble à celui de la figure 17b, où deux lignes droites peuvent être différenciées : une correspondant à des sites à haute affinité et l'autre à des sites à faible affinité. Cependant, ce dernier moyen d'analyse est trop simple pour caractériser avec précision l'hétérogénéité des polymères imprimés, et est trop difficile à utiliser lorsqu'on veut comparer deux polymères différents avec diverses concentrations de l'analyte²³. Pour surmonter ce problème, les courbes isothermes ont récemment été analysées avec l'équation de Freundlich^{31,73,74} :

$$B = aF^m$$

Tout d'abord, la reconnaissance du polymère est représentée sous la forme de $\log B$ en fonction de $\log F$ (Figure 18a). La ligne droite obtenue correspond à l'équation de Freundlich sous sa forme logarithmique :

$$\log B = m \log F + \log a$$

où **m** et **a** sont respectivement deux paramètres correspondants à la pente et à la valeur de $10^{(y\text{-intersection})}$. Ces deux variables permettent de calculer le nombre des sites d'interactions (**N_i**) qui ont une certaine constante d'affinité (**K_i**), par l'équation suivante (Figure 18b) :

$$N_i = 2.3 \, a m (1 - m^2) K_i^{-m}$$

Le minimum (K_{\min}) et le maximum (K_{\max}) de la distribution de constante d'affinité sont donnés dans la pratique, par les limites de concentration de l'analyte, utilisés lors des essais d'incubation avec le polymère imprimé :

$$K_{\min} = 1 / F_{\max}$$

$$K_{\max} = 1 / F_{\min}$$

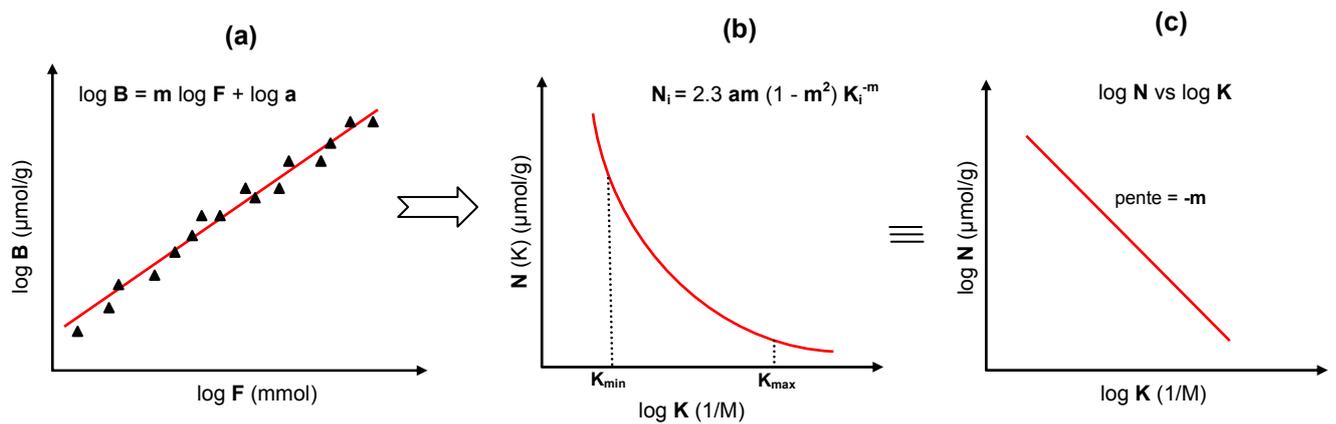


Figure 18. Représentation de l'équation Freundlich (a) et de la distribution des constantes d'affinités (b et c) (d'après la référence 77a)

La courbe de la figure 18b, peut également être représentée sous forme logarithmique (Figure 18c). De cette façon, une ligne droite est obtenue, et la pente représente le paramètre m vu précédemment. Cette variable, généralement appelée indice d'hétérogénéité, est une mesure de l'hétérogénéité du système et sa valeur est comprise entre 0 et 1. Plus la valeur est proche de 1 plus le système est considéré comme homogène, avec une distribution des constantes d'affinité plus étroite.

4. Introduction des travaux de thèse

L'étude des résultats publiés dans la littérature sur la polymérisation en mini-émulsion, montrent que grâce à cette technique, nous pouvons obtenir des particules de polymère sphériques, avec un bon contrôle du processus et des cinétiques de polymérisation^{67,68}. Les nanosphères formées montrent un haut degré d'homogénéité comparé aux particules obtenues par polymérisation en masse. La technique a été aussi utilisée pour synthétiser des MIP, dans lequel les sites de reconnaissance sont localisés sur la surface, avec donc une amélioration significative des pourcentages d'extraction du template après polymérisation, et de l'accessibilité des sites par la molécule cible⁷⁰.

Outre cette amélioration dans la préparation des MIP, l'approche semi-covalente qui combine l'avantage des stratégies covalente et non-covalente, a également été développée pour améliorer le contrôle de la micro-impression de polymères^{26b}. Le résultat est une diminution nette des interactions non spécifiques qui généralement, en particulier dans une approche non-covalente, provoquent un faible effet d'impression.

Dans le cadre de mes travaux de thèse nous avons développé une nouvelle méthode d'impression moléculaire qui combine l'approche semi-covalente et la méthode de polymérisation en mini-émulsion «one-stage». L'association des deux concepts devrait conduire à des MIP avec des propriétés de reconnaissance moléculaire probablement améliorée, avec un faible indice de polydispersité et surtout avec une population de sites d'affinité plus homogène comparé à la polymérisation en « bulk ». De plus, l'impression moléculaire en surface des nanosphères préparées par polymérisation en mini-émulsion «one-stage», devrait assurer une meilleure accessibilité et extraction du template après polymérisation, qui reste à ce jour, l'un des principaux inconvénients de l'approche semi-covalente.

Pour la réalisation de la nouvelle méthode d'impression moléculaire deux systèmes de templates ont été étudiés: les molécules phosphorées et les monosaccharides. Le chapitre 1 de ce de ce manuscrit décrira la synthèse de nouveaux templates tensioactifs phosphorés, et leur utilisation pour permettre de contrôler le "design" des empreintes moléculaires à la surface des nanoparticules. En effet, grâce à ces molécules phosphorées il a été possible de mettre en place plusieurs points d'ancrage dans les sites de reconnaissance des polymères imprimés. Nous nous sommes intéressés à l'influence de l'augmentation du nombre des points d'ancrage sur la capacité et la sélectivité des MIP.

Par ailleurs, nous nous sommes employés à la préparation de polymères imprimés comme récepteurs artificiels des monosaccharides, en particulier des dérivés du glucose. Avant de décrire la synthèse de ces récepteurs artificiels, nous avons réalisé dans le chapitre 2, un état de l'art sur tout

ce qui a été consacré, jusqu'à aujourd'hui, à l'impression des monosaccharides avec les différentes approches d'impression moléculaire.

Dans le chapitre 3, nous expliquerons la préparation des empreintes moléculaires à l'aide d'un template tensioactif basé sur le glucose. Les résultats obtenus lors des tests de complexation du glucose, en termes de capacité et de sélectivité vis-à-vis des autres épimères, ont été comparés aux données de la littérature. Dans ce chapitre, nous discuterons également de l'application de différents modèles mathématiques (Bi-Langmuir et Freundlich), afin d'obtenir des informations sur le degré d'homogénéité des sites d'interactions formés avec la nouvelle méthode d'impression moléculaire.

Enfin, après une conclusion générale sur ce travail de thèse, les dernières sections de ce manuscrit seront consacrées à la partie expérimentale et aux notes bibliographiques.

Chapitre 1

Nouvelle approche pour la synthèse des empreintes moléculaires

5. Combinaison de l'approche semi-covalente avec la méthode de polymérisation en mini-émulsion «one-stage»

5.1. Descriptions du procédé d'impression moléculaire

La nouvelle approche étudiée et mise au point consiste à copolymériser un template polymérisable tensioactif (**T**) (Schéma 1), caractérisé par la présence simultanée d'une partie polymérisable hydrophobe et d'une tête polaire soluble dans l'eau. Pendant le processus de mini-émulsification « huile dans l'eau » en présence de l'agent de réticulation, d'un tensioactif (SDS) et d'un initiateur radicalaire de polymérisation (AMBN), un ensemble de micelle ayant un diamètre compris entre 50 et 500 nm est obtenu. Compte tenu de sa nature, le template **T** va se positionner sur la surface de ces micelles à l'interface entre la phase organique et la phase aqueuse (Schéma 1). Les micelles sont ensuite polymérisées pour obtenir un latex de nanoparticules. Après rupture des liaisons covalentes (esters méthacryliques) et extraction du template, les sites de reconnaissance devraient être situés à la surface des nanosphères (Schéma 1). La reconnaissance moléculaire du template a lieu grâce à des interactions non-covalentes (liaisons hydrogène) entre les fonctions alcools présentes sur la molécule modèle et les acides carboxyliques présents dans les cavités des nanosphères imprimées (Schéma 1). Dans la première partie de mes travaux de thèse, nous avons étudié les phénomènes qui régissent cette nouvelle technique d'impression moléculaire. Nous nous sommes intéressés à l'influence de l'augmentation du nombre d'acides carboxyliques, présents à l'intérieur des sites de reconnaissance, sur la capacité et la sélectivité de MIPs. Ainsi, une série de templates à base d'oxyde de phosphine fonctionnalisés (tensioactifs et polymérisables, **T1-T3**, Figure 19), a été synthétisée avec aucune (**T1**), une (**T2**) ou deux (**T3**) fonctions esters méthacryliques.

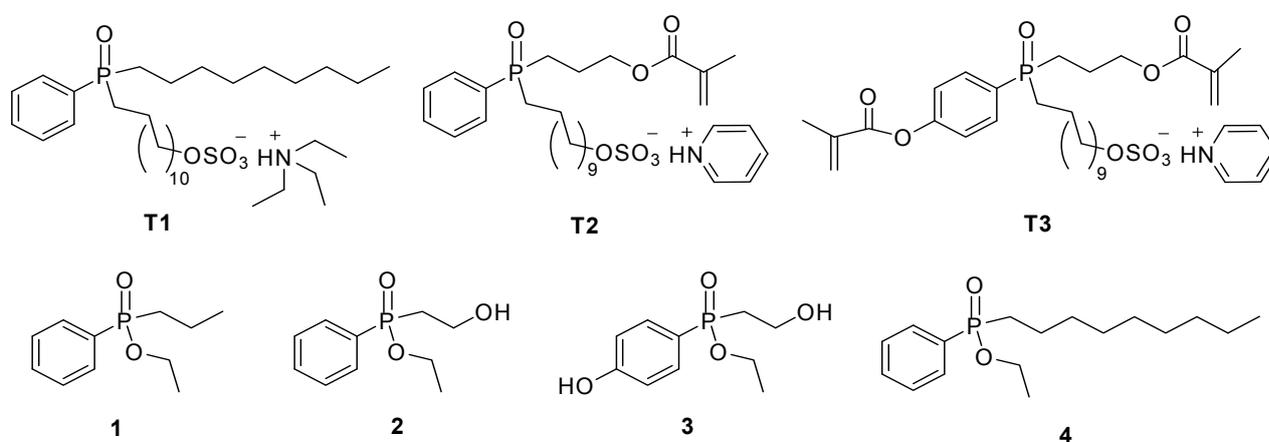
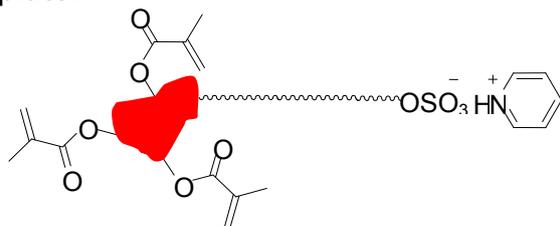


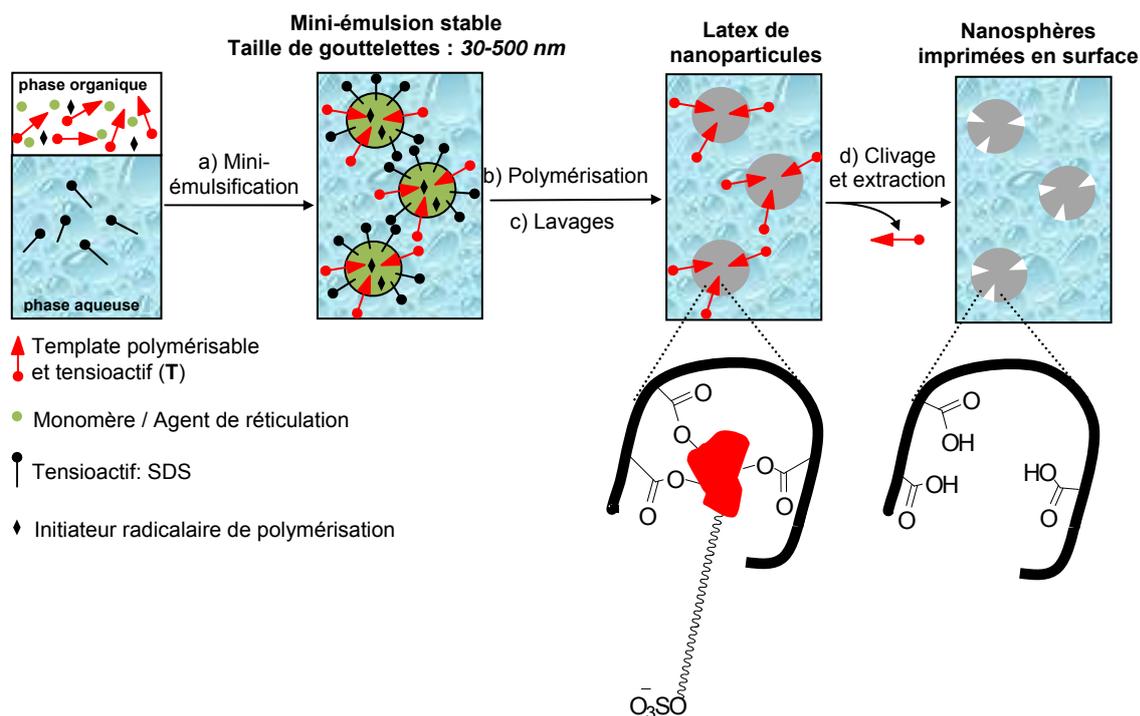
Figure 19. Structures des templates phosphorés **T1-T3** et des analytes **1-4**

1. Design du template:



Template polymérisable et tensioactif (T) \equiv

2. Mini-émulsification et préparation des nanosphères imprimées en surface:



3. Reconnaissance moléculaire de l'analyte par liaisons hydrogènes:

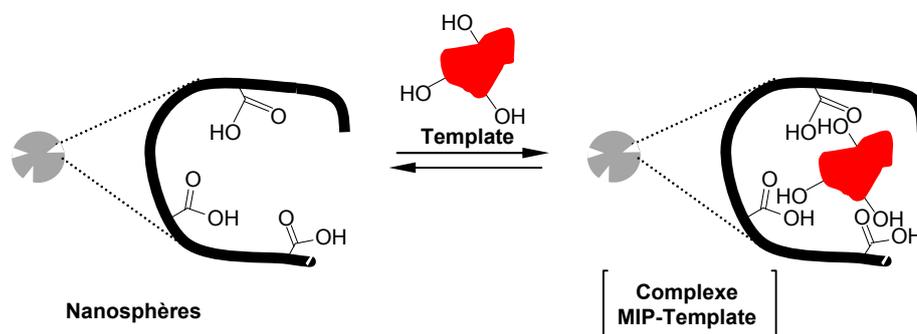


Schéma 1. Description du procédé de préparation des nanosphères fonctionnalisées et imprimées en surface par l'approche semi-covalente, en utilisant la méthode de polymérisation en mini-émulsion.

Ce type de templates phosphorés (**T1-T3**) a été choisi pour deux raisons principales. La première, est que l'atome de phosphore permet de quantifier exactement le template introduit et extrait du polymère grâce à l'analyse élémentaire du phosphore du matériau; la seconde, est que l'impression des esters phosphoriques a déjà été utilisée pour la formation de récepteurs artificiels pour la détection des phosphates dans l'eau⁷⁹, pour la catalyse des réactions d'hydrolyse d'esters carboxyliques⁸⁰ et des réactions de transestérifications⁸¹ basées sur le principe de la stabilisation de l'état de transition (TSA). Ces travaux nous permettront de comparer nos résultats avec ceux décrit pour d'autres systèmes de polymères imprimés, au niveau de leur capacité et sélectivité.

La préparation de polymères dans les conditions de mini-émulsion (styrène, divinylbenzène, AMBN, SDS, H₂O) avec les templates **T1**, **T2** ou **T3**, suivie de lavages (extraction) dans le premier cas (**T1**), ou d'une étape d'hydrolyse des fonctions esters dans les deux autres (**T2-T3**), a conduit à la formation de MIP dont les sites de reconnaissance correspondants possèdent respectivement aucun (**IP_{T1}**), un (**IP_{T2}**) ou deux (**IP_{T3}**) acides carboxyliques. Différents tests de reconnaissance croisés avec les analytes **1-4** (Figure 19) ont été réalisés afin de mettre en évidence la relation entre la structure du site de reconnaissance des MIPs et leur capacité et sélectivité.

Avant de décrire nos résultats, une analyse bibliographique sur l'utilisation des templates phosphorés employés dans la préparation des polymères imprimés est nécessaire pour faciliter la comparaison avec les résultats obtenus avec les polymères synthétisés au laboratoire.

5.2. Antécédent bibliographique des MIPs préparés avec des templates phosphorés

5.2.1. Réactions d'hydrolyse d'esters

Comme cela a été rappelé précédemment, l'une des principales applications de molécules template contenant du phosphore (V) repose sur leur utilisation pour la préparation des polymères imprimés possédant une activité catalytique dans les réactions d'hydrolyse d'esters carboxyliques⁸⁰. La géométrie tétraédrique de l'atome de phosphore dans les esters phosphoriques a été utilisée pour mimer l'état de transition de l'hydrolyse d'ester (TSA)^{80c}. Pour cette raison, les cavités d'un polymère imprimé préparé avec un template à base d'ester phosphorique, est capable de stabiliser l'état de transition d'hydrolyse d'une fonction ester et donc présenter des propriétés hydrolytiques. Un des premiers exemples sur ce concept à été reporté par le groupe de Mosbach en 1989^{80a}. Dans cette référence, les auteurs ont synthétisés le *p*-nitrophénol méthyl phosphonate comme template mimant l'analogue de l'état de transition (TSA) de la réaction d'hydrolyse du *p*-nitrophényle acétate. Le polymère imprimé préparé avec ce template a montré une activité catalytique de 60% plus importante que celle observée avec le polymère de contrôle. Le plus grand inconvénient de cette

méthode a été la forte inhibition de sites catalytiques par l'état de transition d'hydrolyse de l'ester. Cette observation a donné la preuve que les cavités formées sont tout à fait complémentaires à l'état de transition de la réaction.

Quelques années plus tard, le même groupe de recherche a rapporté un autre exemple d'hydrolyse catalytique d'ester⁸². Dans ce cas, le template phosphoré montré dans la figure 20a, est complexé avec le monomère fonctionnel *N,N*-diéthyl (4-vinylphényl)amidine (DEVPA), pour assurer des fortes interactions avec le template dans le complexe de pré-polymérisation. Après polymérisation et extraction du template, le polymère imprimé est utilisé pour catalyser la réaction d'hydrolyse représentée dans la figure 20b.

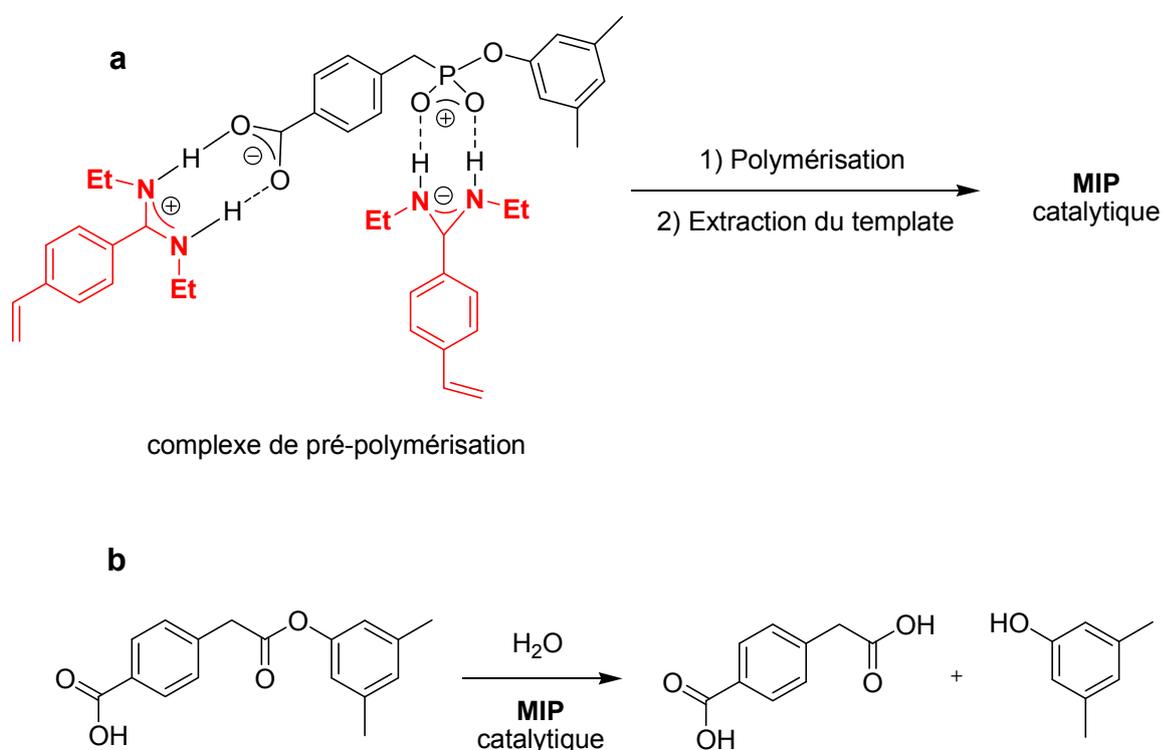


Figure 20. a) Préparation d'un polymère imprimé utilisant un acide phosphonique mono-ester comme mème de l'état de transition; b) Hydrolyse catalytique d'un ester (d'après la référence 82).

L'activité catalytique du polymère imprimé est 5 fois plus grande que celle avec le polymère de contrôle. Ainsi la réaction d'hydrolyse conduite avec le polymère imprimé est accélérée d'un facteur 100 par rapport à la réaction conduite en solution homogène sans catalyseur. Par contre, même dans ce dernier exemple, les auteurs ont constaté un taux d'inhibition important due à l'acide carboxylique formé après l'hydrolyse. Le problème d'inhibition par le produit d'hydrolyse a été ensuite étudié par le même groupe de recherche⁸³. L'étude a été consacré à l'hydrolyse de diphenyl

carbonate et carbamate qui à la différence de l'hydrolyse d'un ester, ne produit pas de produits d'hydrolyses qui inhibe les sites catalytiques à l'intérieur du polymère imprimé. La constante cinétique Michaelis-Menten dans ce type de système catalytique est augmentée d'un facteur 588 dans le cas de l'hydrolyse du carbonate et d'un facteur 1435 dans le cas du carbamate, par rapport à la même réaction conduite en solution. En comparaison, la réaction menée avec le polymère de contrôle l'activité catalytique est augmentée d'un facteur 10. Cette étude a également montré que l'activité catalytique est plus grande pour un polymère imprimé préparé par polymérisation en suspension par rapport au polymère synthétisé par polymérisation en masse. Ce dernier résultat suggère donc que la morphologie du polymère a une importance fondamentale pour une bonne sélectivité et activité catalytique⁸⁴.

Sellergren et Shea ont également menés des études sur l'hydrolyse énantiosélective d'ester catalysée par des polymères imprimés (Figure 21)^{80b,80c}.

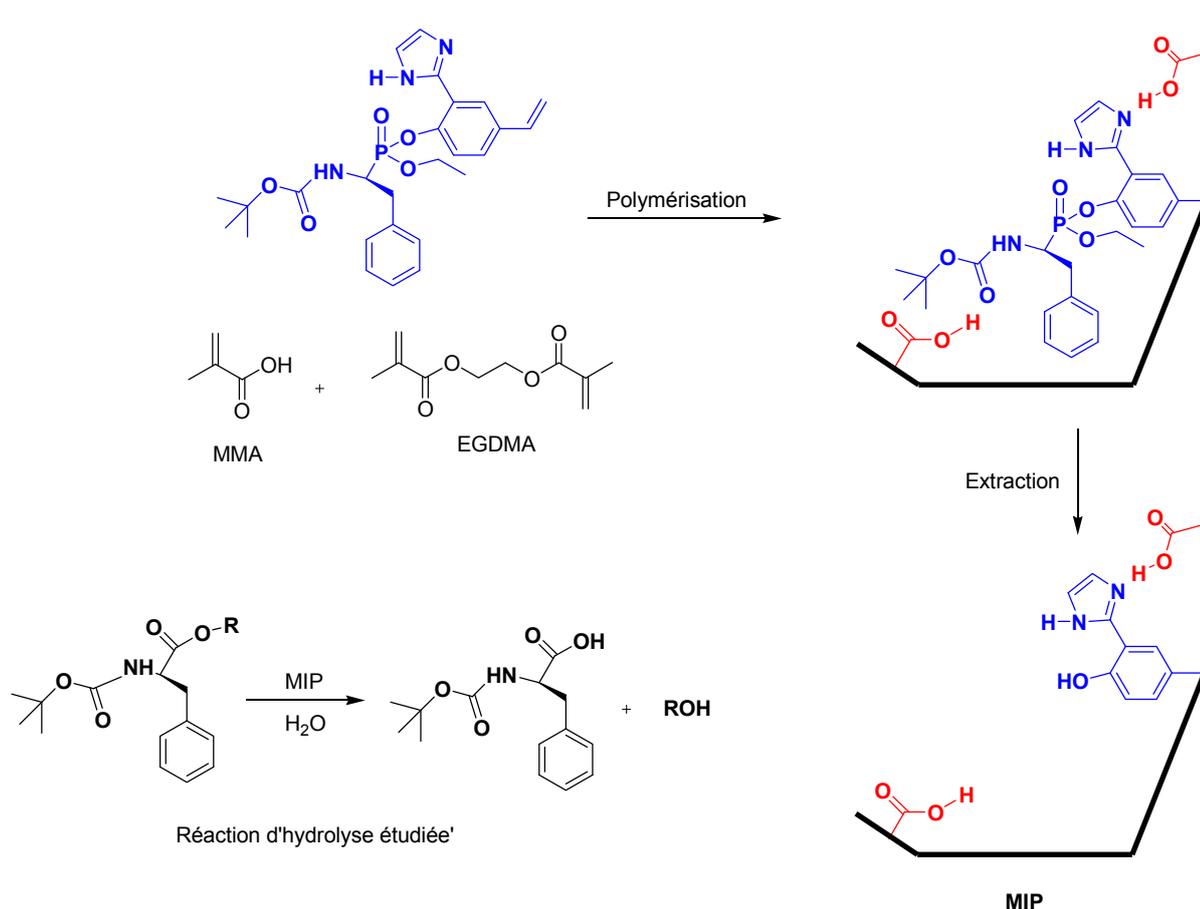


Figure 21. Hydrolyse énantiosélective de l'ester phénylalanine catalysée par les MIP (d'après la référence 80b).

Une série de template phosphorés (chiraux et polymérisables) ont été synthétisés. Après copolymérisation avec de l'EGDMA et de l'acide méthacrylique, le template est extrait par hydrolyse pour générer une fonction phénol, imidazole et acide carboxylique dans le site de reconnaissance du polymère (Figure 21). Les polymères imprimés ont montrés une activité catalytique 10 fois plus importante comparée à la réaction en solution homogène.

5.2.2. MIPs comme récepteurs d'analytes phosphorés

Les pesticides organophosphorés sont largement utilisés pour augmenter les rendements des cultures⁸⁵. Le phosphate qui se libère par décomposition de ces pesticides provoque durant la saison d'été, la prolifération des algues et des mauvaises odeurs dans les eaux des rivières, des lacs et des réservoirs. Il est donc important de développer des systèmes pour la récupération et l'élimination du phosphate dans les milieux aqueux⁸⁶.

Au cours des dernières années le développement de récepteurs artificiels pour les molécules phosphorées a été concentré sur l'utilisation des structures contenant le groupement thiourée. Cette fonction semble avoir des fortes interactions avec les phosphates et de nombreux groupes de recherche ont décrit la préparation de récepteurs artificiels pour des analytes phosphorés en utilisant cette unité⁸⁷. Le groupe de Kugimiya a étudié la préparation des polymères imprimés sélectifs pour les phosphates, contenant le groupe thiourée (Figure 22)⁷⁹.

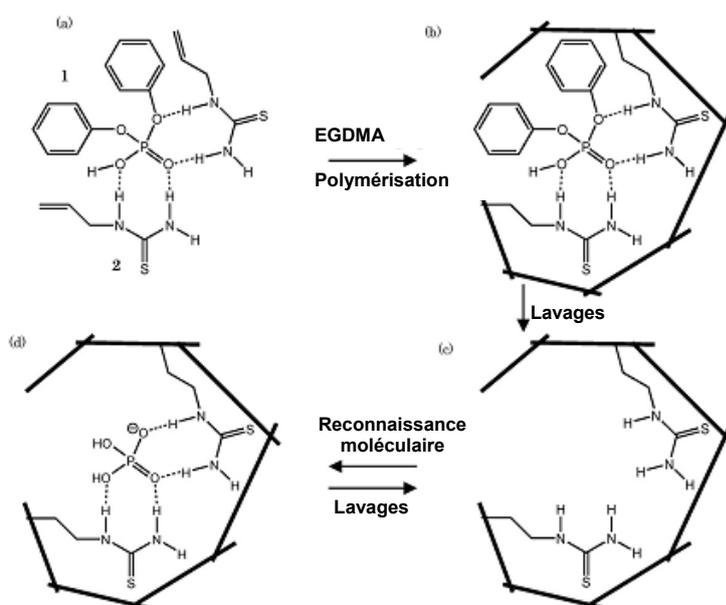


Figure 22. Représentation schématique de la préparation de polymères imprimés pour la reconnaissance des phosphates en présence de 1-allyl-2-thiourée comme monomère fonctionnel (d'après la référence 79).

Le composé 1-allyl-2-thiourée et le diphenyl phosphate ont été utilisés comme monomère fonctionnel et comme template respectivement. Les polymères imprimés ont été préparés en présence de EGDMA comme agent de réticulation par polymérisation en masse. Après extraction du template, le polymère a été évalué dans la reconnaissance des phosphates par chromatographie liquide haute performance. Les polymères imprimés ont montré une capacité expérimentale de 256 μmol par g de polymère et une constante de dissociation K_D de 10,3 μmol .

Par la suite, la fonction urée a été très largement étudiée dans la complexation d'autres phosphates^{88,89}. Dans un exemple rapporté par Sellergren⁸⁸, les polymères imprimés ont été préparés en utilisant le monomère fonctionnel présenté dans la figure 23. Ce monomère a été utilisé en quantité stœchiométrique (approche non-covalente stœchiométrique) et avec en excès pour complexer les templates phosphorés (Figure 23). Les polymères imprimés ont été préparés par polymérisation en masse en utilisant EGDMA comme agent de réticulation. L'efficacité des polymères à complexer les esters de phosphore a été évaluée en tant que phase stationnaire pour le colonne CLHP.

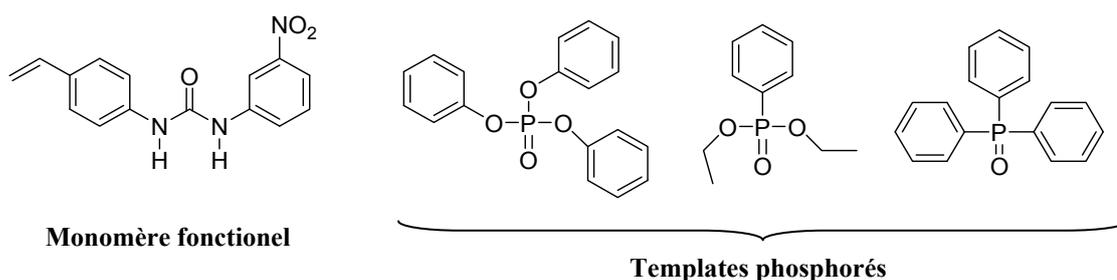


Figure 23. Structure du monomère fonctionnel à base d'urée et des templates phosphorés utilisé pour la préparation de polymères imprimés (d'après la référence 88).

Les polymères imprimés synthétisés par l'approche stœchiométrique non-covalente ont montré de très faibles effets d'empreinte. En revanche, lorsqu'un excès de monomère fonctionnel est utilisé les facteurs d'impressions sont améliorés, mais une augmentation des interactions non-spécifiques est aussi obtenue⁸⁸.

Récemment, le group de Shimizu a reporté la préparation des polymères imprimés pour la reconnaissance des phosphates en utilisant des monomères monofonctionnel ou multifonctionnel à base d'urée⁸⁹. Comme prévu par les auteurs, le monomère multifonctionnel forme des interactions plus fortes avec les analytes phosphorés par rapport au monomère monofonctionnel qui se traduit, en règle générale, par une meilleure capacité et sélectivité. Par contre, les interactions non-spécifiques mesurées avec le polymère de contrôle sont très importantes et dans certains cas les polymères imprimés ne montrent aucun effet d'empreinte. Ces derniers exemples de polymères

imprimés représentent une bonne base de données pour comparer ensuite l'efficacité de nos polymères imprimés synthétisés avec la nouvelle technique de polymérisation optimisée au laboratoire. Avant d'entreprendre la préparation des polymères imprimés, nous avons synthétisé dans un premier temps les molécules template **T1-T3** et les molécules phosphorées **1-4** (Figure 19) utilisées comme analytes.

5.3. Synthèse des template phosphorés T1-T3

5.3.1. Synthèse du template tensioactif T1

La synthèse de ce template tensioactif a été réalisée en collaboration avec le Dr. Stefan Schmidt dans le cadre de son travail postdoctoral au sein du laboratoire.

La première étape de la synthèse du template **T1** consiste en une réaction de Michaelis-Arbuzov^{90,91} entre le phosphite **5** et l'halogénure d'alkyle **6**, conduisant au phosphinate **7** avec 67% de rendement (Schéma 2).

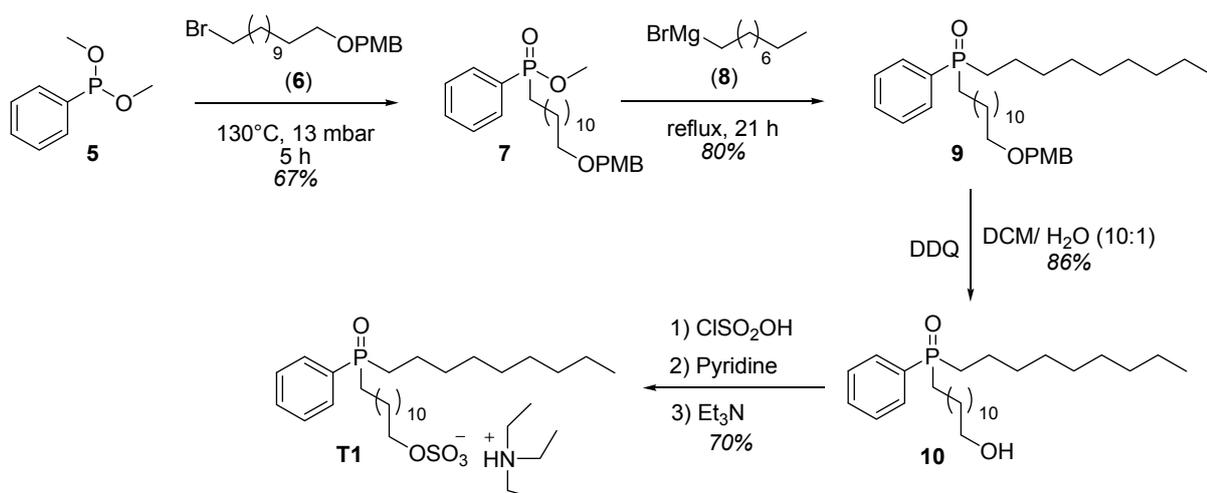


Schéma 2. Synthèse du template tensioactif **T1**.

La réaction est favorisée à haute température et par l'utilisation du diméthyl phosphite **5** qui forme un halogénure (CH_3Br) volatile à la température et à la pression de la réaction.

La deuxième étape de la synthèse est une réaction d'alkylation du composé **7** avec le réactif de Grignard **8** pour conduire à l'oxyde de phosphine **9**. L'alcool **10** est ensuite obtenu par déprotection du groupement PMB avec du 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone (DDQ). La dernière étape de la synthèse du template tensioactif **T1** consiste en la formation d'un O-sulfonate sur la fonction alcool du composé **10**. Pour ce faire, nous avons eu recours au procédé décrit par le groupe de Whitcombe⁶⁵, qui consiste à faire réagir l'alcool **10** avec le complexe de pyridine $\text{Py}\cdot\text{SO}_3$ afin

d'obtenir un sel de pyridinium. Malheureusement les diverses tentatives ont conduit à la formation du produit désiré **T1** avec des faibles rendements. Suite au rendement médiocre de cette réaction, nous avons décidé de synthétiser dans un premier temps l'acide sulfonique correspondant de l'alcool **10**, par réaction avec l'acide chlorosulfonique. L'intermédiaire acide est ensuite traité avec de la pyridine pour obtenir le sel de pyridinium qui, après un échange de contre-ions est transformé en sel de triéthyle d'ammonium correspondant.

5.3.2. Synthèse du template tensioactif **T2**

La synthèse de ce template tensioactif a été réalisée en collaboration avec le Dr. M. Belén Suárez Jiménez dans le cadre de son travail postdoctoral au sein du laboratoire.

La voie de synthèse envisagée pour la préparation du template phosphoré **T2** (Schema 3) est différente de celle utilisée pour le template **T1**, afin d'éviter utilisation des conditions drastiques de la réaction de Michaelis-Arbuzov. Pour ce faire, nous avons appliqué la réaction d'hydrophosphination d'alcène⁹².

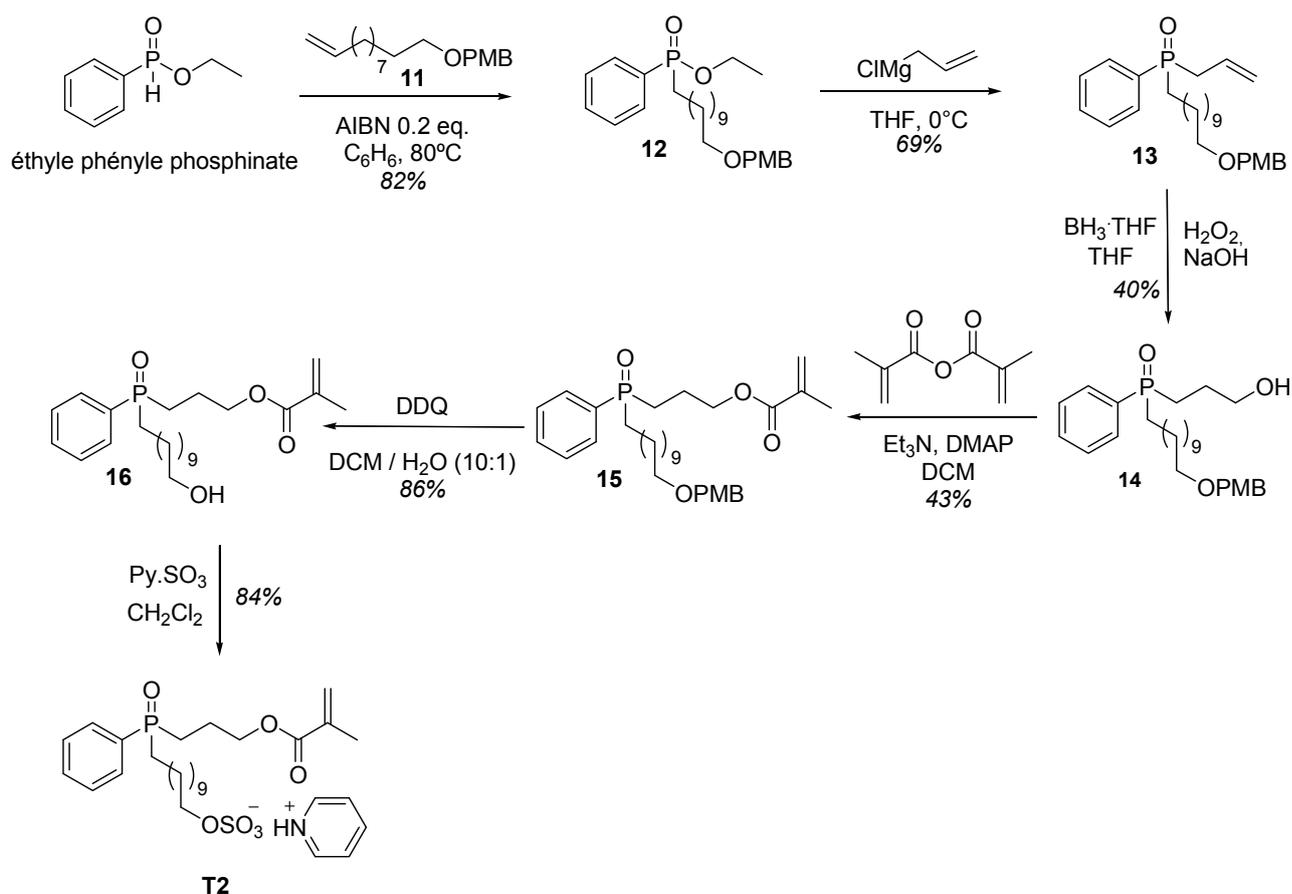


Schéma 3. Synthèse du template tensioactif **T2**.

La réaction est effectuée à 80 °C pour permettre la décomposition de l'AIBN et formation de radicaux libres. Ces radicaux provoquent la rupture homolytique de la liaison P-H de l'éthyle phényle phosphinate, pour former un radical phosphoré **R1** (Schéma 4), qui s'additionne sur la double liaison de l'alcène pour donner le composé radicalaire d'addition correspondant **R2**. Celui-ci réagit avec une deuxième molécule du réactif de départ pour former le composé final **12**, et régénérer le radical **R1** (Schéma 4). Dans notre cas la réaction nécessite 0,2 équivalents d'AIBN, recristallisé avant l'utilisation pour une meilleure efficacité. Le rendement obtenu est de 82% en produit **12** après 16 h de réaction.

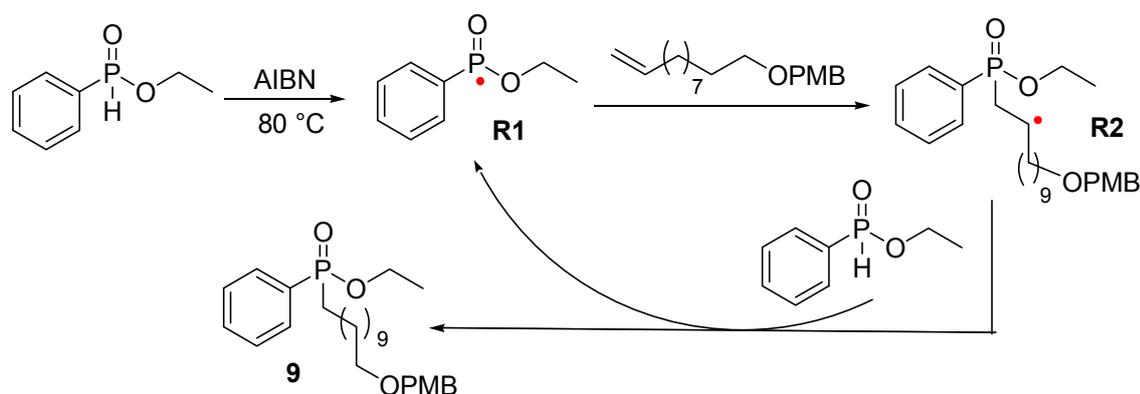


Schéma 4. Mécanisme d'addition d'une liaison P-H sur un alcène en présence d'AIBN.

La poursuite de la synthèse du template tensioactif **T2**, consiste en une réaction de substitution nucléophile sur l'ester phosphorique du chlorure d'allyle-magnésium (Schéma 3). La réaction doit être effectuée très rapidement avec un excès de réactif de Grignard (5 eq) à 0 °C, pour éviter la déprotection du group PMB et la formation de plusieurs produits de dégradation. Ensuite, la double liaison est transformée en alcool primaire **14** par une réaction hydroboration anti-markovnikov. Le produit de la réaction a été obtenu avec un rendement de 40% en raison des nombreuses réactions de dégradation dues également au work-up oxydatif (H₂O₂, NaOH). La suite de la synthèse consiste en l'introduction de la fonction polymérisable par réaction de l'alcool **14** avec l'anhydride méthacrylique. Le rendement de cette réaction n'est pas excellent (43%), due à la formation d'un produit de double addition de l'anhydride méthacrylique, consécutif à la déprotection du groupement PMB. A partir du composé **15**, la synthèse se poursuit comme pour le template tensioactif **T1**, avec une étape de déprotection du groupement PMB par le DDQ, suivie par la formation du sel de pyridinium **T2**. En effet, dans ce cas, la réaction avec le réactif Py·SO₃ a été possible directement, et un rendement de 84% est obtenu.

5.3.3. Synthèse du template tensioactif T3

Pour la synthèse de ce template (Schéma 5), nous avons tout d'abord préparé le phosphinate **18** par une réaction de couplage pallado-catalysées entre l'aryl iodé **17** et l'anilinium hypophosphite en présence du 3-aminopropyl-triéthoxysilane. Cette réaction, bien que décrite dans la littérature, a nécessité un travail d'optimisation conséquent⁹³.

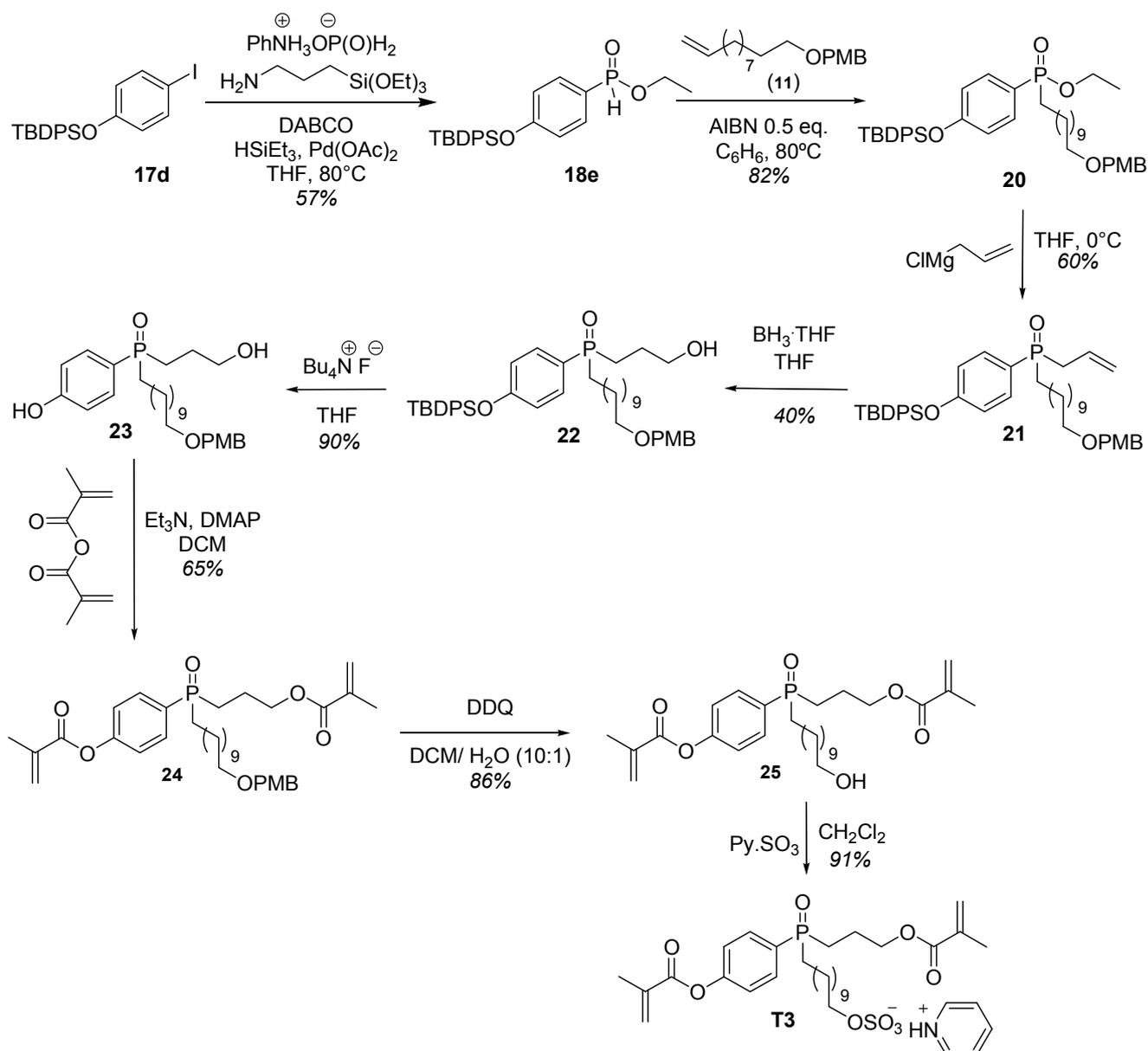


Schéma 5. Synthèse du template tensioactif T3.

A partir d'une série de dérivé du *p*-iodophénol (Schéma 6), nous avons testé différentes conditions réactionnelles. Les résultats obtenus pour la formation du phosphinate **18** sont présentés dans le tableau 3. L'inconvénient majeur de cette de réaction, dont le rendement est limité, est la formation

du composé de double addition **19** (Schéma 6), suite à une réaction secondaire du composé **18** avec le produit de départ **17**.

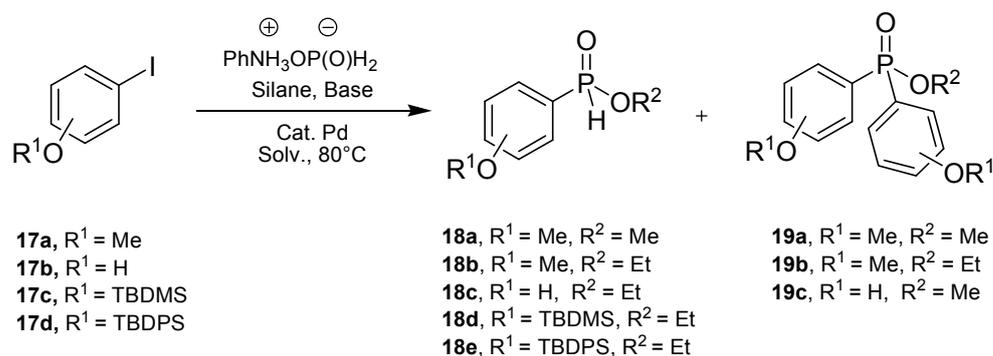
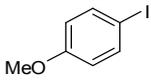
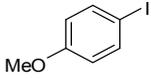
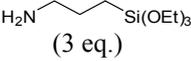
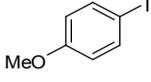
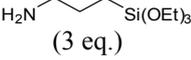
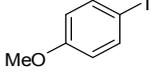
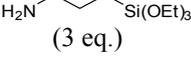
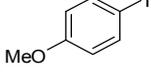
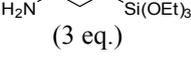
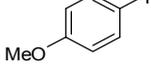
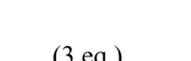
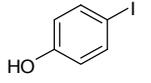
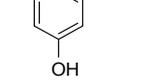
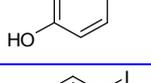
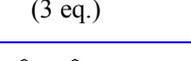
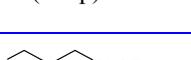


Schéma 6. Synthèse du phosphinate **18** utilisé pour la préparation du template tensioactif **T3**.

Ce dernier composé **19** est formé dans la plupart des conditions testées avec des proportions plus ou moins importante, comme indiqué dans le tableau 3 (Tableau 3, entrée 1-4, 6-7, 9 et 11). Par contre, dans certaines conditions réactionnelles, la formation de ce composé indésirable n'a pas lieu, mais le rendement en composé désiré **18** reste très limité (Tableau 3, entrée 5, 8, 10, 12-13). Enfin, les conditions optimales ont été trouvés en utilisant le système catalytique Pd(OAc)₂/HSiEt₃ (10% en moles par rapport au produit de départ **17d**), le DABCO (1 eq.) comme base et dans le toluène comme solvant. Dans ces conditions, l'H-phosphinate **18e** est obtenu avec un rendement acceptable de 57% (Tableau 3, entrée 15).

Tableau 3. Conditions réactionnelles et résultats obtenus pour la réaction pallado-catalysée.

Entrée	Iodo aryle	Catalyseur	Silane	Base	Solvant	t _R (h)	Rapport 18 : 19
1		Pd(OAc) ₂ /dppp 2 mol %	Si(OMe) ₄ (3 eq.)	DABCO (3 eq.)	Toluène	15 min	1 : 0 Faible rendement
2		Pd(OAc) ₂ /dppp 2 mol %	Si(OMe) ₄ (10 eq.)	DABCO (3 eq.)	Toluène	16	0,4:1
3		Pd(OAc) ₂ /dppp 2 mol %	Si(OMe) ₄ (3 eq.)	DABCO (1 eq.)	Toluène	16	1 : 0 Faible rendement
4		Pd(OAc) ₂ /dppp 10 mol %	Si(OMe) ₄ (3 eq.)	DABCO (3 eq.)	Toluène	16	1 : 0 Faible rendement

Entrée	Iodo aryle	Catalyseur	Silane	Base	Solvant	t _R (h)	Rapport 18 : 19
5		Pd(OAc) ₂ /dppp 2 mol %	Si(OMe) ₄ (3 eq.)	DABCO (3 eq.)	DMF	1	1 : 0,22
6		Pd(OAc) ₂ /dppp 2 mol %	 (3 eq.)	Et ₃ N	CH ₃ CN	24	1 : 0,75
7		Pd ₂ (dba) ₃ 2 mol %	 (3 eq.)	Et ₃ N	CH ₃ CN	5	0 : 1
8		Pd(PPh ₃) ₄ (2 mol %)	 (3 eq.)	Et ₃ N	CH ₃ CN	24	1 : 2,5
9		PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ /HSiEt ₃ 5 mol %	 (3 eq.)	DABCO (1 eq.)	Toluène	20 min	1 : 1
10		Pd(OAc) ₂ /HSiEt ₃ 10 mol %	 (3 eq.)	DABCO (1 eq.)	Toluène	3	1 : 0 (40 %)
11		Pd(OAc) ₂ /dppp 2 mol %	Si(OMe) ₄ (3 eq.)	DABCO (3 eq.)	Toluène	3,5	0 : 1
12		Pd(OAc) ₂ /dppp 2 mol %	Si(OMe) ₄ (3 eq.)	DABCO (3 eq.)	Toluène	3,5	0 : 1
13		Pd(OAc) ₂ /HSiEt ₃ 10 mol %	 (3 eq.)	DABCO (1 eq.)	Toluène	10	1 : 0 (27 %)
14		Pd(OAc) ₂ /HSiEt ₃ 10 mol %	 (3 eq.)	DABCO (1 eq.)	Toluène	5	1 : 0 Séparation difficile
15		Pd(OAc) ₂ /HSiEt ₃ 10 mol %	 (3 eq.)	DABCO (1 eq.)	Toluène	3	1 : 0 (57 %)

Après l'obtention de ce composé **18e**, la synthèse de **T3**, se poursuit selon le même schéma que celui du template précédent **T2**. Le composé **18e** est engagé dans une première réaction d'addition sur l'alcène **11** (Schéma 5) en présence d'AIBN, suivie par une réaction de substitution nucléophile sur l'ester phosphorique par le chlorure d'allyle magnésium pour obtenir l'oxyde de phosphine **21**. La double liaison présente sur ce dernier composé **21** est ensuite convertie en alcool primaire par une réaction d'hydroboration anti-markovnikov. Comme dans le cas de la synthèse du précédent template **T2**, le produit de cette dernière réaction a été obtenu avec un rendement limité à 40% en

raison des nombreuses réactions de dégradation due également au work-up oxydatif (H_2O_2 , NaOH). Une étape de deprotection sélective du groupement TBDPS en présence du groupement PMB avec $\text{Bu}_4\text{N}^+ \text{F}^-$ dans le THF, a permis d'obtenir le composé **23** avec un rendement optimal de 90%. La suite de la synthèse consiste en l'introduction de la fonction polymérisable par réaction du diol **23** avec l'anhydride méthacrylique. Les deux dernières étapes consistent en une étape de deprotection du groupement PMB par le DDQ pour obtenir l'alcool **25** avec un rendement de 86%, suivie par la formation du sel de pyridinium **T3** en présence réactif $\text{Py} \cdot \text{SO}_3$ (Schéma 5).

Notons que les templates **T1-T3** préparés sont des molécules tout à fait stables à température ambiante. Par la suite nous les avons utilisés pour la préparation des MIP.

5.4. Préparation des polymères imprimés

5.4.1. Définition des composantes du système de polymérisation

Afin de préparer les polymères imprimés avec les molécules templates **T1-T3**, nous avons préalablement défini les différentes composantes du système de polymérisation. Les conditions de polymérisation en mini-émulsion (huile dans l'eau) sont caractérisées par la présence d'eau et du dodécylsulfate de sodium (SDS) nécessaire pour la formation des micelles.

Le choix du monomère et de l'agent de réticulation constituant la partie organique du système, ainsi que la matrice polymérique des particules, s'est porté respectivement sur le styrène et sur le divinylbenzène (**DVB**) pour une raison essentielle de stabilité thermique et physicochimique. En effet, la matrice polymérique styrène / **DVB** est résistante aux conditions d'hydrolyse basique utilisées pour extraire les templates après copolymérisation, et ne présente pas des fonctions incompatibles (type esters) avec un milieu basique^{32,94}.

L'AMBN est utilisé comme initiateur radicalaire et l'hexadécane est employé pour stabiliser la mini-émulsion en réduisant le mûrissement d'Ostwald^{68a}.

5.4.2. Formulation du mélange de polymérisation

Comme nous l'avons déjà expliqué lors de l'introduction de ce travail de thèse, les variables qui doivent être optimisés pour la création des MIPs avec une bonne capacité et une bonne affinité pour le template, sont nombreuses (température de polymérisation, pourcentage de réticulation, influence du solvant). En dehors de la procédure générale pour la mise en œuvre d'une polymérisation en mini-émulsion, qui peut être extrapolée à partir de travaux antérieurs, les rapports sur les quantités des différents composants du mélange réactionnel (monomères, agent de réticulation, template,

hexadécane), sont fortement influencés par la méthode de polymérisation et par les interactions entre les monomères fonctionnalisés et le template. Donc, dans notre cas, compte tenu de la nouvelle approche utilisée pour la création d'empreintes moléculaires, nous nous sommes inspirés des conditions de polymérisation «core-shell» en émulsion et des conditions de polymérisation en mini-émulsion décrites par le groupe Whitcombe⁶⁵ et Tovar⁷⁰ respectivement. Les premières ont décrit la préparation d'une dispersion aqueuse de microparticules de styrène/DVB (latex), utilisé comme noyau pour l'impression en surface du cholestérol lors d'une deuxième étape de polymérisation. Dans le cas de Whitcombe, le latex de polystyrène a été préparé par polymérisation en émulsion dans un réacteur équipé d'un condenseur, d'un agitateur mécanique et d'une entrée de gaz pour maintenir une atmosphère inerte d'azote. Le réacteur est ensuite immergé dans un bain d'huile chaud à la température de 80 °C. Puis, un mélange de monomères styrène/divinylbenzène 9:1 (16,7% en masse), d'une solution de NaHCO₃ (0,13% en masse) dans de l'eau distillée (82,3 % en masse) est ajouté dans le réacteur. Le mélange est pré-émulsifié, en présence de SDS (0,64% en masse) sous agitation vigoureuse pendant 10 min à 80 °C, avant d'ajouter le peroxydisulfate d'ammonium (APS, 0,13% en masse, dissous dans 2 ml d'eau) pour initier la polymérisation. La réaction de polymérisation est conduite à 80 °C pendant 24 h. Le latex final est filtré puis utilisé dans la seconde étape de polymérisation.

Le groupe de Tovar⁷⁰ a reporté la préparation de nanosphères imprimées pour la reconnaissance d'un dipeptide chirale par une procédure de polymérisation en mini-émulsion en une seule étape dite "one stage". Dans ce cas, l'agent de réticulation (EGDMA), le monomère fonctionnel (acide méthacrylique), le template (D- ou L-boc-phénylalanine, 1.4 mmol), l'initiateur de polymérisation (AMBN, 0.625 mmol) sont ajoutés à une solution de SDS (0.25 mmol) dans l'eau (50 ml). Puis, les deux phases sont dispersées pendant 1h en présence d'un agent hydrophobe (Hexadécane, 1.11 mmol), qui agit comme stabilisateur de l'émulsion. La mini-émulsion est ensuite obtenue par sonication pendant 2 min à température ambiante (Appareille Branson Digital Sonifier, Model 450-D, 60% de puissance). Enfin, la polymérisation est conduite à 80 °C pendant 16 h.

Après avoir étudié les deux derniers exemples ci-dessus, nous avons décidé d'adopter la composition du mélange de polymérisation indiquée dans le tableau 4. Le pourcentage en masse de différents composants est le même que celui utilisé par Whitcombe. Les réactifs polymérisables correspondent à 16.7% de la masse totale, avec un rapport stoechiométrique Template/DVB/Styrène de 1:34:170.

Comme rapporté dans l'étude conduite par le groupe de Tovar⁷⁰, pour stabiliser la mini-émulsion nous avons également utilisé de l'hexadécane. Dans notre cas la quantité a été optimisée à 0.11 ml (0.72% en masse).

Tableau 4. Composition du mélange de polymérisation pour les polymères imprimés IP_{T1-T3}.

Composants	Pourcentage en masse (%)	Quantités utilisées	Rapport stoechiométrique des réactifs polymérisables
Styrène	16.7	1.68 ml, 14.62 mmol	170
DVB		0.42 ml, 2.92 mmol	34
Template (T1-T3)		0.086 mmol	1
Hexadécane	0.72	0.11 ml, 0.34 mmol	
AMBN	0.16	19 mg, 0.087 mmol	
SDS	0.64	75 mg, 0.32 mmol	
H ₂ O	81.8	9.5 ml	

5.4.3. Procédure de préparation de la mini-émulsion

En fonction de la capacité visée, une quantité connue de template (T1-T3) est solubilisée dans le mélange organique styrène / DVB sous atmosphère inerte (Figure 24). Dans le cas de T2 et T3, l'utilisation d'un millilitre de CHCl₃ est nécessaire pour bien homogénéiser les composés avec les monomères. Ensuite, tous les autres composants (AMBN, H₂O, SDS, hexadécane) sont ajoutés et le mélange est agité vigoureusement pendant 10-15 min pour obtenir une macro-émulsion. Puis, la macro-émulsion est transférée dans une unité à ultrasons (Appareil Bioblok Scientific Vibra-cell, 40% de puissance). Cet appareil n'est pas équipé d'un système de sonication sous atmosphère inerte, et donc un flux d'argon est installé afin de travailler en l'absence d'oxygène (Figure 24), qui est connu pour être un inhibiteur de polymérisation radicalaire⁹⁵. Le temps et la puissance de sonication utilisées, sont celles optimisées par le groupe de Tovar⁷⁰ pour la préparation en mini-émulsion des nanosphères imprimées (2 min à température ambiante pour la même puissance d'appareil). De façon identique, la mini-émulsion est obtenue par sonication pendant 2 min, à température ambiante et sous argon, puis mise dans un bain à 80 °C. La polymérisation est alors conduite avec une agitation constante et vigoureuse pendant 20 h (Figure 24).

Après polymérisation les nanoparticules formées sont récupérées par ultracentrifugation à 27000 tr/min. La séparation des particules a présenté de nombreuses difficultés en raison de la taille nanométrique et de la présence de SDS à la surface des nanosphères, et une série de plusieurs cycles d'ultracentrifugation est nécessaire pour récupérer une quantité suffisante de polymère.

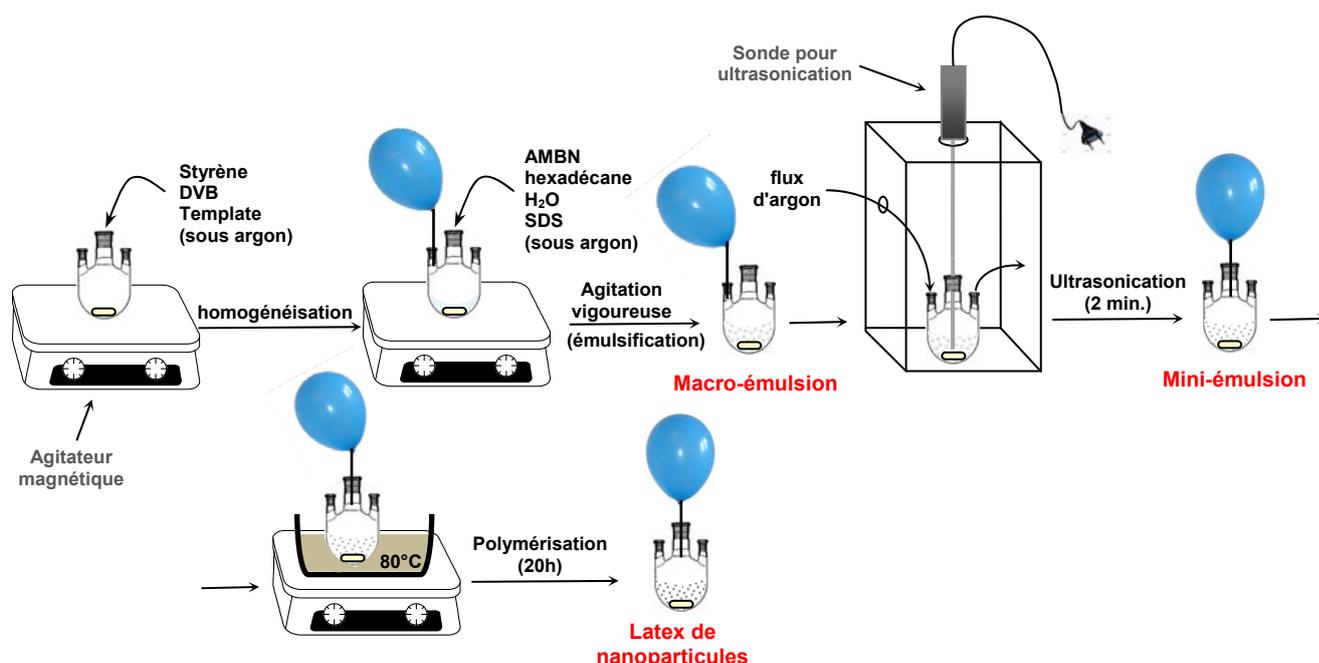


Figure 24. Représentation schématique de la préparation des polymères imprimés par mini-émulsion.

Les nanoparticules sont ensuite lavées plusieurs fois avec un mélange 1:1 (v/v) acétone/H₂O pour éliminer les réactifs n'ayant pas polymérisés et la plupart du SDS. Il est connu que, l'élimination du SDS, reste un problème dans la méthode de polymérisation en émulsion, et la suppression complète exige des procédés de dialyse ou d'ultracentrifugation avec des membranes. La plupart du polymère lavé, séché et lyophilisé est soumis à l'hydrolyse pour extraire le template, alors qu'une petite fraction est séché sous vide toute la nuit et ensuite lyophilisée, pour être caractérisée par des mesures physico-chimiques telles que l'analyse élémentaire, la détermination de la surface spécifique (BET), le potentiel zêta ξ , la mesure de la polydispersité (par diffusion de la lumière) et la microscopie électronique à transmission (MET).

5.4.4. Extraction de la molécule template

Dans le cas du polymère imprimé **IP_{T1}**, préparé avec la molécule **T1** par une approche non-covalente, l'extraction du template **T1** a été réalisée par plusieurs lavages à température ambiante, avec un mélange de MeOH/Acétone (1:1 v/v). Le polymère est toujours récupéré par ultracentrifugation à 27000 tr/min.

Pour l'extraction des templates **T2-T3**, liés de manière covalente à la matrice polymérique, une réaction de saponification est nécessaire pour l'hydrolyse des fonctions esters. La rupture des liaisons esters à l'intérieur de la matrice polymérique obtenue par polymérisation en masse, présente plusieurs difficultés^{1,32,96}, et des conditions drastiques de réduction sont parfois nécessaires^{26,35}. La

plus grande difficulté est l'accessibilité des liaisons esters piégées dans la matrice polymérique. Grâce à la mini-émulsion, la fonctionnalisation des nanosphères en surface devrait permettre une meilleure accessibilité des liaisons esters, et un taux d'extraction important. Dans notre cas, les extractions des template **T2-T3** ont été réalisées par hydrolyse alcaline en utilisant des conditions classiques décrites par Sellergren et Andersson³². Les nanosphères imprimées ont été traitées dans un mélange 1:1 de MeOH et NaOH aqueux (5 M) et la réaction a été conduite à reflux pendant 72h. Les polymères sont ensuite récupérés par centrifugation, traités avec une solution aqueuse 2M de HCl, lavés plusieurs fois avec de l'eau, séchés pendant une nuit sous vide et enfin lyophilisés pour donner les polymères imprimés **IP_{T2}** et **IP_{T3}** avec une ou deux fonctions acides carboxyliques par cavité d'interaction respectivement. Les MIPs sont représentés schématiquement à la figure 25.

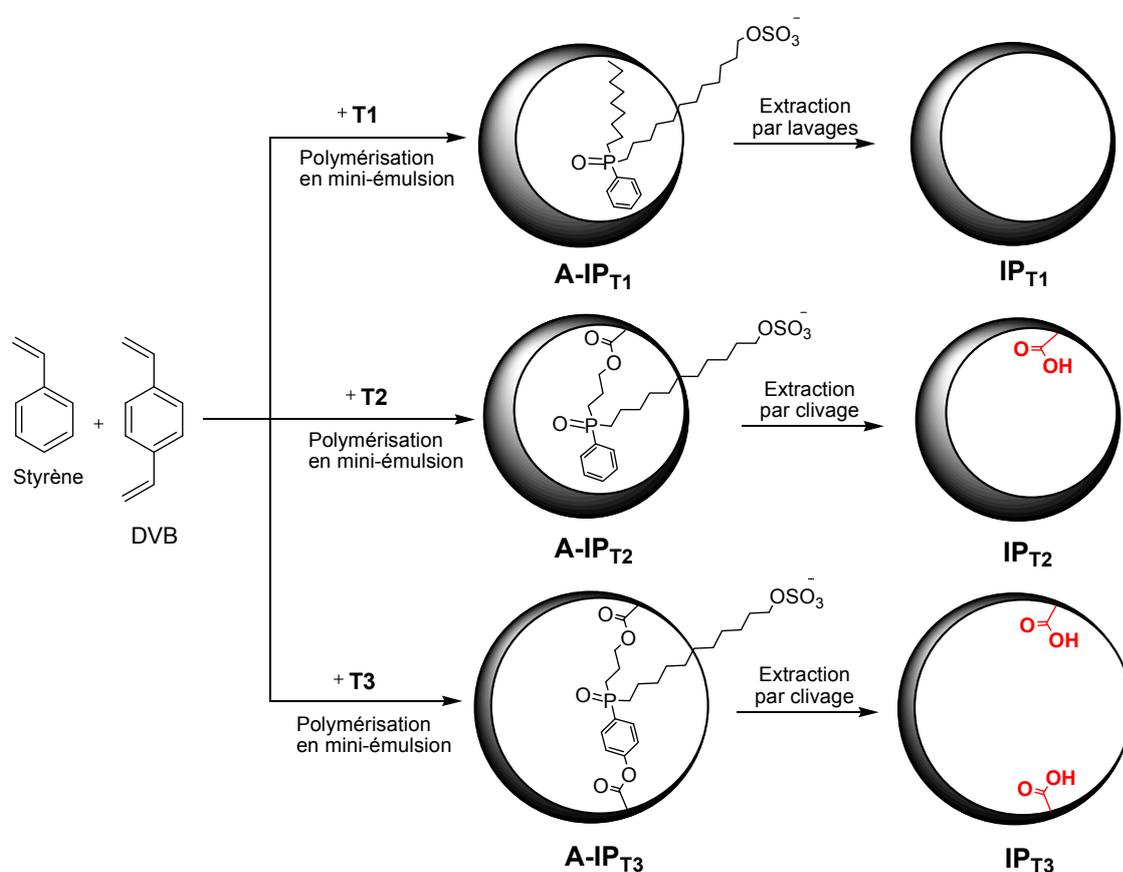


Figure 25. Représentation schématique de la formation des nanosphères imprimées **IP_{T1-T3}**.

5.4.5. Préparation des polymères de contrôle

La préparation d'une série de polymères de contrôle est nécessaire afin de quantifier la reconnaissance non-spécifique des analytes **1-4** avec les polymères imprimés **IP_{T1-T3}**, et mettre en évidence l'effet d'empreinte. Pour le polymère **IP_{T1}** la reconnaissance non-spécifique est évaluée

avec un polymère de contrôle (CP_{T1}) préparé dans les mêmes conditions que IP_{T1} , mais sans l'utilisation du template **T1** (voir partie expérimentale).

Les polymères de contrôle CP_{T2} et CP_{T3} nécessaires pour mesurer la reconnaissance non-spécifique des polymères imprimés IP_{T2} et IP_{T3} , ont été aussi préparés avec la procédure de mini-émulsion décrite précédemment, en absence des templates **T2** et **T3**, mais en présence d'un monomère tensioactif **27** (Figure 26).

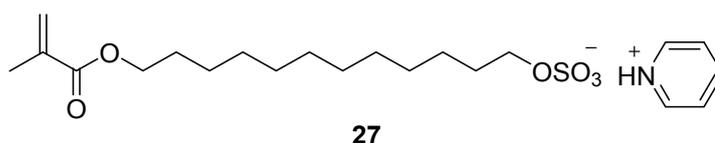
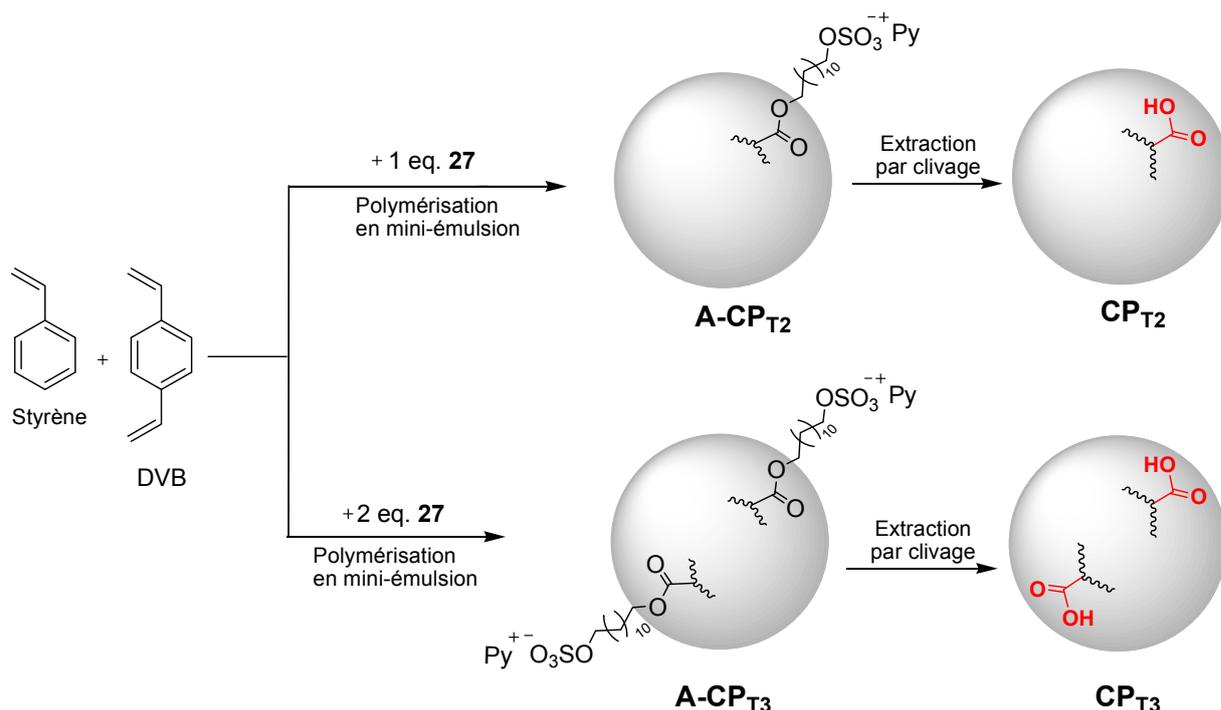


Figure 26. Monomère tensioactif utilisé pour la préparation des polymères de contrôle CP_{T2} et CP_{T3} .

Ce monomère aura également la propriété de se positionner à la surface des nanosphères au cours de la polymérisation, pour donner des groupements acides, disposés de manière aléatoire à la surface, après clivage de la fonction ester et extraction.



Afin d'avoir le même nombre de fonctions acides que les polymères imprimés $\text{IP}_{\text{T2-T3}}$, les polymères de contrôle CP_{T2} et CP_{T3} ont été préparés avec un ou deux équivalent du monomère tensioactif **27** par rapport à la quantité de template **T2** et **T3**, respectivement. Après polymérisation

dans les conditions de mini-émulsion, les polymères ont été traités dans les mêmes conditions d'hydrolyses alcalines utilisées pour IP_{T2} et IP_{T3} , afin d'extraire le monomère tensioactif **27** et obtenir, après acidification, les fonctions acides carboxyliques disposées de manière aléatoire en surface des nanosphères CP_{T2} et CP_{T3} .

5.5. Caractérisation des polymères imprimés IP_{T1-T3} et des contrôles CP_{T1-T3}

Les polymères imprimés synthétisés ont été caractérisés par des mesures physico-chimiques telles que la détermination de la surface spécifique (BET), la mesure de la polydispersité et du diamètre des particules (par diffusion de la lumière) et par microscopie électronique à transmission (MET). Un récapitulatif de ces analyses est présenté dans le tableau 5.

Tableau 5. Caractéristiques physico-chimiques des polymères imprimés IP_{T1-T3} et des polymères de contrôles CP_{T1-T3} .

Entrée	Polymères	Template utilisé	Diamètres moyen des particules (nm) ^a	Polydispersité ^a	Surface spécifique (m ² /g)	
					Après polymérisation	Après clivage et extraction
1	IP_{T1}	T_1	68 ± 8	0.049	N.A. ^b	102.0
2	IP_{T2}	T_2	77 ± 10	0.054	43.0	126.9
3	IP_{T3}	T_3	72 ± 7	0.032	79.0	154.0
4	CP_{T1}	-	72 ± 8	0.064	N.A. ^b	55.0
5	CP_{T2}	SM	77 ± 9	0.037	41.5	53.7
6	CP_{T3}	SM	95 ± 11	0.059	40.9	45.9

a: Les mesures ont été réalisées sur 1.3-1.5 mg de polymère séché et dispersé dans 1.0 ml de H₂O, en utilisant la diffusion de la lumière (Appareil Zetasizer Malvern).

b: Non applicable dans le cas de l'approche non-covalente.

Tous les polymères imprimés IP_{T1-T3} possèdent un diamètre moyen compris entre 68 et 72 nm (Tableau 5, entrée 1, 2 et 3) et une valeur de polydispersité relativement faible (Tableau 5). Cette distribution de taille peu polydisperse, confirmée pour les polymères imprimés IP_{T2} et IP_{T3} par microscopie électronique à transmission (Figure 28), rend compte d'une part de la stabilité de la mini-émulsion et de la maîtrise du procédé de polymérisation.

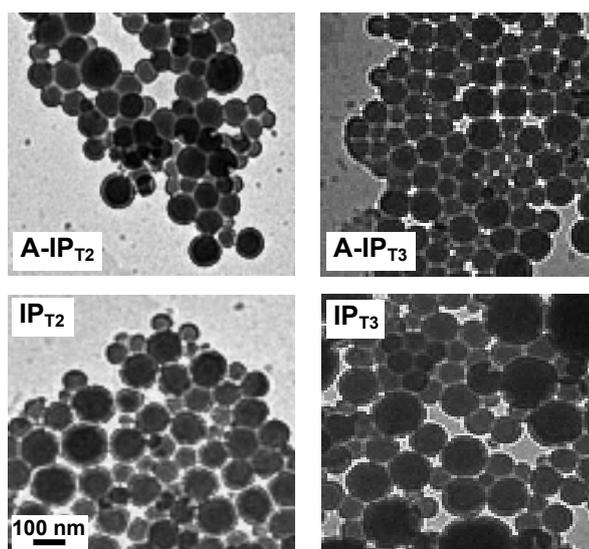


Figure 28. Photographies MET des polymères imprimés **A-IP_{T2}** et **A-IP_{T3}** après polymérisation et des polymères imprimés **IP_{T2}** et **IP_{T3}** après clivage et extraction du template.

Les photographies MET montrent la structure physique et la forme des nanoparticules. On constate que l'aspect morphologique des nanosphères n'est pas affecté par l'extraction du template dans les conditions basiques de saponification. Les analyses de surface spécifique montrent une augmentation de la surface spécifique (Tableau 5), après clivage et extraction du template, pour tous les polymères. Ce dernier résultat expérimental est conforme à ce qui était attendu^{70b}. En effet, lorsque le template est extrait de la matrice polymérique, la surface de la nanoparticule est modifiée, ce qui se traduit par une augmentation de sa surface spécifique^{70b}.

5.5.1. Analyses élémentaires du phosphore

L'atome de phosphore des molécules templates **T1-T3** permet d'évaluer exactement la quantité de template introduite et extraite du polymère, grâce à l'analyse élémentaire du phosphore du matériau avant et après extraction. Les résultats sont rapportés dans le tableau 6.

Dans le cas du polymère imprimé **IP_{T1}** synthétisé par l'approche non-covalente, la quantité de phosphore a été calculée par rapport à la concentration de template **T1** engagé pendant la polymérisation (Tableau 6, entrée 1). Après extraction par plusieurs lavages, une quantité résiduelle de phosphore reste incorporée dans le polymère. Le pourcentage d'extraction est de 92%. Dans le cas des polymères imprimés **IP_{T2}** et **IP_{T3}** synthétisés par l'approche semi-covalente, le template est lié de manière covalente à la matrice polymérique. La quantité copolymérisée avec la matrice styrénique, peut être donc calculée exactement à partir de l'analyse élémentaire du phosphore (Tableau 6, entrée 2-3).

Tableau 6. Analyses élémentaires du phosphore pour les polymères imprimés IP_{T1-T3} après polymérisation et après extraction du template.

Entrée	Polymères	Template utilisé	Analyses élémentaires du phosphore (ppm)		Pourcentage d'extraction (%)
			Après polymérisation	Après extraction	
			1	IP_{T1}	
2	IP_{T2}	T_2	1000 ($A-IP_{T2}$)	729	27
3	IP_{T3}	T_3	856 ($A-IP_{T3}$)	550	36

a: calculé en comparaison avec la quantité de template T1 engagé pendant la polymérisation.

On constate qu'après clivage et extraction des templates **T2** et **T3**, une grande quantité de ces deux molécules reste encore respectivement attachés aux polymères IP_{T2} et IP_{T3} . Les pourcentages d'extraction sont de 27 et 36%, respectivement. Ces derniers résultats confirment les difficultés expérimentales existantes dans l'étape d'hydrolyse des templates **T2** et **T3** comme ceci est décrit dans la littérature pour la polymérisation en masse^{32,34,35,36}. La fonctionnalisation des nanosphères de polymère en surface n'a donc pas permis d'améliorer le clivage des fonctions esters, malgré l'avantage supposé être attendu, d'accessibilité des sites d'impression en surface. Nous avons cependant, pu évaluer la quantité de template extraite et donc pu déterminer la population des sites accessibles de nos polymères imprimés.

Par la suite, nous avons étudié les propriétés de reconnaissance moléculaire des polymères synthétisés ainsi que leur sélectivité par différents tests de complexation croisés avec les analytes **1-4** (Figure 19, page 43).

5.6. Test de reconnaissance moléculaire par la méthode du « batch process »: Evaluation de la capacité du polymère imprimé à complexer les analytes, effet d'empreinte, sélectivité

La propriété des polymères imprimés à reconnaître les molécules à partir desquelles ils ont été préparés, est la caractéristique la plus importante de ces matériaux⁷⁷. Les propriétés de reconnaissance et de sélectivité peuvent être évaluées et calculées à partir des courbes isothermes de complexation correspondantes. Les courbes sont une mesure du comportement de la reconnaissance moléculaire des MIP par rapport à la variation de concentration de l'analyte. Un polymère de contrôle est aussi testé dans les mêmes conditions, afin d'évaluer les interactions non-spécifiques entre la matrice polymérique et l'analyte. Cette dernière mesure permet de calculer le facteur d'impression **I** (voir partie 3.2, page 33)⁷⁵, un paramètre qui rend compte du nombre de fois qu'un analyte est reconnu par le polymère imprimé par rapport au polymère de contrôle.

Par ailleurs les pourcentages d'extraction des templates **T1-T3** évalués par analyse élémentaire du phosphore (Tableau 6), ont permis de calculer les capacités de reconnaissance expérimentales maximales des polymères **IP_{T1-T3}** à partir de leur capacité théorique (Tableau 7). Cette capacité expérimentale représente à priori, la population des sites accessibles pour un analyte. La valeur sera très utile pour évaluer la performance de reconnaissance des polymères avec leurs analytes respectifs.

Tableau 7. Capacité théorique et expérimentale pour les polymères imprimés **IP_{T1-T3}**.

Entrée	Polymères	Templates utilisé	Pourcentage d'extraction d'après analyse élémentaire du phosphore (%)	Capacité de reconnaissance (μmol / g)	
				Théorique	Expérimentale
1	IP _{T1}	T1	92	44,1 ^a	40,9
2	IP _{T2}	T2	27	32,3 ^b	8,8
3	IP _{T3}	T3	36	27,6 ^b	9,9

a: calculé d'après la quantité de template T1-T3 engagé pendant la polymérisation.

b: calculé d'après l'analyse élémentaire du polymère imprimé avant extraction du template

Après avoir caractérisé et mesuré précisément les capacités théoriques et expérimentales des polymères imprimés **IP_{T1-T3}**, nous nous sommes intéressés à étudier leur affinité avec les molécules analytes **1-4** (Figure 19), par la méthode du « batch process » (voir partie 3.1, page 32).

Pour mesurer l'effet des fonctions acides carboxyliques présentes à l'intérieur des cavités des polymères imprimés **IP_{T2-T3}** sur la capacité et la sélectivité de complexation des analytes phosphorés **2** et **3**, les tests de reconnaissance moléculaire ont été réalisés en utilisant l'acétonitrile. Le choix de ce solvant s'est fait selon trois critères :

- capacité à solubiliser les analytes phosphorés **1-4**
- faible tendance à accepter des liaisons hydrogènes
- point d'ébullition suffisamment élevé pour éviter tout problème d'évaporation au niveau des expériences d'incubation.

Concrètement, 5 mg de polymères imprimés **IP_{T1-T3}** et de polymères de contrôle **CP_{T1-T3}** ont été dispersés dans 1 ml d'une solution d'acétonitrile contenant différentes concentrations des molécules phosphorées **1-4** (Figure 19), à température ambiante (20-22 °C) et pendant 24h d'incubation. Les particules sont ensuite séparées par centrifugation, et la concentration avant et après incubation a été mesurée et quantifiée par CLHP en traçant au préalable la droite d'étalonnage correspondante. La différence entre ces deux valeurs de concentration a été attribuée à la quantité d'analyte liée aux polymères imprimés ou aux polymères de contrôle.

Nous avons d'abord porté notre attention sur la capacité des polymères imprimés à complexer leur analyte "original", par rapport au polymère de contrôle afin de calculer l'effet d'empreinte (**I**). Ensuite nous avons étudié l'affinité des polymères imprimés vis-à-vis d'autres analytes phosphorés afin de calculer les facteurs de sélectivités.

5.7. Evaluation des propriétés de reconnaissance moléculaire du polymère imprimé IP_{T1}

5.7.1. Capacité et effet d'empreinte

Le polymère imprimé **IP_{T1}** a été préparé par approche non-covalente basé exclusivement sur des interactions π - π stacking, liaison de Van Der Waals, en utilisant le template **T1**. Les sites de reconnaissances à l'intérieur du polymère ne possèdent aucune fonction acide carboxylique, et la reconnaissance moléculaire de son analyte "original" **1** sera assurée par des interactions hydrophobes et par la complémentarité de forme de la cavité avec **1** (Figure 29). conditions d'incubation

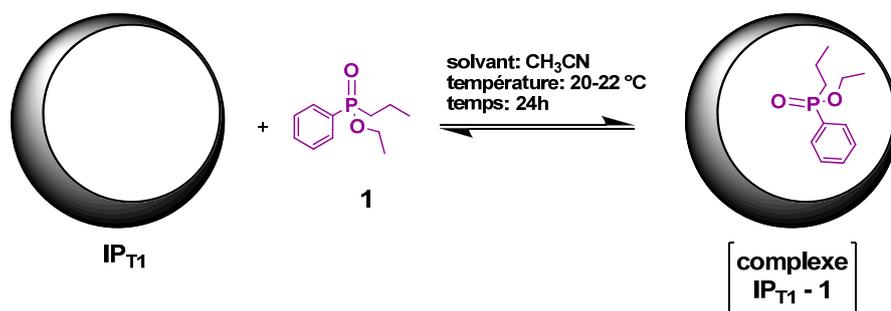


Figure 29. Complexation de analyte phosphoré **1** par le polymère imprimé **IP_{T1}**.

Les résultats de l'équilibre de complexation entre le polymère imprimé **IP_{T1}** et le polymère de contrôle **CP_{T1}** avec l'analyte phosphoré **1** sont représentés dans la figure 30.

Les histogrammes représentent la quantité de substrat fixé dans le polymère **IP_{T1}** (**B**, en $\mu\text{mol/g}$), en fonction de la quantité d'analyte **1** initialement mise à incuber (**C**, en mM). L'incertitude sur chaque mesure est exprimée par l'écart type de trois injections successives en CLHP du même échantillon. Par ailleurs la reproductibilité des résultats a été vérifiée sur différents échantillons de polymère imprimé préparés indépendamment.

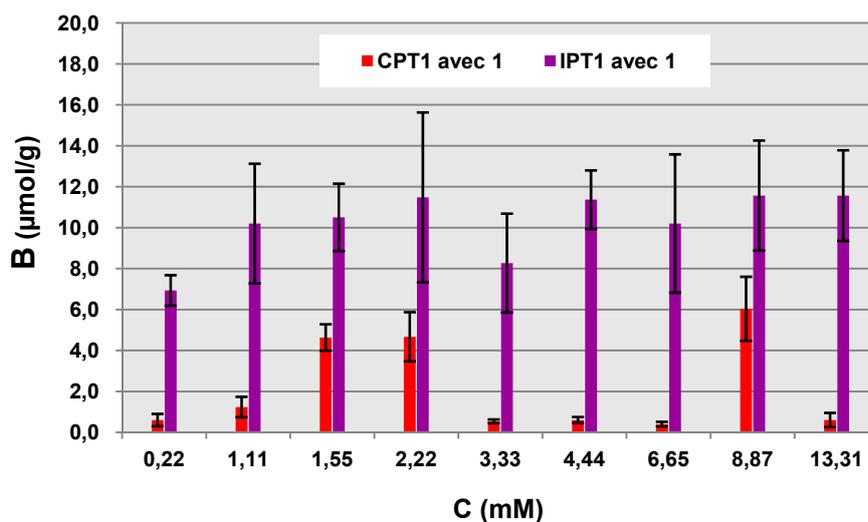


Figure 30. Reconnaissance moléculaire spécifique (**B**) du phosphinate **1** avec le polymère IP_{T1} et le polymère de contrôle CP_{T1} à différentes concentrations initiales de **1** (**C**).

Le polymère imprimé IP_{T1} montre déjà à faibles concentrations initiale de substrat (0.22 mM), une bonne affinité pour le phosphinate **1** par rapport au polymère de contrôle CP_{T1} (Figure 30).

On constate que la quantité d'analyte liée au polymère imprimé reste quasiment constante dans la gamme de concentration étudié (1.11 – 13.31 mM). Au contraire, le polymère de contrôle montre une tendance variable en fonction de la concentration qui est tout à fait inhabituel^{77b}. À l'heure actuelle, nous ne sommes pas en mesure de donner une explication rationnelle de ce phénomène observé avec CP_{T1} , et des tests ultérieurs de vérification sont en cours au laboratoire.

Les analyses élémentaires du phosphore pour le polymère imprimé IP_{T1} (Tableau 5), montrent que presque tous le template **T1** (92%) engagé initialement dans la polymérisation a été extrait de la matrice au cours des différents lavages avec du MeOH. Pour ce polymère la reconnaissance maximale pour le phosphinate **1**, à la concentration de 13.31 mM est de $11.6 \pm 2.3 \mu\text{mol/g}$, correspondant à 29% de la capacité expérimentale de fixation ($40.9 \mu\text{mol/g}$). Par ailleurs, la faible affinité obtenue avec le polymère de contrôle CP_{T1} ($0.6 \pm 0.2 \mu\text{mol/g}$) à la même concentration initiale de substrat (13.31 mM), indique le bon effet d'empreinte obtenu avec cette approche basée sur des interactions purement hydrophobes. En accord avec la littérature³⁴ (voir aussi la partie 3.2, page 33), le facteur d'impression **I** a été calculé et il est de 19.4 à la concentration de 13.31 mM.

Ce dernier résultat fait de cette approche, basée sur des interactions purement hydrophobes, une voie à suivre pour résoudre certains problèmes d'interactions entre les templates phosphorés et les monomères fonctionnels, y compris le problème de la reconnaissance non spécifique. Ces problèmes ont été récemment rapportés par Sellegreen et *al.* dans la préparation des polymères

imprimés pour la reconnaissance de phosphates *via* une approche non-covalente, en utilisant un monomère fonctionnel à base d'urée⁸⁸.

L'effet d'empreinte du polymère imprimé IP_{T1} étant mis en évidence, nous avons étudié la sélectivité de ce polymère vis-à-vis des phosphinate **2** et **3**.

5.7.2. Étude de la sélectivité du polymère imprimé IP_{T1}

Pour l'étude de sélectivité, une quantité fixe (5 mg) de polymère imprimé IP_{T1} a été incubé avec 1 ml d'une solution d'acétonitrile contenant différente concentration des phosphinate **2** et **3**, à température ambiante (20-22 °C) et pendant 24h d'incubation. Ces tests de reconnaissance croisés pour ce polymère IP_{T1} avec les autres phosphinates **2-3**, qui diffèrent par rapport à **1**, par la présence de un ou deux groupes hydroxyles, permettent de mettre en évidence la sélectivité du polymère IP_{T1} . Les résultats de ces tests de reconnaissance moléculaire sont illustrés à la figure 31.

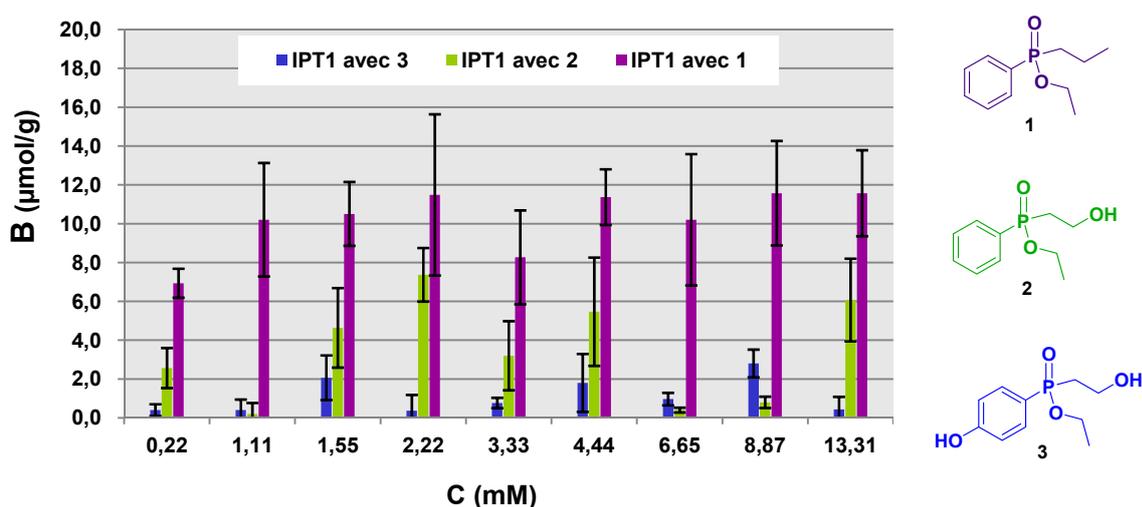


Figure 31. Reconnaissance moléculaire spécifique (**B**) des phosphinate **2** et **3** avec le polymère IP_{T1} à différentes concentrations initiales (**C**).

Dans l'ensemble de la gamme de concentration étudiée, nous pouvons constater que le polymère imprimé IP_{T1} est sélectif pour le phosphinate **1**. De plus, le polymère montre plus d'affinité pour la molécule **2** ($6.1 \pm 2.1 \mu\text{mol/g}$ à la concentration de 13.31 mM), qui présente une seule fonction hydroxyle, par rapport au phosphinate **3** ($0.4 \pm 0.2 \mu\text{mol/g}$ à la concentration de 13.31 mM) qui contient deux fonctions hydroxyles et qui est donc plus polaire. Les facteurs de sélectivité α ont été calculés pour le polymère imprimé IP_{T1} avec les analytes correspondants **1-3**, à une concentration de 13.31 mM, avec la méthode précédemment décrite par le groupe de Striegler⁷⁶ (voir la partie 3.2, page 33), et sont représentés dans le tableau 8.

Tableau 8. Facteurs de sélectivités entre les phosphinates **1-3** avec les polymères imprimés **IP_{T1-T3}** à la concentration de 13.31 mM.

Entrée	Polymères	Facteurs de sélectivités α		
	IP_{Tx}^b	α_{x-1}^b	α_{x-2}^b	α_{x-3}^b
1	IP_{T1}	-	1.6	9.1
2	IP_{T2}	20.4	-	1.9
3	IP_{T3}	28.5	2.7	-

a: Le facteur de sélectivité α pour deux molécules i and j est défini comme $\alpha_{ij} = (C_{ij=i} - C_{control,i}) / (C_{ij=j} - C_{control,j})$, où C_{ij} est la concentration de la molécule j reconnu par un polymère imprimé ⁶⁸.

b: x = 1, 2 or 3 en fonction de la molécule l'analyte utilisée.

Il est important de noter que la quantité reconnue de **3** reste faible et généralement inférieure à 3 $\mu\text{mol/g}$, alors que l'analyte **2** est complexé de façon aléatoire (Figure 31). Notons également, que la reconnaissance non-spécifique avec **CP_{T1}** à déjà été retranchée aux valeurs rapportées dans l'histogramme.

Nous pensons que la différence d'affinité entre les molécules **1-3** et le polymère **IP_{T1}**, peut s'expliquer d'un part par l'effet d'empreinte obtenu au cours de la polymérisation, et d'autre part, par la différence entre le caractère hydrophobe des sites de reconnaissance de **IP_{T1}** et le caractère hydrophobe des phosphinate **1-3**. A titre purement indicatif, pour évaluer le caractère hydrophobe des analytes **1-3**, nous avons utilisé un paramètre appelé logP, qui tient compte de la solubilité de l'analyte entre deux liquides, l'un a caractère hydrophobe l'octanol et l'autre a un caractère hydrophile l'eau. La valeur du logP est proportionnelle à l'hydrophobie de la molécule et peut être obtenue par le logiciel ChemDraw. Pour les analytes **1-3** la valeur est de 2.414, 1.0004 et 0.3334 respectivement. Ensuite, les valeurs de logP ont été comparées avec les facteurs de sélectivité. Il s'avère que, plus le caractère hydrophobe entre deux analytes est élevé, plus le facteur de sélectivité α est grand. Cette observation est tout à fait en accord pour le polymère **IP_{T1}** où les seules interactions π - π stacking, liaison de Van Der Waals et liaisons hydrophobe, dans le site de reconnaissance peuvent avoir lieu.

Par la suite nous avons étudié les propriétés de reconnaissance moléculaire de polymères imprimés **IP_{T2}** et **IP_{T3}**.

5.8. Evaluation des propriétés de reconnaissance moléculaire du polymère imprimé IP_{T2}

5.8.1. Capacité et effet d'empreinte

A la différence du polymère imprimé IP_{T1} , le polymère imprimé IP_{T2} a été préparé par une approche semi-covalente en utilisant le template **2**. Les cavités à l'intérieur du polymère présentent une fonction acide carboxylique capable de former des liaisons hydrogènes avec l'analyte "original" **2** lors des tests de reconnaissance moléculaire (Figure 32).

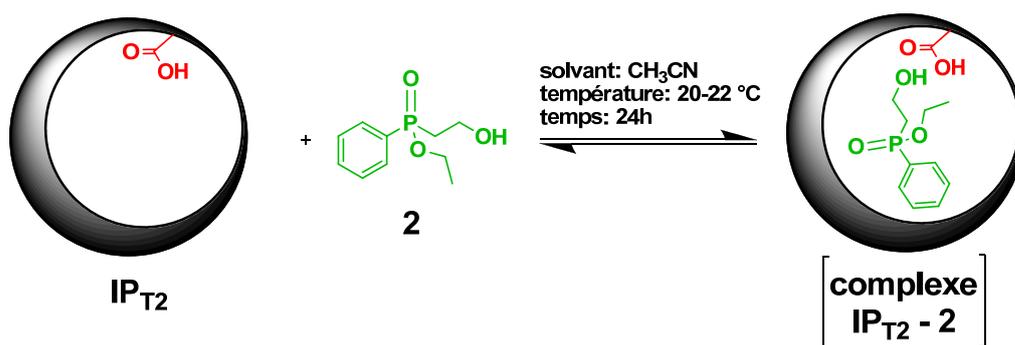


Figure 32. Complexation de analyte phosphoré **2** avec le polymère imprimé IP_{T2} .

Pour évaluer la capacité et l'effet d'empreinte, 5 mg du polymère imprimé IP_{T2} et du polymère de contrôle CP_{T2} ont été incubés avec des solutions à différente concentration d'analyte **2** dans l'acétonitrile, dans les mêmes conditions utilisées pour l'évaluation des propriétés du polymère IP_{T1} . Les résultats de binding à différentes concentrations initiales de substrat **2** sont présentés dans la figure 33.

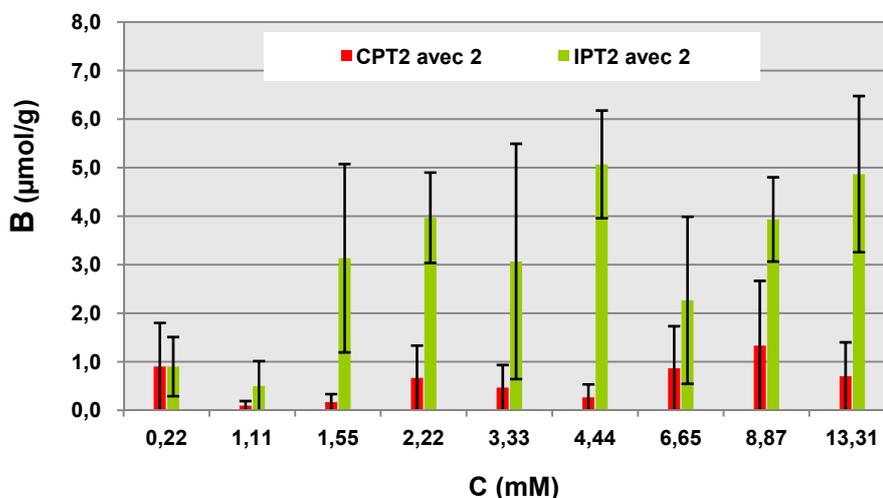


Figure 33. Reconnaissance moléculaire spécifique (**B**) du phosphinate **2** avec le polymère imprimé IP_{T2} et du polymère de contrôle CP_{T2} à différentes concentrations initiales de **2** (**C**).

Comme nous l'avions observé pour le polymère imprimé IP_{T1} , les nanoparticules imprimées IP_{T2} sont plus performantes dans la complexation du phosphinate "originale" **2**, par rapport au polymère de contrôle CP_{T2} (Figure 33).

La reconnaissance maximale est de 5.1 ± 1.1 $\mu\text{mol/g}$ à la concentration de 4.44 mM. En tenant compte du pourcentage d'extraction du template **T2** pour ce polymère imprimé IP_{T2} (27%), cette valeur de reconnaissance moléculaire correspond à une occupation de 63% des sites expérimentaux (8.8 $\mu\text{mol/g}$). Pour le polymère de contrôle CP_{T2} la reconnaissance du phosphinate **2** atteint une faible valeur de 0.8 ± 0.4 $\mu\text{mol/g}$ à la même concentration initiale de substrat **2** (4.44 mM). Dans ces conditions, le facteur d'impression est de 6.7, qui suggère un effet d'empreinte important obtenu avec l'approche semi-covalent dans les conditions de polymérisation en mini-émulsion. Nous notons également que, lorsque nous passons à des concentrations initiales de substrat **2** plus élevées que 4.44 mM, l'effet d'empreinte diminue, en conséquence de l'augmentation des interactions non spécifiques avec le polymère de contrôle.

Comme décrit précédemment (voir partie 5.2.2, page 48), le groupe de Shimizu, a rapporté récemment la préparation de polymères imprimés (par approche non-covalente) pour la reconnaissance sélective de composés organophosphorés, en utilisant un monomère monofonctionnel ou multifonctionnel à base de thiurée⁸⁹. Les polymères montrent une bonne capacité expérimentale mais un très faible effet d'empreinte pour des phosphates, en raison de la grande capacité du polymère de contrôle, contrairement aux faibles capacités observées par le polymère de contrôle CP_{T2} , préparé par mini-émulsion avec une approche semi-covalente. Cette différence s'explique probablement par la différence des deux approches utilisées pour la préparation des MIP. En effet, le groupe de Shimizu a mis en œuvre une approche non-covalente, connue pour donner des interactions non-spécifiques plus élevées par rapport à l'approche semi-covalente²⁶.

5.8.2. Étude de la sélectivité du polymère imprimé IP_{T2}

La sélectivité du polymère imprimé IP_{T2} a également été évaluée par des tests de reconnaissance moléculaire en présence des phosphinates **1** et **3**, par la méthode du "batch process". Les résultats sont représentés dans la figure 34.

Nous pouvons noter qu'à faible concentration initiale de substrat **2** (0.22-3.33 mM), le polymère imprimé IP_{T2} ne présente aucune sélectivité pour le phosphinate **2**. Dans cette gamme de concentration le substrat **1** est celui qui est le mieux reconnu par ce polymère imprimé IP_{T2} (Figure 34). Ce résultat est surprenant car la cavité du polymère imprimé IP_{T2} est plus polaire que le phosphinate **1**. La nature des interactions entre le polymère imprimé IP_{T2} et le phosphinate **1** est

difficilement explicable, et peut avoir pour origine la génération d'interactions non-spécifiques (hydrophobe) à faible concentration initiale du substrat **2** (0.22-3.33 mM, Figure 34).

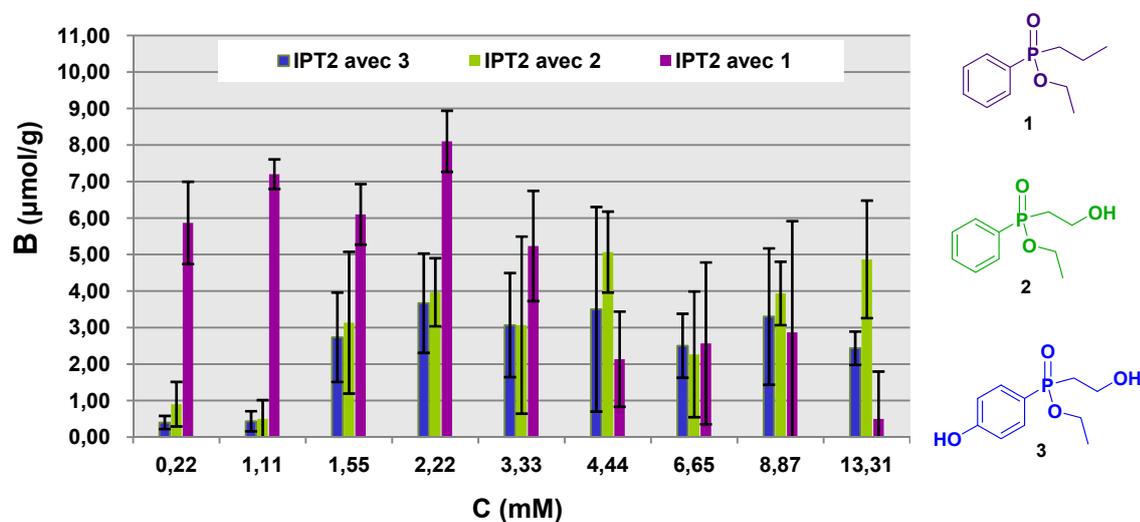


Figure 34. Reconnaissance moléculaire spécifique (**B**) des phosphinate **1-3** avec le polymère IP_{T2} à différentes concentrations initiales (**C**).

Lorsque la concentration initiale d'analyte **2** devient de plus en plus important ($>$ de 3.33 mM) le polymère imprimé IP_{T2} montre un petit peu plus d'affinité pour son analyte "originale" **2**. À la concentration de 13.31 mM les facteurs de sélectivité α_{2-1} et α_{2-3} , calculé de la même façon que pour le polymère imprimé IP_{T1} , sont de 20.4 et 1.9 respectivement (Tableau 8, entrée 2). Notons également que la sélectivité la plus élevée est observée entre les molécules **2** et **1**, probablement dû au fait que les composés **1** ne contient pas de groupes hydroxyles capables d'interagir (liaisons hydrogène), avec la fonction acide carboxylique présent dans l'empreinte du polymère imprimé IP_2 . Par la suite nous avons évalué les propriétés de reconnaissance moléculaire du polymère imprimé IP_{T3} avec les phosphinates **2** et **3** et avec **1**.

5.9. Evaluation des propriétés de reconnaissance moléculaire du polymère imprimé IP_{T3}

5.9.1. Capacité et effet d'empreinte

La préparation du polymère imprimé IP_{T3} a été réalisée en présence du template **T3**, par une approche semi-covalente dans les conditions de polymérisation en mini-émulsion. Les cavités du polymère possèdent après extraction du template **T3**, deux fonctions acides carboxyliques dans les sites de reconnaissance. Ces fonctions sont capables de former des liaisons hydrogènes avec les deux groupes hydroxyles présents sur le phosphinate **3** lors des tests de complexation (Figure 35).

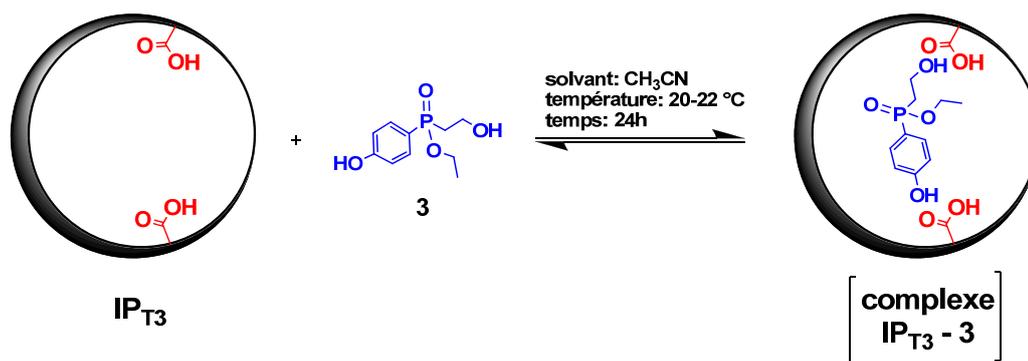


Figure 35. Complexation de l'analyte phosphoré **3** par le polymère imprimé IP_{T3} .

Comme précédemment décrit pour les tests de reconnaissance moléculaire des polymères imprimés IP_{T1} et IP_{T2} , le polymère imprimé IP_{T3} et le polymère de contrôle CP_{T3} ont également été évalués dans la complexation du phosphinate **3** à différentes concentrations initiales de substrat. Les résultats sont représentés dans la figure 36.

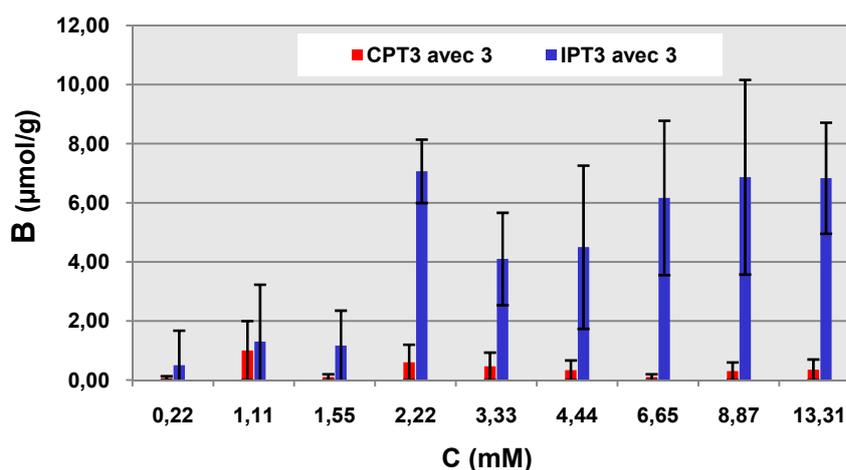


Figure 36. Reconnaissance moléculaire spécifique (**B**) du phosphinate **3** avec le polymère imprimé IP_{T3} et le polymère de contrôle CP_{T3} à différentes concentrations initiales de **3** (**C**).

Le polymère imprimé IP_{T3} possède une affinité spécifique pour le phosphinate "original" **3** par rapport au polymère de contrôlé CP_{T3} (Figure 36), comme précédemment observé pour les polymères imprimés IP_{T1} et IP_{T2} . Ce dernier résultat confirme que la position des fonctions acides carboxyliques à l'intérieur des sites de reconnaissance des polymères imprimés IP_{T2} et IP_{T3} , joue un rôle clé pour une bonne affinité MIP-substrat. Contrairement, la distribution complètement aléatoire des fonctions acide carboxyliques dans les polymères de contrôle CP_{T2} et CP_{T3} empêche une bonne reconnaissance moléculaire des phosphinates **2** et **3** respectivement.

La reconnaissance moléculaire maximale du phosphinate **3** avec le polymère IP_{T3} est de $6.8 \pm 1.8 \mu\text{mol/g}$ à la concentration initiale de 13.31 mM, correspondant à 70% de la capacité

expérimentale de fixation ($9.8 \mu\text{mol/g}$). Dans les mêmes conditions de concentration initiale de substrat **3**, le polymère de contrôle CP_{T3} montre une très faible affinité de $0.4 \pm 0.1 \mu\text{mol/g}$ (Figure 36). Les facteurs d'impression **I**, toujours à la concentration de 13.31 mM, est de 7,2.

Un récapitulatif des facteurs d'impression **I** calculés à la concentration de 13.31 mM est présenté dans le tableau 9.

Tableau 9. Facteurs d'impression **I** obtenus avec les polymères imprimés $\text{IP}_{\text{T1-T3}}$ à la concentration de 13.31 mM.

Entrée	Polymères	Analyte phosphoré reconnu	Facteurs d'impression I
1	IP_{T1}	1	19.8
2	IP_{T2}	2	4.4
3	IP_{T3}	3	7.2

Après avoir démontré l'effet d'empreinte pour le polymère IP_{T3} , nous nous sommes consacrés à l'étude de la sélectivité vis-à-vis des substrats **1** et **2**.

5.9.2. Étude de la sélectivité du polymère imprimé IP_{T3}

Les résultats des tests de reconnaissance pour le polymère imprimé IP_{T3} avec les composés **1-3**, toujours conduits dans les mêmes conditions de température (20-22 °C) et de solvant (CH_3CN) pendant 24h, sont représentés dans la figure 37.

Comme pour le cas du polymère imprimé IP_{T2} , à faible concentration initiale de substrat **3** (0.22-1.55 mM) le polymère imprimé IP_{T3} n'est pas sélectif pour son analyte "original" **3**. Probablement dans le cas des polymères imprimés IP_{T2} et IP_{T3} l'absence de sélectivité à faibles concentrations initiale de substrat, peut être attribuée à l'importance des interactions non-spécifiques autour des nanosphères. On rappelle que la reconnaissance moléculaire des phosphinate **2** et **3** par les polymères imprimés IP_{T2} et IP_{T3} respectivement, est assurée par la formation de une ou de deux liaisons hydrogènes à l'intérieur de la cavité (Figure 32 et Figure 35 respectivement).

Nous supposons que, à faibles concentrations de substrat, les interactions non-spécifiques autour des nanosphères (Interactions π - π stacking, liaison de Van Der Waals et liaisons hydrogènes) jouent un rôle plus importante que les liaisons hydrogènes à l'intérieur des sites de reconnaissance.

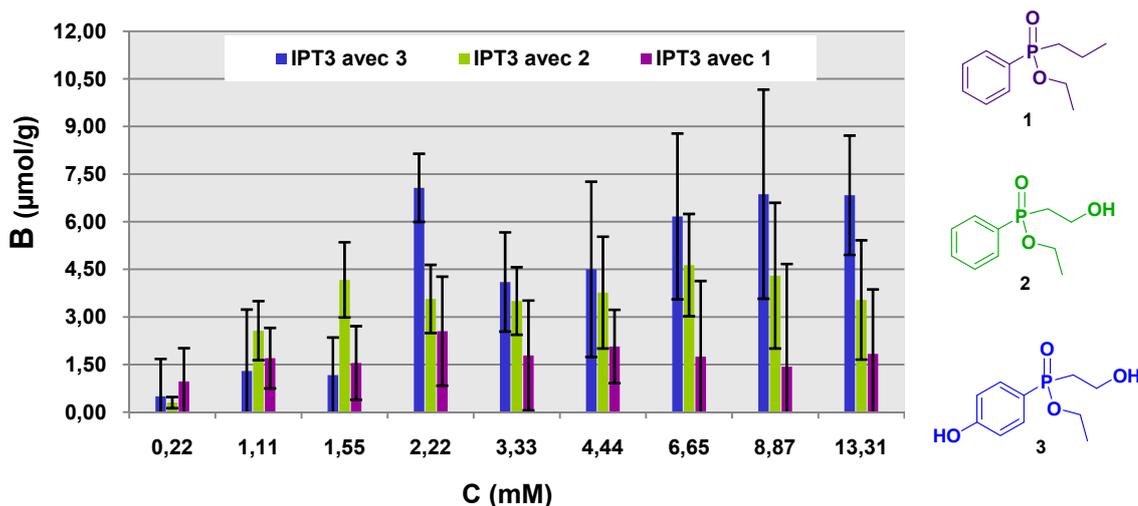


Figure 37. Reconnaissance moléculaire spécifique (**B**) des phosphinate **1-3** avec le polymère imprimé **IP_{T3}** à différentes concentrations initiales (**C**).

À partir d'une concentration initiale de substrat **3** de 2.22 mM, le polymère imprimé **IP_{T3}** montre une augmentation de la sélectivité pour **3**. Notons que le substrat **2** par rapport à **3**, est reconnu avec un moins bon affinité par le polymère **IP_{T3}**. Cela peut s'expliquer par le nombre d'interactions hydrogènes possibles entre **2** et **IP_{T3}**. Ainsi, la reconnaissance moléculaire de **1** reste faible dans toute la gamme de concentration étudiée. Comme pour les autres polymères imprimés **IP_{T1}** et **IP_{T2}**, les facteurs de sélectivité pour le polymère imprimé **IP_{T3}** ont été calculés et sont représentés dans le tableau 8, entrée 3.

À partir des valeurs des facteurs de sélectivité calculés pour les polymères **IP_{T2}** et **IP_{T3}**, nous pouvons constater que l'augmentation du nombre de fonctions acides carboxyliques dans les sites d'interaction du polymère imprimé, entraîne une amélioration de la sélectivité entre les analytes testés **1-3**. Cette augmentation comporte aussi une amélioration de sélectivité entre les phosphinates **2** et **3**. En effet, le facteur de sélectivité obtenu avec le polymère imprimé **IP_{T3}** est plus importante que celle obtenue avec le polymère **IP_{T2}** (pour **IP_{T2}** $\alpha_{2,3} = 1.9$ tandis que pour **IP_{T3}** $\alpha_{3,2} = 2.7$, Tableau 8). De plus, le polymère imprimé **IP_{T3}** montre une excellente discrimination à l'égard de l'analyte hydrophobes **1** ($\alpha_{3,1} = 28.5$), confirmant ainsi que la différence dans le caractère hydrophobe entre les analytes (pour l'analyte **1** $\log P = 2.424$ alors que pour l'analyte **3** $\log P = 0.3334$) joue un rôle important pour une meilleure reconnaissance avec un polymère à caractère plus hydrophile (**IP_{T3}** contient en effet deux fonctions acides au sein des sites d'interaction).

5.10. Test de reconnaissance du polymère imprimés IP_{T1} avec l'analyte **4**

Le polymère imprimé IP_{T1} et le polymère de contrôle CP_{T1} ont aussi été testés dans la complexation du phosphinate **4** (Figure 38).

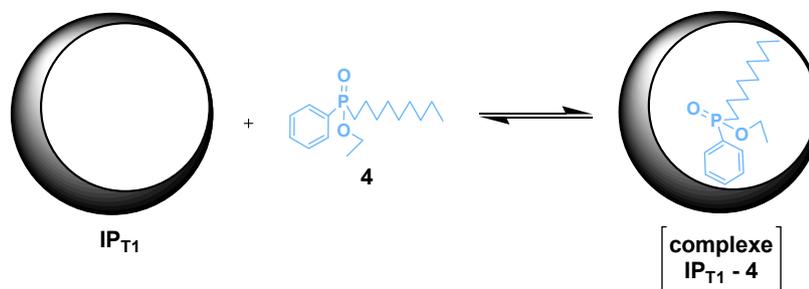


Figure 38. Complexation de l'analyte phosphoré **4** par le polymère imprimé IP_{T1} .

Le phosphinate **4** a été synthétisé dans le but d'augmenter la reconnaissance moléculaire avec le polymère imprimé IP_{T1} , ayant les sites d'interactions les plus hydrophobes. En effet, ce phosphinate **4**, présente la même longueur de chaîne aliphatique (C_9) que celle du template **T1** (Figure 19, page 43), ayant servi pour préparer le polymère imprimé IP_{T1} . La forme structurale de ce phosphinate **4** est donc similaire à celle des sites de reconnaissance induits par le template **T1**, au cours de l'impression moléculaire du polymère imprimé IP_{T1} . De plus, l'ajout d'une chaîne aliphatique plus longue augmente le caractère hydrophobe de la molécule ($\log P = 5.588$), ce qui devrait augmenter l'affinité de **4** avec les sites de reconnaissances du polymère hydrophobe IP_{T1} . Les résultats des tests de complexation sont représentés dans l'historgramme de la figure 39. Nous avons également indiqués les résultats de reconnaissance moléculaire précédents obtenus pour le phosphinate **1** avec le polymère IP_{T1} , pour avoir une comparaison entre les deux phosphinates **1-4**.

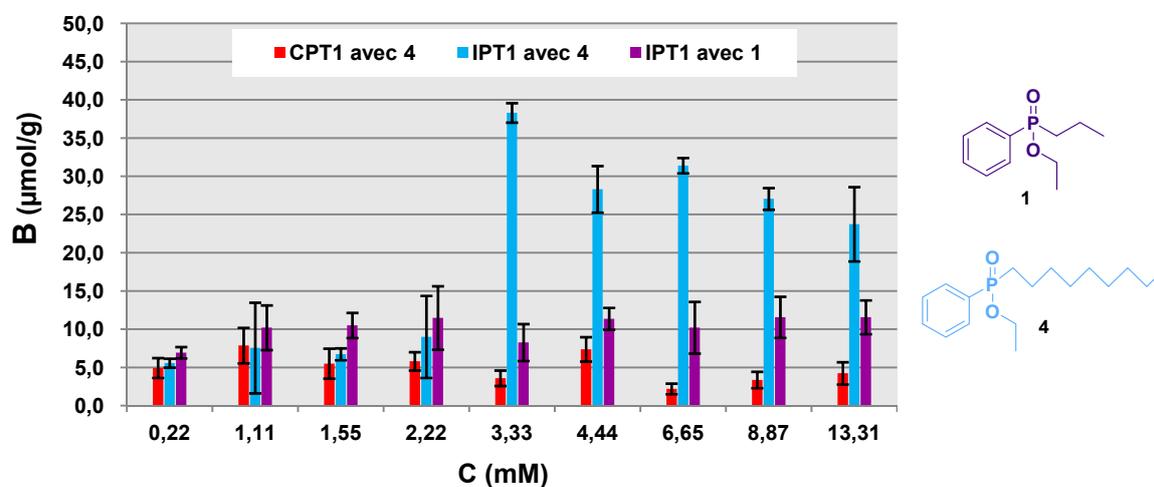


Figure 39. Reconnaissance moléculaire spécifique (**B**) du phosphinate **3** avec le polymère imprimé IP_{T3} et le polymère de contrôle CP_{T3} à différentes concentrations initiales (**C**).

Les valeurs de reconnaissance moléculaire sont fortement influencées par la concentration initiale du phosphinate **4**, tandis que, pour l'analyte **1**, la valeur reste quasiment constante avec l'augmentation de la concentration (Figure 39). Entre les deux valeurs de concentrations 0.22 et 2.22 mM, le polymère **IP_{T1}** ne présente aucune sélectivité entre les analytes **1** et **4**, mais à partir de la valeur de 3.33 mM, la sélectivité devient très importante (pour **IP_{T1}** $\alpha_{4,1} = 4.9$ à la concentration de 13.31 mM). Le polymère imprimé **IP_{T1}** présente une affinité élevée avec l'analyte **4** à forte concentration initiale de phosphinate **4**. La reconnaissance maximale est de 38.3 ± 2.0 $\mu\text{mol/g}$ à la concentration initiale de substrat de 3.33 mM, correspondant à 94% de la capacité expérimentale de fixation (40.9 $\mu\text{mol/g}$). Initialement, nous avons pensé que cette remarquable augmentation dans la complexation du phosphinate **4** était due à aux fortes interactions non-spécifiques avec le polymère hydrophobe. Le polymère de contrôle **CP_{T1}** en revanche, n'a pas montré de fortes affinités avec le phosphinate **1** dans toute la gamme de concentrations étudiées (4.2 ± 2.0 $\mu\text{mol/g}$ à la concentration de 13.31 mM). Le facteur d'impression **I** calculé à la concentration de 13.31 mM est de 5,7. L'ensemble de ces résultats intéressants, reproduits trois fois avec deux batch différents de polymère imprimé **IP_{T1}**, révèle qu'une augmentation du caractère hydrophobe de l'analyte **4** avec une meilleure complémentarité de forme entre le phosphinate **4** et les cavités du polymère imprimé **IP_{T1}**, permet d'obtenir une meilleure capacité et une meilleure sélectivité.

5.11. Application des polymères imprimés **IP_{T1-T3}**

À ce jour, la plupart des polymères imprimés à l'aide de templates phosphorés, trouve la plus grande utilisation dans la conception de catalyseurs pour les réactions d'hydrolyse d'esters carboxyliques⁸⁰, ainsi que dans la réalisation d'un système catalytique pour réduction des cétones^{104,107,108}. Les résultats importants, en terme de capacité et de la sélectivité obtenus avec les polymères imprimés **IP_{T1-T3}**, ils nous ont encouragé dans l'étude préliminaire de ces derniers comme catalyseurs dans les réactions de réduction asymétrique de cétones prochirales.

6. Application de polymères imprimés IP_{T1-T3} comme catalyseurs asymétriques

6.1. Introduction: chiralité et catalyse asymétrique

La chiralité est une propriété géométrique qui caractérise le fait qu'un objet et son image dans un miroir ne sont pas identiques. À la fin des années 1840, le scientifique français Louis Pasteur, en étudiant des cristaux de tartrate de sodium et d'ammonium, comprit que ce dérivé était composé d'un mélange de deux espèces de cristaux, image l'une de l'autre. Après séparation à la pince de ces cristaux, il a constaté que chacun d'eux avait un pouvoir rotatoire égal et de sens opposé⁹⁷. Deux molécules possédant des structures images miroir l'une de l'autre, non superposables sont nommées énantiomères (Figure 40).

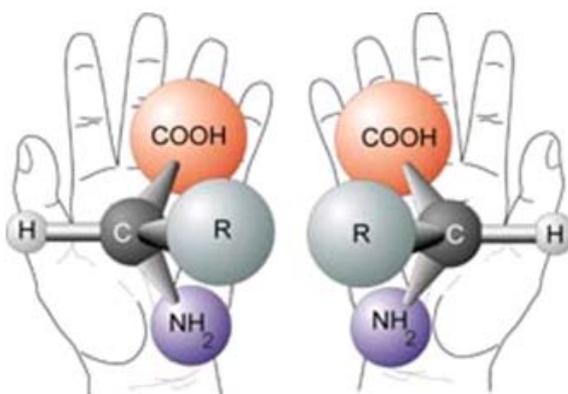


Figure 40. Exemple des deux énantiomères d'un acide aminé.

Dans la majorité des cas, l'asymétrie d'une molécule est bâtie autour d'un ou plusieurs atomes de carbone hybridés sp^3 et comportant quatre substituants différents (Figure 40). Ainsi, d'autres atomes tels que le soufre, l'azote, le silicium ou le phosphore peuvent également donner naissance à des composés chiraux⁹⁸.

La géométrie particulière apportée par ces centres stéréogènes confère aux molécules organiques leurs propriétés biologiques. De plus, chaque stéréoisomère d'une même molécule, peut avoir des propriétés biologiques très différentes voire même opposées (Figure 41). L'exemple le plus flagrant étant celui où un énantiomère se révèle toxique pour l'organisme alors que l'autre possède une activité bénéfique, comme dans le cas tragique du Thalidomide dans les années 1960⁹⁹. C'est pour ces raisons que 40% des médicaments mis sur le marché en 2000 possédaient une molécule énantiopure comme principe actif¹⁰⁰.

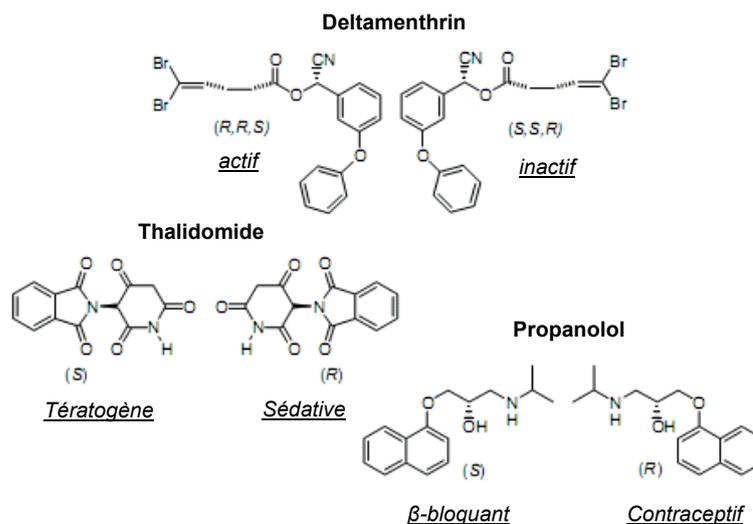


Figure 41. Exemples d'énantiomères possédant des activités biologiques distinctes.

Un des défis de la chimie organique de synthèse moderne est de contrôler la géométrie de chacun des centres chiraux d'une molécule lors de sa production. De ce fait, il est fondamental de développer des outils permettant de concevoir des molécules optiquement pures. A cet égard, la catalyse asymétrique est une méthode de choix pour synthétiser des molécules organiques chirales. L'attribution du Prix Nobel de Chimie en 2001 à Knowles, Noyori et Sharpless, trois pionniers dans ce domaine, a récompensé les découvertes en catalyse asymétrique, mais aussi leurs applications dans divers secteurs industriels¹⁰¹.

Ce développement remarquable de catalyse énantiosélective a stimulé davantage, l'intérêt pour les propriétés fascinantes des surfaces chirales et leurs applications en catalyse hétérogène asymétrique¹⁰². Plusieurs stratégies ont été développées pour la conception de catalyseurs solides énantiosélectifs, dans le but de combiner l'activité catalytique à un contrôle stéréochimique de la réaction. Parmi ces approches, seule la technique de modification des surfaces métalliques chirales, obtenue par adsorption d'un composé chiral, appelé communément modificateur, présente un potentiel réel en synthèse¹⁰³. Cependant, la technique semble être excessivement chère en vue d'une éventuelle application industrielle. Dans ce contexte l'utilisation de polymères imprimés en surface comme catalyseurs dans les processus de catalyse énantiosélective, peut constituer une innovation importante.

Comme indiqué précédemment, les polymères imprimés préparés selon différents protocoles sont des matériaux capables de reconnaître sélectivement des analytes. Cette capacité de reconnaissance peut être couplée à une transformation chimique comme pour les enzymes ou les anticorps, également employées comme catalyseurs¹⁰⁴. En effet, il a été rapporté que, ces derniers sont

capables de stabiliser l'état de transition (TS) d'une réaction comme par exemple d'hydrolyse d'ester¹⁰⁵. Dans ce contexte, différentes types d'approches ont été développées pour la préparation de polymères imprimés employés en catalyse, avec des molécules templates analogues à l'état de transition de la réaction à catalyser (TSA). En particulier, le principe a été beaucoup étudié et validé pour des réactions d'hydrolyse d'esters, où l'analogie de l'état de transition (le template) est une molécule contenant un atome de phosphore tétraédrique¹⁰⁵.

Par ailleurs, des exemples de réactions d'oxydations et de transfert hydrogène basés sur l'état de transition et catalysées par les polymères imprimés sont reportés dans la littérature¹⁰⁴.

6.2. MIPs comme catalyseur dans la réduction des cétones

Le groupe de Lemaire a étudié la réduction de cétones prochirales par transfert d'hydrogène en utilisant comme catalyseur un polymère imprimé avec un atome de Rh(I)¹⁰⁶. Les auteurs ont également étudié la réaction de réduction en phase homogène en utilisant le même système catalytique, pour comparer l'efficacité entre la catalyse homogène et hétérogène. Tous les polymères imprimés ont montré une énantiosélectivité plus faible que la réaction en phase homogène. De plus, une faible différence au niveau des excès énantiomériques est observée entre la réaction effectuée avec le polymère imprimé et celle avec le polymère de contrôle.

La réduction catalytique des cétones avec des MIPs contenant des métaux de transition, a également été étudiée par Polborn et Severin¹⁰⁷. L'état de transition proposé pour la réaction de réduction d'une cétone catalysée par du Ru(II) est un état à six centres avec une conformation chaise (Figure 42a). Afin d'obtenir un template polymérisable qui pourrait mimer cette conformation de l'état de transition, les auteurs ont synthétisés un monomère basé sur un complexe ruthénium–phosphinate (Figure 42b), où le phosphinate mime l'état de transition de la réduction de la benzophénone. Puis, ce complexé a été copolymérisé en présence d'EGDMA, en utilisant du chloroforme comme porogène. L'extraction du ligand phosphinate a été optimisée avec une solution 0.1 M de [BnNEt₃]Cl dans le MeOH (Figure 42c). Pour évaluer l'effet d'empreinte lors de la réduction catalytique, un polymère de contrôle a été aussi préparé dans les mêmes conditions mais sans l'utilisation du ligand phosphinate. Le polymère imprimé montre une activité catalytique sept fois plus grande que celle du polymère de contrôle préparé en absence de phosphinate. De plus, Polborn et Severin¹⁰⁷ ont étudié la sélectivité des cavités du polymère imprimé décrit précédemment (Figure 42c). Une meilleure sélectivité lors de la réduction de la benzophénone par rapport à d'autres cétones est observée, en raison de l'effet d'impression du di-aryle phosphinate utilisé pendant la préparation du polymère imprimé.

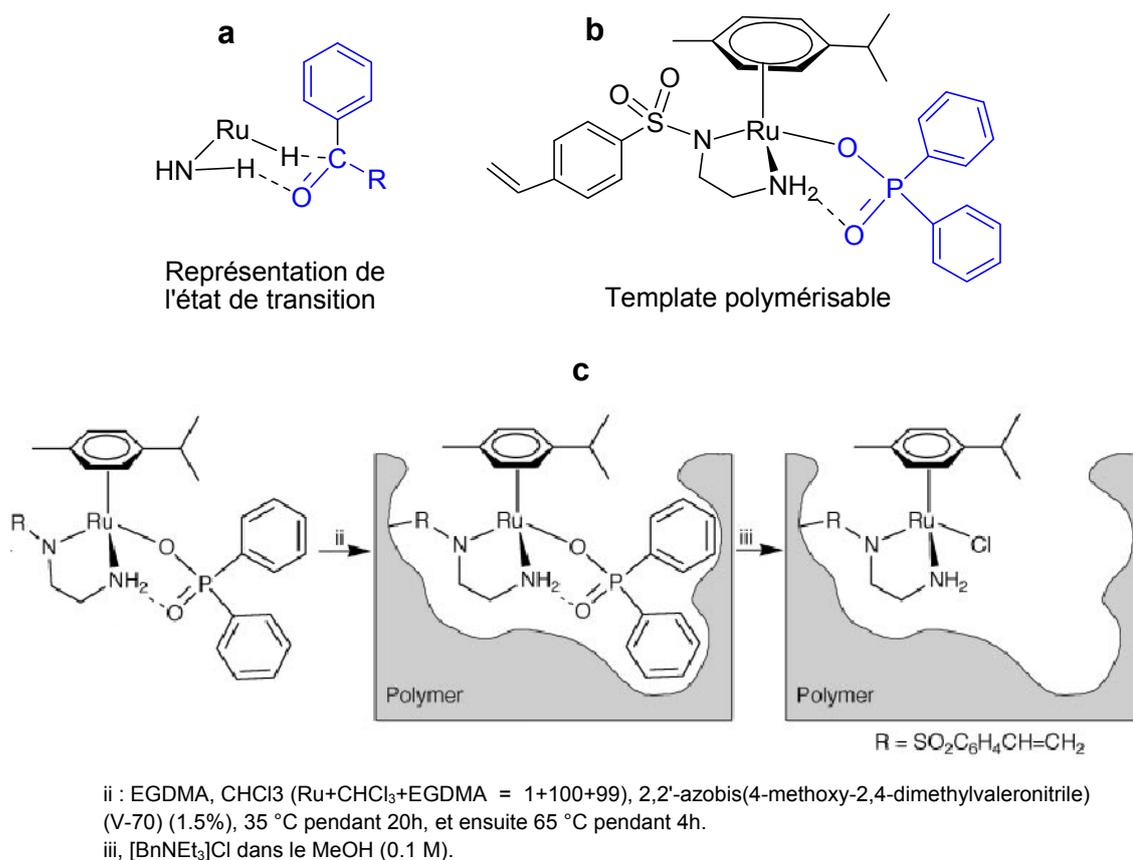


Figure 42. (a) État de transition; (b) Template polymérisable analogue à l'état de transition proposés par Polborn et Severin; (c) Synthèse du polymère imprimé utilisé comme catalyseur dans la réaction de réduction de la benzophénone (d'après la référence 107).

Le même groupe de recherche a utilisé un système catalytique (Ru) comparable au précédent mais en introduisant une chiralité portée par des amines, pour des réactions de réduction asymétrique de cétones prochirales¹⁰⁸. En particulier, leur étude a été focalisée sur la réduction asymétrique de l'acétophénone catalysée par des polymères imprimés préparés avec le template représenté dans la figure 43. Une amélioration de l'activité catalytique combinée à une excellente énantiosélectivité a été observée pour la réduction de l'acétophénone par rapport à d'autres substrats.

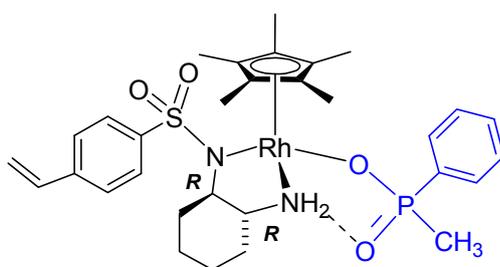


Figure 43. Template polymérisable utilisé pour la préparation du MIP (d'après la référence 108).

Dans ces derniers exemples de réduction catalytique de cétones prochirales, il a été montré que la molécule de phosphore, qui mime l'état de transition de la réaction de réduction d'une cétone par l'hydrogène, est un élément important pour avoir une bonne sélectivité de substrat combiné avec une bonne activité catalytique. À partir de ces résultats et en tenant compte des résultats obtenus précédemment avec les templates phosphorés **T1** et **T2**, nous avons envisagés d'utiliser les polymères imprimés en surface pour la réduction énantiosélective de cétones prochirales.

6.3. Réduction énantiosélective des cétones prochirales

6.3.1. Définition de la chiralité en deux dimensions

Si un composé planaire prochiral tel que l'acétophénone est immobilisé en deux dimensions sur un support solide (une surface métallique, par exemple), deux faces prochirales de la cétone peuvent alors être différenciées: la face *Si* et la face *Re* (Figure 44).

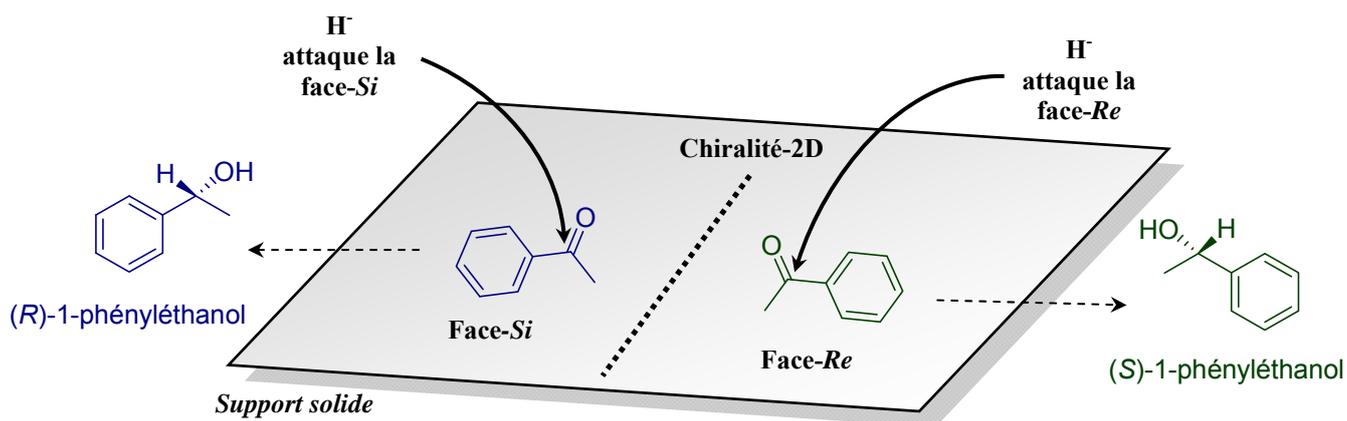


Figure 44. Représentation schématique de la réduction énantiosélective d'un composé planaire prochiral.

Dans cette situation, si un agent de réduction approprié (H^- dans l'exemple de la figure 44) attaque la face-*Si* de la cétone, l'alcool (*R*)-1-phényléthanol est obtenu. De façon similaire, si l'agent de réduction attaque la face-*Re*, l'alcool (*S*)-1-phényléthanol se forme (Figure 44).

Un des objectifs de ce travail est donc de réussir à différencier les deux faces énantiotopiques *Si* et *Re* d'une cétone à la surface de polymères adéquatement imprimés (Figure 45), préparés par la procédure de polymérisation en mini-émulsion optimisée au laboratoire.

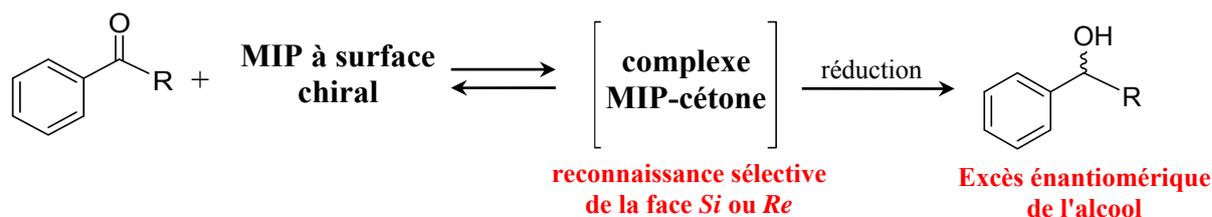


Figure 45. Exemple de réduction énantiosélective d'une cétone avec un polymère imprimé en surface et chiral.

6.3.2. Tentative de conception des polymères imprimés chiraux pour la réduction asymétrique des cétones

Comme point de départ pour la réalisation d'un système sélectif vis-à-vis d'une des deux faces prochirales d'une cétone, nous nous sommes basés sur les résultats obtenus lors des tests de reconnaissance spécifique avec les analytes phosphorés **1-4** (voir partie 5.4, page 56). Les polymères imprimés **IP_{T1-T3}** utilisés pour les tests, ont été préparés à l'aide des templates **T1-T3** contenant un atome de phosphore (V) de géométrie tétraédrique (Figure 46).

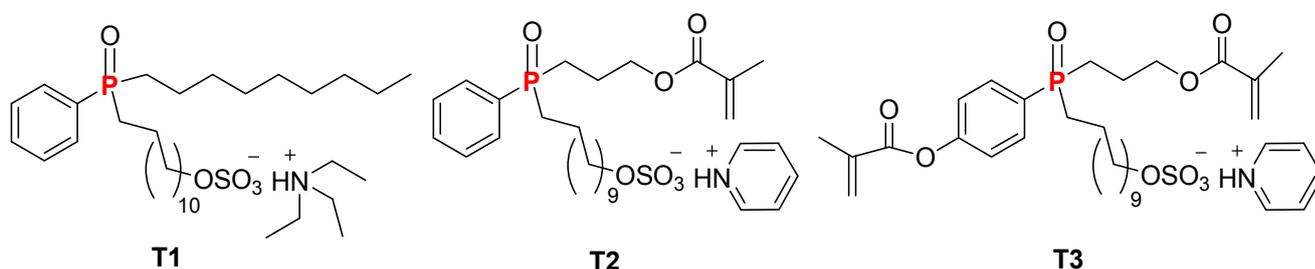


Figure 46. Templates phosphorés **T1-T3** utilisés pour la préparation des polymères imprimés **IP_{T1-T3}**.

Ainsi, nous avons envisagé de synthétiser ces derniers templates avec une chiralité portée par l'atome de phosphore. Par conséquent, après polymérisation et extraction des templates chiraux **T1-T3**, les sites d'affinité obtenus pourraient présenter une cavité chirale permettant, éventuellement de discriminer les deux faces prochirales d'une cétone. En plus d'apporter une information chirale, l'atome de phosphore tétraédrique est un mime de l'état de transition du produit de réduction de la fonction cétone en alcool. Par conséquent les sites de reconnaissance, peuvent avoir un effet stabilisant, permettant de réaliser des transformations catalytiques.

L'objectif idéal visé est schématisé dans la figure 47, où le polymère imprimé permet de discriminer les deux faces d'une cétone et la cavité chirale de participer à la réduction catalytique énantiosélective de la cétone. Le cycle catalytique peut se résumer en trois étapes :

- 1 étape:** reconnaissance et discrimination sélective de la face *Re* ou *Si* de la cétone.
- 2 étape:** réduction de la cétone à l'intérieur des sites d'interactions avec un agent de réduction extérieur (hydrure).
- 3 étape:** extraction du produit chiral de réduction et récupération du polymère imprimé, qui peut être ensuite réutilisé dans un autre cycle catalytique (Figure 33).

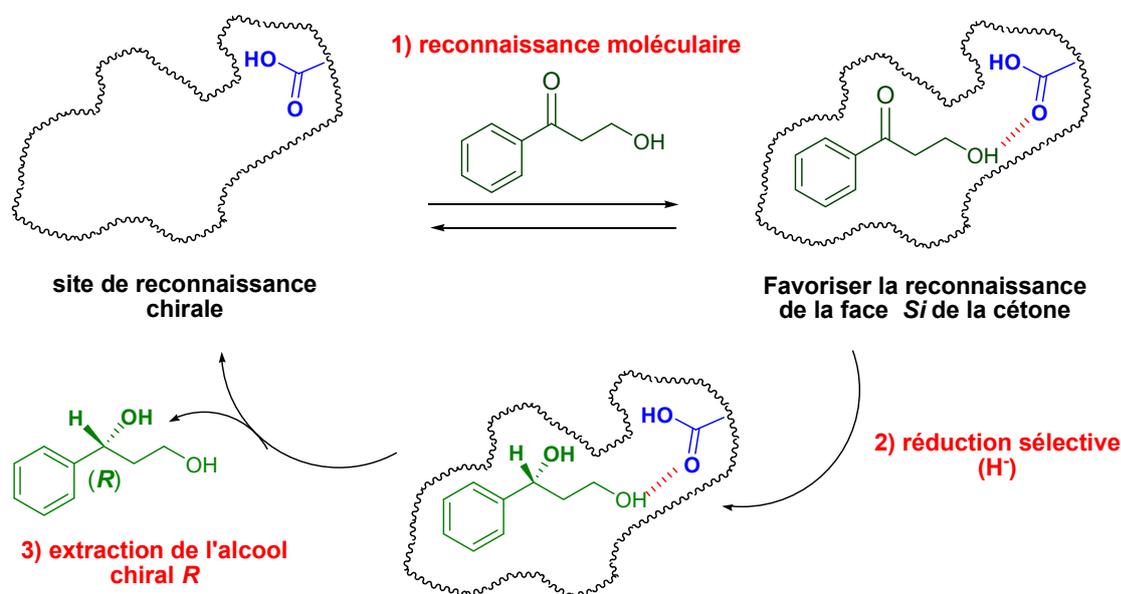
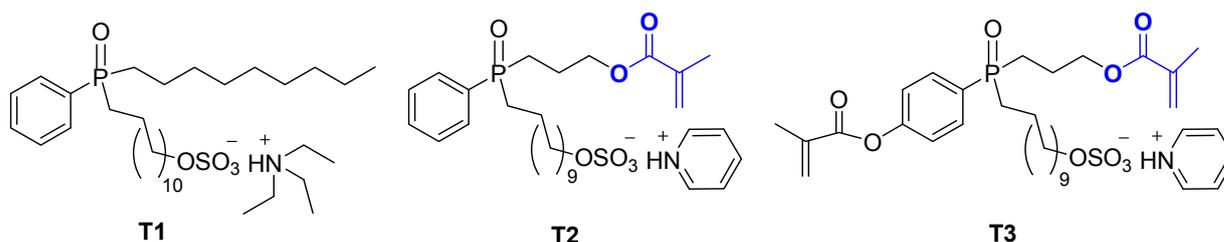


Figure 47. Cycle catalytique de polymères imprimés pour la réduction d'une cétone.

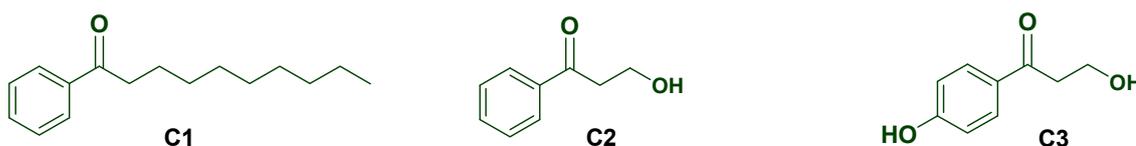
La réalisation d'un tel objectif, nécessite tout d'abord une bonne reconnaissance du substrat (cétone) par la matrice polymérique. Ainsi, avant d'entreprendre la synthèse des templates chiraux, nous avons effectué une série de tests afin de vérifier si les polymères imprimés **IP_{T1-T3}** avaient la capacité de reconnaître sélectivement une cétone, par rapport au polymère de contrôle **CP_{T1-T3}**. Les cétones utilisées (Figure 48b) dans les tests de reconnaissance possèdent une structure proche des templates phosphorés **T1-T3** (Figure 48a) utilisés pour faire les empreintes. Comme dans le cas de la reconnaissance moléculaire des analytes phosphorés **2-4** par les polymères imprimés **IP_{T1-T3}** respectivement (Figure 48c), les cétones **C1-C3** pourront être également complexées à l'intérieur des cavités des polymères imprimés **IP_{T1-T3}** (Figure 48d). Dans le cas la cétone **C1** la reconnaissance sera assurée par simple interaction hydrophobe. Autrement, dans le cas des cétones **C2-C3**, une ou deux liaisons hydrogène seront impliquées respectivement (Figure 48d).

Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur la reconnaissance des cétones **C1-C2** par les polymères imprimés **IP_{T1-T2}** et par les polymères de contrôles respectifs **CP_{T1-T2}**.

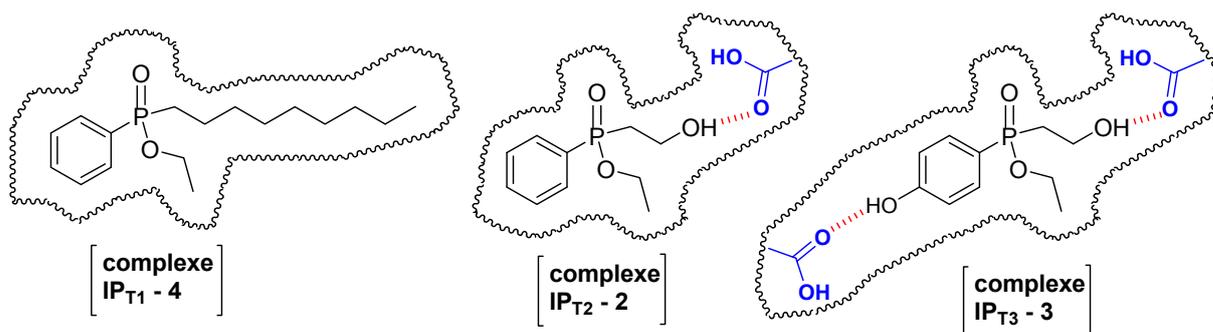
a. Structure des template phosphorés T1-T3



b. Structure des cétones C1-C3



c. Représentation schématique de la reconnaissance moléculaire des phosphinate 2-4



d. Représentation schématique de la reconnaissance moléculaire idéalisée des cétones C1-C3

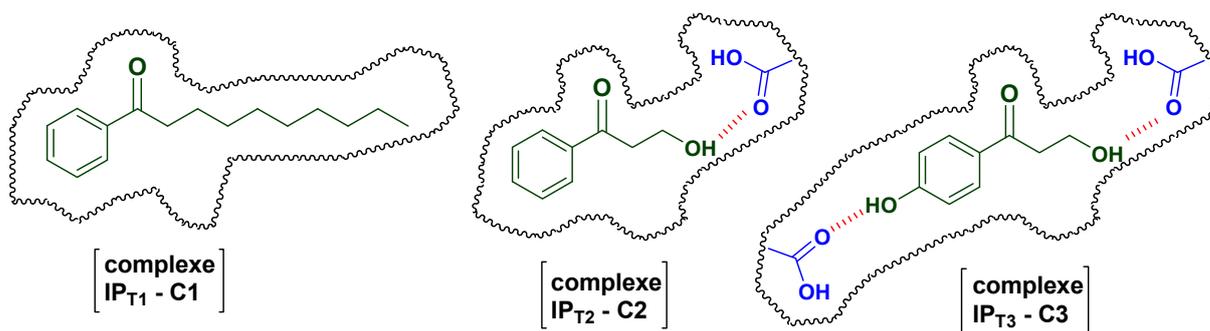


Figure 48. Structure des templates T1-T3 et des cétones C1-C3 avec la représentation schématique de leur reconnaissance moléculaire dans les sites des polymères imprimés IP_{T1-T3}.

6.4. Tests de reconnaissance moléculaire des cétones C1 et C2 par les polymères imprimés IP_{T1} et IP_{T2}

L'aptitude respective des polymères imprimés IP_{T1} et IP_{T2} à reconnaître les cétones C1 et C2 a été mesurée par la méthode du «batch process», avec la même procédure que celle utilisée pour les analytes phosphorés 1-4 (voir partie 5.4). Les résultats sont représentés dans les histogrammes de la figure 49.

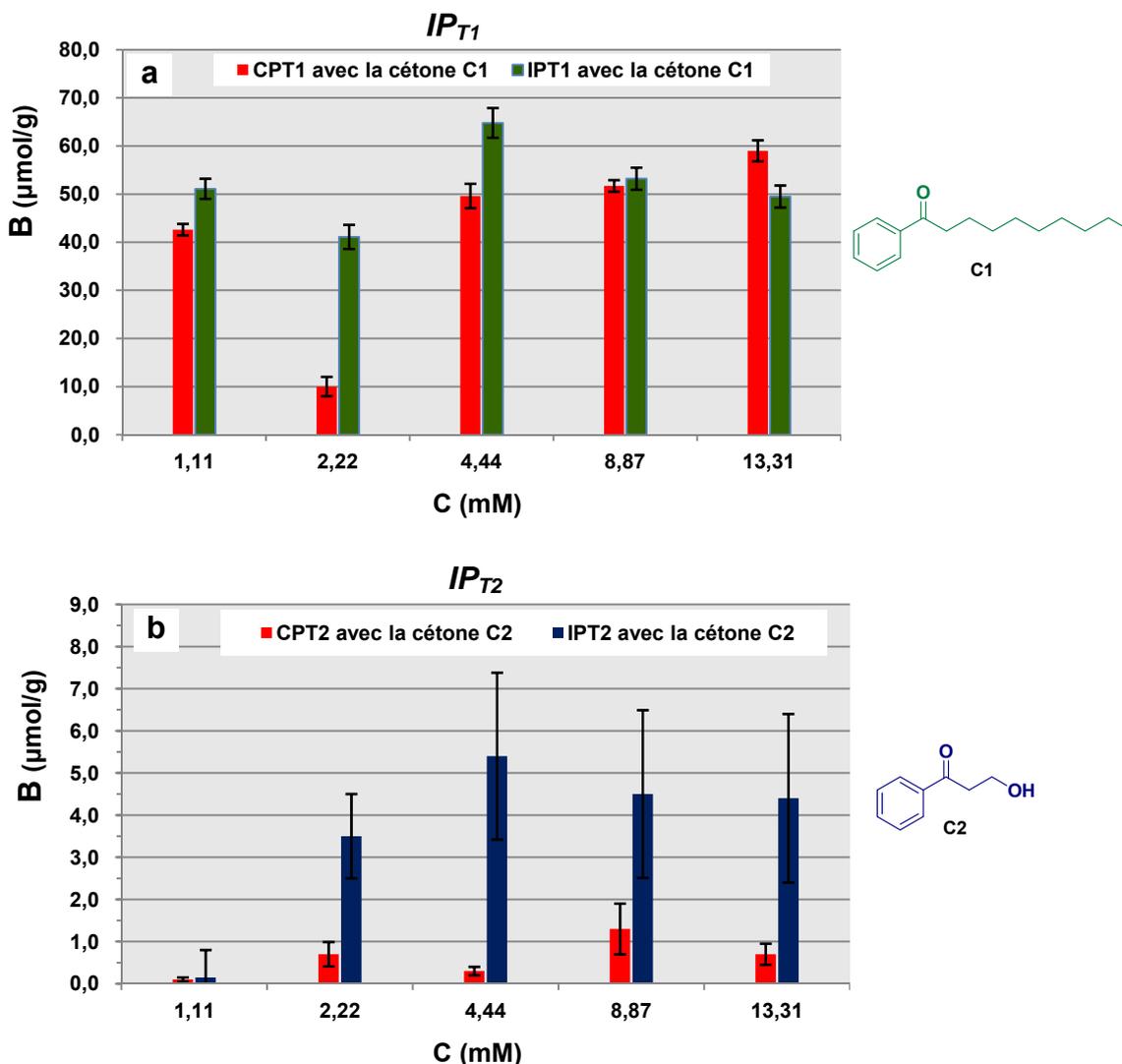


Figure 49. Reconnaissance moléculaire (B) de la cétone C1 avec le polymère imprimé IP_{T1} et le polymère de contrôle CP_{T1} (a) et de la cétone C2 avec le polymère imprimé IP_{T2} et le polymère de contrôle CP_{T2} (b).

Le polymère IP_{T1} montre une capacité pour la cétone C1 supérieure à la capacité expérimentale précédemment estimée à 40,9 µmol/g (Figure 49a), ce qui peut s'expliquer par l'existence de fortes interactions non-spécifiques entre le polymère IP_{T1} et l'analyte C1. Ces interactions non-spécifiques sont confirmées par la forte affinité que la cétone C1 possède pour le polymère de contrôle CP_{T1}. Le polymère IP_{T1} est incapable de reconnaître sélectivement la cétone C1 par rapport au polymère

de contrôle CP_{T1} et par conséquent il ne convient pas pour la poursuite des études sur la réduction de cétone. Le résultat précédent n'est pas totalement surprenant si on considère la nature des polymères IP_{T1} et CP_{T1} . En fait, les polymères sont exclusivement composés de styrène et de divinylbenzène, qui conduisent à la formation d'un matériau très hydrophobe. La cétone C1 étant hydrophobe, et peut donc interagir de manière non-spécifique avec la surface des nanosphères imprimées IP_{T1} . La situation change lorsque l'on considère le polymère imprimé IP_{T2} et le polymère de contrôle CP_{T2} dans la reconnaissance moléculaire de la cétone C2 (Figure 49b). Dans ce cas, la cétone C2 présente une faible affinité pour le polymère de contrôle CP_{T2} et la reconnaissance moléculaire n'excède pas $1.2 \pm 0.6 \mu\text{mol/g}$. De façon différente, le polymère imprimé IP_{T2} atteint une reconnaissance de $5.4 \pm 2.0 \mu\text{mol/g}$ à la concentration initiale de cétone C2 de 4.44 mM (Figure 49b), correspondante à 61% de la capacité expérimentale (précédemment estimé à $8.8 \mu\text{mol/g}$). Les sites de reconnaissance de ce dernier polymère IP_{T2} sont capables de reconnaître spécifiquement une cétone C2 par rapport au polymère de contrôle CP_{T2} , et pourrait être envisagé dans les prochaines études de réduction de la cétone C2 . Nous sommes également portés à souligner l'importance de ce dernier résultat. Nous avons montré que dans une cavité initialement préparés pour complexer le phosphinate **2**, il est possible également de reconnaître sélectivement une cétone qui possède une conformation planaire sp^2 .

Après avoir vérifié la sélectivité du polymère imprimé IP_{T2} pour la cétone C2 , nous avons cherché à optimiser la capacité expérimentale. D'après les tests de reconnaissance moléculaire précédents, la capacité du polymère imprimé IP_{T2} pour la cétone C2 est de 45% par rapport à la capacité expérimentale calculée par analyse élémentaire du phosphore. Cela suggère qu'il y a des sites à l'intérieur de la matrice polymérique qui n'ont pas d'affinité pour la cétone C2 , ou probablement qui ne sont pas accessibles pour la même cétone. Une autre possibilité peut être que les interactions à l'intérieur de l'empreinte ne sont pas aussi fortes pour permettre d'obtenir des capacités expérimentales importantes. Pour cette raison que nous avons envisagé la synthèse d'un polymère imprimé dans les mêmes conditions de polymérisation que IP_{T2} , en ajoutant de l'acide méthacrylique comme monomère fonctionnel. Ce dernier peut interagir par liaisons hydrogène avec le template **T2** avant polymérisation, pour donner des fonctions acides carboxyliques supplémentaires à l'intérieur des sites de reconnaissance du polymère imprimé. Nous allons expliquer plus en détail la synthèse de ce polymère.

6.5. Préparation d'un polymère imprimé pour la reconnaissance moléculaire de la cétone C2

Dans la plupart des travaux décrits dans la littérature à propos de la préparation des polymères imprimés selon une approche non-covalente (voir partie 1.3.2, page 16), l'acide méthacrylique est

utilisé pour donner des liaisons hydrogènes réversibles, avec le template, dans le complexe de pré-polymérisation^{1,25,26}. Après polymérisation de ce dernier et extraction du template, des fonctions acides carboxyliques seront laissées dans les cavités du polymère imprimé. L'utilisation d'une certaine quantité d'acide méthacrylique, pendant la copolymérisation du template **T2**, peut donc entraîner la disposition des fonctions acide carboxylique dans les cavités du polymère imprimé **IP_{T2}** (Figure 50). Nous avons supposé que l'acide méthacrylique peut se lier par liaison hydrogène à l'oxygène du phosphore du template **T2**, dans le complexe de pré-polymérisation (Figure 50). Ensuite ce complexe est copolymérisé avec le styrène et le divinylbenzène (DVB) dans les conditions de mini-émulsion. Après extraction du template **T2** par rupture de la liaison ester, les nanosphères imprimées **IP_{MAA}** formées auront deux fonctions acides carboxyliques à l'intérieur des sites de reconnaissance (Figure 50). L'une dérive de l'interaction de l'acide méthacrylique avec le template **T2** (approche non-covalente) et l'autre de la rupture de la fonction méthacrylique du template **T2** (approche semi-covalente, Figure 50).

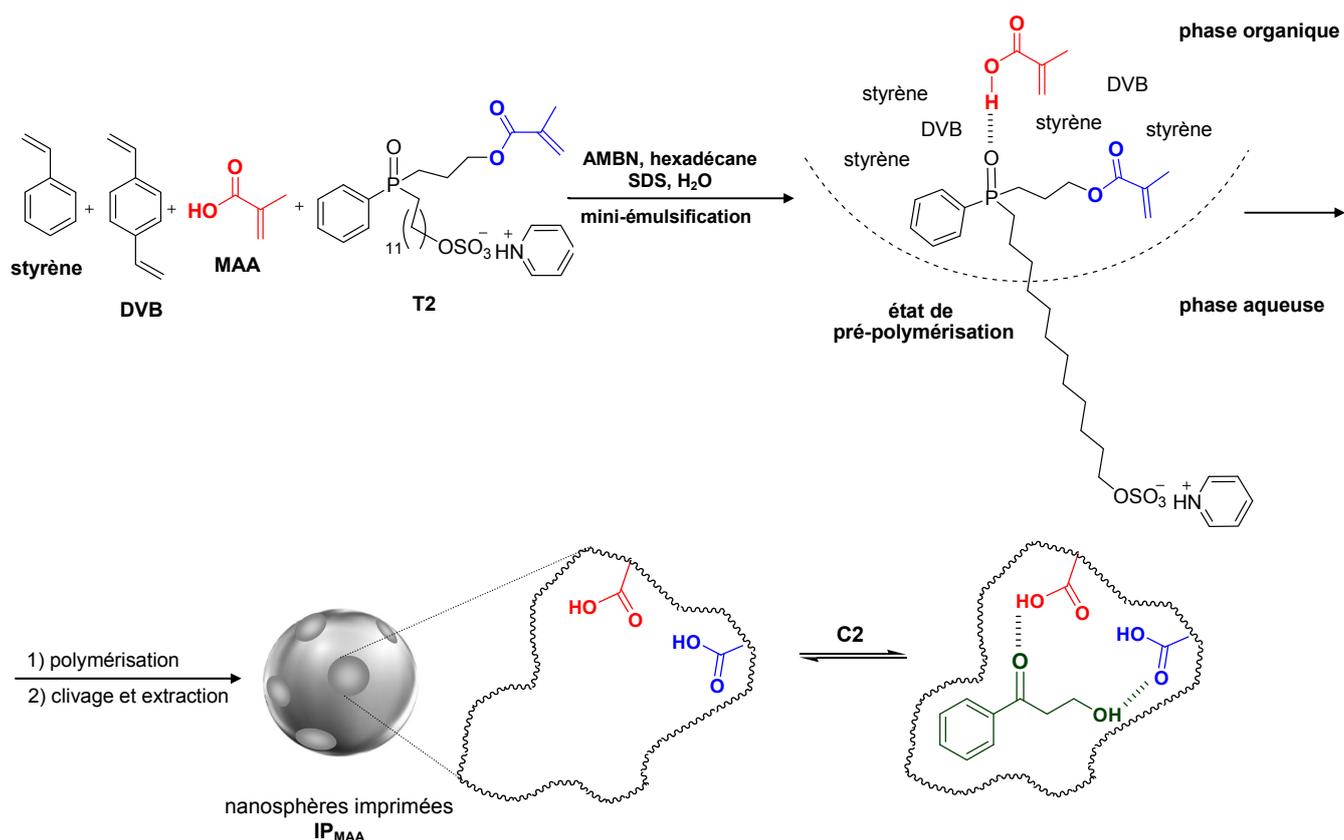


Figure 50. Représentation schématique de la polymérisation du template **T2** en présence d'acide méthacrylique (**MAA**).

Un polymère de contrôle (CP_{MAA}) a été aussi préparé avec la même quantité d'acide méthacrylique, mais en absence du template **T2**. Ce dernier nous permettra de mettre en évidence l'effet d'empreinte des nanosphères.

Par ailleurs, une approche analogue à celle proposée ci-dessus a été rapportée en 1999 par Vulfson et Whitcombe⁹⁴. Les auteurs ont préparé un polymère imprimé par polymérisation en masse, avec comme template un tri-peptide polymérisable et comme un monomère fonctionnel la vinyl-pyridine. Le polymère imprimé a été testé dans la discrimination de différentes séquences de tri-peptide dans un mélange acétonitrile / eau. Ils ont démontré que le polymère a une plus grande affinité pour la séquence du tri-peptide utilisé lors de l'impression moléculaire, avec une constante de dissociation K_D de $113 \pm 47 \mu\text{M}$ et une capacité expérimentale de $4.1 \pm 1.2 \mu\text{mol/g}$.

Les quantités de tous les composants du mélange de polymérisation que nous avons utilisées, ainsi que le rapport stœchiométrique entre les monomères sont représentés dans le tableau 10. Il est important de noter que pour des raisons de solubilité dans l'eau, et pour déplacer l'équilibre de complexation template-monomère fonctionnel vers la formation du complexe de pré-polymérisation, un excès de 5 équivalents d'acide méthacrylique par rapport au template **T2** est utilisé conformément à ce qui a été rapporté dans la littérature^{20,21,77b}.

Tableau 10. Formulation du polymère imprimé IP_{MAA} .

Composants	Pourcentage en masse (%)	Quantités utilisées	Rapport stœchiométrique des réactifs polymérisables
Styrène		1.1 ml, 9.61 mmol	170
DVB		0.28 ml, 1.99 mmol	34
Acide méthacrylique (MMA)	16.7	25 μl , 0.29 mmol	5
Template T2		34 mg, 0.057 mmol	1
Hexadécane	0.72	75 μl , 0.26 mmol	
AMBN	0.16	15 mg, 0.078 mmol	
SDS	0.64	51 mg, 0.21 mmol	
H ₂ O	81.8	6.5 ml	

Avant d'être testé en tant que récepteur pour la molécule de cétone **C2**, le polymère imprimé IP_{MAA} a été caractérisé par microscopie électronique à transmission. Les photographies MET (Figure 51) montrent que les particules sphériques sont partiellement agrégées et homogènes en taille. Leur diamètre est compris entre 50 et 100 nm.

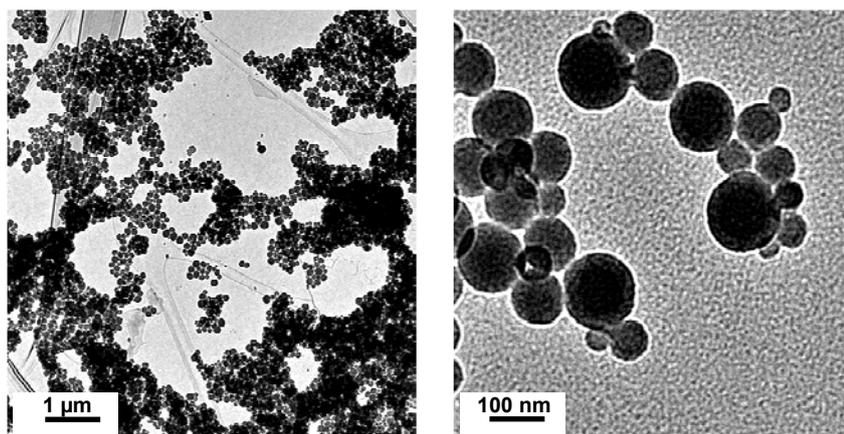


Figure 51. Clichés MET du polymère imprimé IP_{MAA} après extraction du template.

6.5.1. Tests de reconnaissance moléculaire du polymère IP_{MAA} et CP_{MAA} avec la cétone C2

L'affinité des polymères imprimés IP_{MAA} et du contrôle CP_{MAA} avec la cétone C2 a été mesurée avec la procédure du batch process utilisée pour les analytes phosphorés (voire partie 5.4) et pour évaluer l'affinité du polymère imprimé IP_{T2} pour la cétone C2. Les résultats sont rapportés dans figure 52. Nous avons également indiqués les résultats de reconnaissance moléculaire précédents obtenus pour la cétone 2 avec le polymère IP_{T2} , pour avoir une comparaison entre les deux polymères imprimés IP_{MAA} et IP_{T2} .

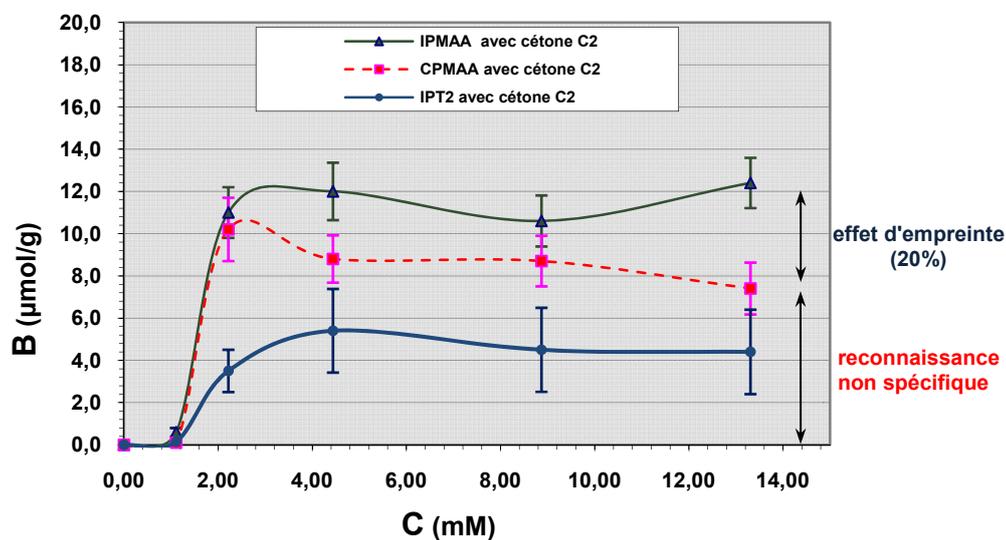


Figure 52. Isotherme de binding de la cétone C2 avec le polymère imprimé IP_{MAA} et le polymère de contrôle CP_{MAA} à différents concentrations initiale d'analyte C2 (C).

La première observation intéressante que nous avons relevé, est l'allure similaire des courbes de saturation du polymère imprimé IP_{MAA} et du contrôle CP_{MAA} (Figure 52). Cette tendance assez rare

pour un polymère de contrôle, du fait que généralement la reconnaissance non spécifique n'atteint pas un niveau de saturation mais elle est linéaire^{69b}. Comme nous nous y attendions, l'augmentation de fonctions acides à l'intérieur des sites d'affinité, rend le polymère **IP_{MAA}** plus performant au niveau de la capacité que le polymère **IP_{T2}**. La reconnaissance de la cétone **C2** par le polymère imprimé **IP_{MAA}** est en moyenne deux fois plus importante que celle obtenue avec le polymère imprimé **IP_{T2}** (Figure 52). Malheureusement, la présence d'acide méthacrylique dans le polymère de contrôle **CP_{MAA}** provoque une forte augmentation des interactions non spécifiques avec la cétone **C2** (Figure 52, courbe rouge), bien qu'un écart de 20% par rapport au polymère imprimé **IP_{MAA}**, est observé. Cette forte reconnaissance non spécifique de la cétone **C2**, sera prise en compte lors des essais de la réduction asymétrique, compte tenu que la cétone reconnue liée de manière aléatoire sur les nanoparticules de polymère, ne conduira certainement pas à un excès énantiomérique.

Après avoir démontré les propriétés de complexation de la cétone **C2** par les polymères imprimés **IP_{T2}** et **IP_{MAA}** préparés avec le template tétraédrique **T2**, nous nous sommes consacrés dans un premier temps à la synthèse du template **T2** chiral, qui sera ensuite utilisé pour la préparation du polymère imprimé **IP_{ch}** chiral.

6.6. Synthèse du template **T2_{ch}** chiral

Des travaux menés par le groupe de Khier on permis le développement d'une méthodologie simple et intéressante pour la synthèse d'oxydes de phosphine chiraux¹⁰⁹. La première étape (Figure 53) consiste à traiter le chlorure de méthyle-phényle phosphinate avec un alcool secondaire chiral, le diacétone-D-glucose (DAG). La diastéréosélectivité de la réaction dépend de la nature du solvant, de la température, mais surtout de la base utilisée. La réaction réalisée dans le toluène, à 0 °C et avec 10 équivalents de triéthylamine, permet d'obtenir avec un rendement quasi quantitatif le phosphinate d'ester correspondant, dans un rapport *Sp/Rp* de 97:3 (Figure 53). Inversement, quand la réaction est effectuée avec de la pyridine, employée comme base, le rapport diastéréomérique est inversé (rapport *Sp/Rp* de 30:70). Ensuite, le phosphinate obtenu après réaction avec le DAG, est traité avec un réactif de Grignard, dans des conditions très douces, pour obtenir l'oxyde de phosphine chiral correspondant, avec inversion total de la configuration (Figure 53). Ainsi, nous avons envisagé une voie de synthèse basée sur cette méthode pour la préparation du template **T2** chiral.

La suite de la synthèse est similaire à la préparation de la molécule **T2** racémique. Tout d'abord, le phosphinate chiral (**S**)-**29** est traité avec du bromure d'allyl-magnésium pour obtenir l'oxyde de phosphine chiral correspondant (**R**)-**30**, avec inversion total de la configuration (Schéma 9). Il est à noter que la réaction a été effectuée dans le THF et non dans le toluène comme rapporté par Khair¹⁰⁹, puisque le rendement était beaucoup plus faible, de l'ordre de 10-20%.

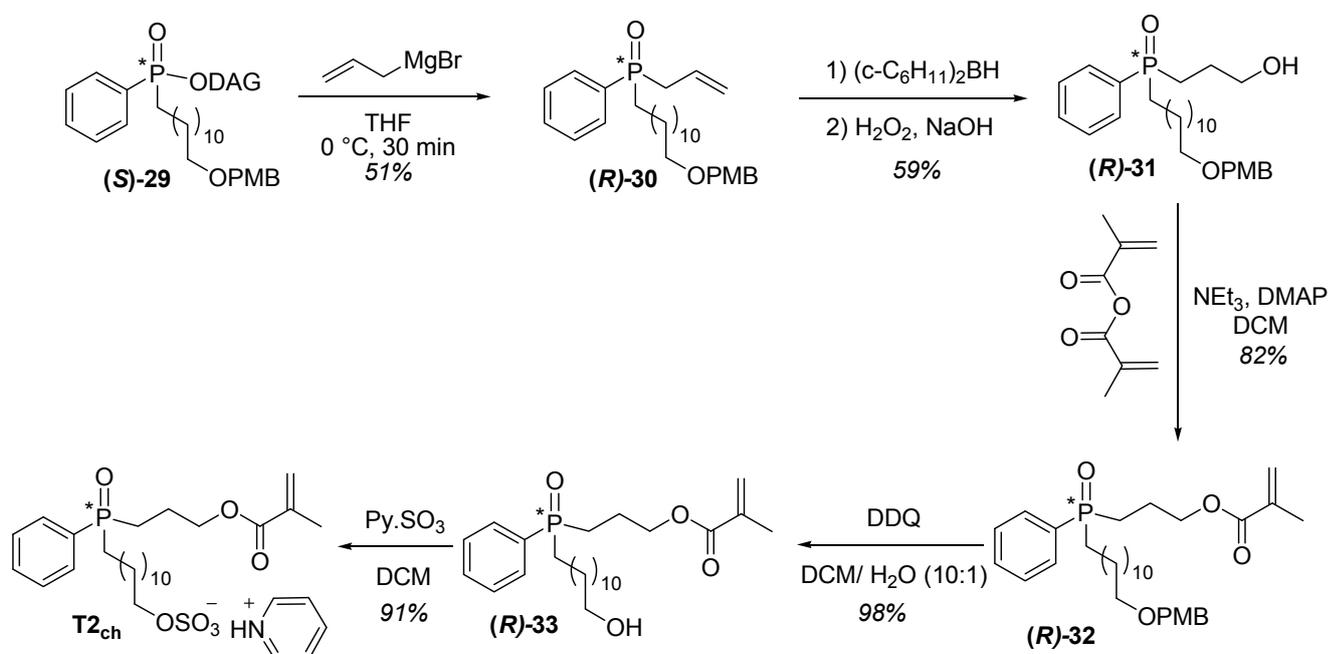


Schéma 8. Suite et fin de la synthèse du template **T2_{ch}** chiral.

Après la formation de l'oxyde de phosphine (**R**)-**30**, la synthèse se poursuit par une réaction d'hydroboration anti-markovnikov pour obtenir une fonction alcool primaire avec un rendement de 59%. La suite de la synthèse consiste à l'introduction de la fonction polymérisable par réaction du dérivé (**R**)-**31** avec l'anhydride méthyacrylique, suivie d'une étape de déprotection du groupement PMB par le DDQ pour obtenir l'alcool chiral (**R**)-**33**, avec un rendement de 98%. La dernière étape consiste en la formation du sel de pyridinium chiral **T2_{ch}** en présence du réactif $\text{Py}\cdot\text{SO}_3$, obtenu avec un rendement de 91% (Schéma 9).

Ce dernier template chiral **T2_{ch}** a été ensuite utilisé pour la préparation du polymère imprimé **IP_{ch}**.

6.7. Synthèse du polymère imprimé avec le template chiral **T2_{ch}**

Le polymère imprimé **IP_{ch}** a été préparé dans les mêmes conditions de polymérisation en mini-émulsion optimisées pour la préparation des polymères imprimés **IP_{T1-T3}** (voir partie 5.4, page 56),

en utilisant le template chiral **T2_{ch}**. La composition du mélange de polymérisation pour la préparation du polymère imprimé **IP_{ch}** est indiquée dans le tableau 11.

Tableau 11. Composition du mélange de polymérisation pour la préparation du polymère imprimé **IP_{ch}**.

Composants	Pourcentage en masse (%)	Quantités utilisées	Rapport stoechiométrique des réactifs polymérisables
Styrène		1.68 ml, 14.62 mmol	170
DVB	16.7	0.42 ml, 2.92 mmol	34
Template T2_{ch}		0.086 mmol	1
Hexadécane	0.72	0.11 ml, 0.34 mmol	
AMBN	0.16	19 mg, 0.087 mmol	
SDS	0.64	75 mg, 0.32 mmol	
H ₂ O	81.8	9.5 ml	

Le polymère imprimé **IP_{ch}** a été tout d'abord caractérisé par microscopie à transmission électronique (MET), pour avoir des informations sur la forme et la taille des nanoparticules. Comme pour les autres polymères imprimés **IP_{T2-T3}**, les photographies MET pour ce dernier polymère **IP_{ch}** (Figure 54) montrent la formation de nanosphères avec un diamètre compris entre 50 et 100 nm.

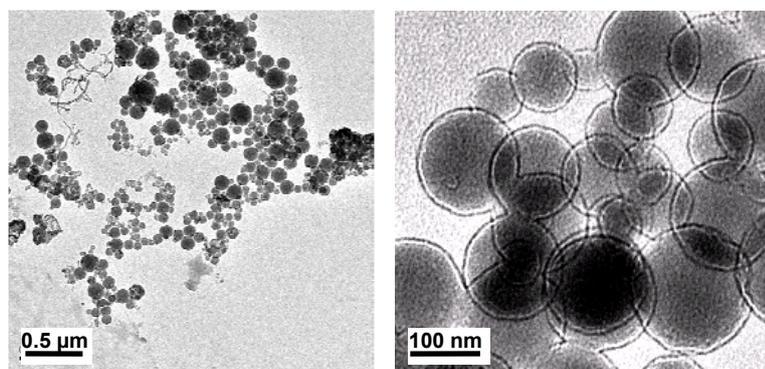
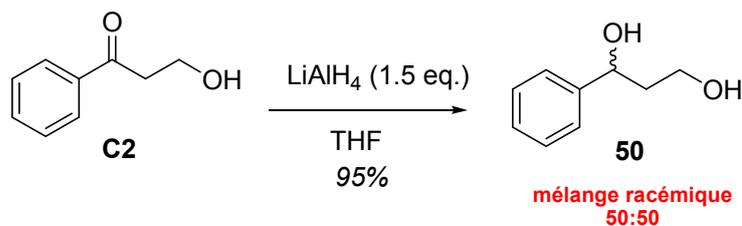


Figure 54. Photographies MET du polymère imprimé **IP_{ch}** après extraction du template **T2_{ch}**.

6.8. Tests préliminaires de réduction asymétrique avec le polymère imprimé **IP_{ch}**

La première expérience effectuée a été de réduire la cétone **C2** en solution homogène, avec LiAlH₄ comme agent de réduction dans le THF. Un mélange racémique de l'alcool correspondant a été obtenu :



Comme attendu, un mélange racémique des deux énantiomères est obtenu. Les deux alcools ont été ensuite séparés par CLHP à l'aide d'une colonne chiral OD-H (phase mobile: hexane/isopropanol 97.5 : 2.5, débit : 1 ml/min, détection à 215 nm).

Après avoir mise au point les conditions sur la CLHP pour séparer les deux énantiomères, nous avons effectué des premiers tests de réduction asymétrique en présence du polymère imprimé **IP_{ch}**. Pour mettre en place un système catalytique comme celui représenté dans la figure 47-page 84, une première condition doit être de complexer la plupart de la cétone **C2** dans le polymère imprimé **IP_{ch}**. Pour ce faire, nous avons effectué un test de reconnaissance moléculaire de la cétone **C2** par le polymère imprimé **IP_{ch}**, en faisant varier la quantité de polymère dans 1 ml d'une solution de cétone **C2** à une concentration de 55,1 μM dans le THF. Nous avons remarqué que la quantité maximale de substrat **C2** (Figure 55) complexée avec 20 mg de polymère imprimé **IP_{ch}** est 85% par rapport à la concentration initiale, après 24h d'incubation à température ambiante (20-22 °C).

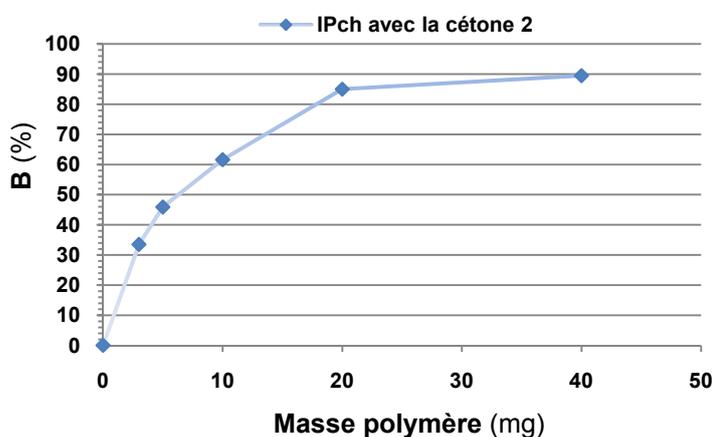


Figure 55. Pourcentage de binding (**B**) à la concentration initiale de 55,1 μM de cétone **2** pour une quantité croissante de polymère imprimé **IP_{ch}** dans le THF.

Après cette expérience, nous avons effectué deux incubations de 20 mg de polymère imprimé **IP_{ch}** dans 1 ml de cétone **C2** à une concentration de 55,1 μM dans le THF anhydre. Cette fois les incubations ont été effectuées dans des piluliers sous argon. Après 24h d'incubation, 1 μl et 5 μl d'une solution 1M de LiAlH_4 dans le THF sont ajoutés respectivement dans les deux piluliers. La

réaction de réduction est conduite pendant 1h sous une agitation constante des piluliers. Le polymère imprimé est ensuite séparé par centrifugation; et lavé plusieurs fois avec 1 ml de MeOH afin d'extraire éventuellement le produit de réduction formé à l'intérieur de sites de reconnaissance du polymère imprimé. Toutes les fractions de méthanol sont récupérées dans un ballon et le solvant est évaporé sous basse pression. Le résidu est dissous avec 100 μ l d'isopropanol et injecté en CLHP. Malheureusement, l'analyse des chromatogrammes correspondants n'ont pas révélé l'existence d'un pic correspondant au produit final de la réduction, ni à la cétone de départ **C2**. Différentes hypothèses peuvent être évoquées à ce stade de la recherche. La première est que l'alcool formé est extrêmement reconnu par les sites de reconnaissance du polymère imprimé **IP_{ch}** et donc, l'extraction est beaucoup plus complexe que prévue. La seconde hypothèse est que les concentrations de travail sont trop faibles pour permettre une détection optimale de la cétone de départ et de l'alcool éventuellement formé. À ce jour, nous ne sommes pas en mesure de conclure si la réduction asymétrique d'une cétone prochirale est possible ou non en présence d'un polymère imprimé. Afin d'évaluer l'efficacité de la catalyse par le polymère imprimé **IP_{ch}**, il paraît nécessaire d'optimiser la méthode analytique, ainsi que les conditions d'extraction du produit final de réduction. De plus, pour éviter une éventuelle réduction des fonctions acides carboxyliques situées à l'intérieure du polymère imprimé, il est envisagé d'utiliser un agent réducteur moins fort que LiAlH_4 .

6.9. Conclusion première partie

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons mis au point une nouvelle méthode de préparation de nanosphères imprimées en surface, en combinant pour la première fois l'approche semi-covalente avec la technique de polymérisation en mini-émulsion.

Dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer les paramètres gouvernant la sélectivité lors de la complexation polymère-analyte en préparant des polymères imprimés **IP_{T1-T3}**, ayant à l'intérieur des sites de reconnaissance, un nombre croissant de fonctions acides carboxyliques.

La série des polymères imprimés synthétisée a été caractérisée par des mesures physico-chimiques telles la détermination de la surface spécifique (BET), la mesure de la polydispersité (par diffusion de la lumière) et la microscopie électronique à transmission (MET).

L'analyse élémentaire du phosphore des polymères imprimé **IP_{T2}** et **IP_{T3}** avant et après clivage du template, a confirmé que la difficulté majeure de la méthode réside dans la rupture des liaisons esters après copolymérisation. Le taux d'extraction des templates **T1** et **T2** compris entre 30 et 40%, indique que pendant la polymérisation en mini-émulsion le template n'est peut-être pas toujours situé à la surface des nanosphères mais plutôt plus en profondeur du polymère.

De manière générale, nous avons démontrés que le polymère imprimé ayant un nombre plus élevé des fonctions acides carboxyliques dans les sites de reconnaissance (**IP_{T3}**), présente les meilleurs facteurs de sélectivité. Ainsi, la différence dans le caractère hydrophobe entre le phosphinate **1-3** et les sites de reconnaissance des polymères imprimés, joue un rôle important pour avoir une bonne sélectivité. Dans le cas du polymère imprimé **IP_{T1}** préparé avec une approche non-covalente purement hydrophobe, la complémentarité de forme entre l'empreinte et l'analyte est le facteur prédominant pour avoir des capacités et des sélectivités élevées.

L'utilisation de l'approche semi-covalente a conduit à la formation de polymères imprimés avec un excellent facteur d'impression **I**, comparé à l'approche non-covalente, où l'excès de monomère fonctionnalisés entraîne généralement de fortes interactions non spécifiques.

Par ailleurs, nous avons également entrepris des études visant à synthétiser des surfaces chirales imprimées pour la discrimination faciale et la réduction énantiosélective de cétones. Ces travaux conséquents restent à finir.

Chapitre 2

Utilisation de polymères imprimés comme récepteurs artificiels de sucres

7. MIP comme récepteurs artificiels des monosaccharides

7.1. Introduction: les sucres dans le monde biologique

Au cours des dernières années, l'étude des phénomènes de reconnaissance moléculaire impliquant les sucres, ont suscité beaucoup d'intérêt de la part du monde scientifique compte tenu de leur importance dans un grand nombre de processus biologiques¹¹⁰. Il a été montré que le potentiel de transport de l'information des oligosaccharides est bien supérieur à celui des protéines et des acides nucléiques de masse moléculaire équivalente^{110a}. De plus, leur présence sur les surfaces cellulaires (sous forme de glycoprotéines ou de glycolipides) et dans de nombreuses protéines¹¹¹, suggère un rôle important des oligosaccharides dans le monde biologique. Donc, outre leur importance dans le stockage de l'énergie, les sucres sont aujourd'hui connus pour leur rôle dans le transfert des informations intra- et intercellulaires, dans l'infection des cellules par les bactéries et les virus, dans le réglage du comportement d'enzymes et d'autres protéines, et pour leur fonction dans la réponse immunitaire¹¹⁰. Les phénomènes de reconnaissance des saccharides sont également importants pour le métabolisme des glucides, et pour les transports de ces molécules à travers les membranes cellulaires.

Sur le plan théorique, le phénomène de reconnaissance moléculaire des hydrates de carbone dans les systèmes naturels, est encore très mal compris, et beaucoup de questions restent encore en suspens à propos du fonctionnement de ces systèmes^{110a,112}. Dans ce contexte, la préparation de récepteurs artificiels pour les sucres représente à l'heure actuelle un challenge synthétique important¹¹³. Par ailleurs, les récepteurs de glucides pourraient également être utilisés comme médicaments agissant en tant qu'anticorps synthétiques (par exemple comme agents anti-infectieux)^{110a}.

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, nous avons décidé d'utiliser la nouvelle technique d'impression moléculaire, décrite dans le chapitre 1, pour la préparation de nanosphères imprimées en surface, capables de reconnaître sélectivement des sucres, en particulier des dérivés du glucose. Avant de décrire en détail la préparation des nouveaux récepteurs artificiels, une présentation des polymères imprimés en tant que récepteurs artificiels des glucides sera décrite.

Ces études sur les différentes approches utilisées dans la préparation des MIPs, sera très utile pour évaluer et comparer les avantages de la nouvelle technique d'impression moléculaire optimisée au laboratoire.

7.2. Description de différentes approches pour la préparation des MIP

Plusieurs polymères imprimés ont été décrits pour la préparation de récepteurs artificiels des sucres. La plupart de ces polymères a été synthétisée par polymérisation en masse en utilisant différentes approches y compris l'approche covalente, non-covalente ou l'approche impliquant des liaisons de coordination.

7.2.1. Approche covalente

L'approche covalente, décrite par le groupe de Wulff en 1977^{14,72} est l'une des premières méthodes utilisées pour l'impression de sucres. Le template polymérisable est obtenu par réaction du monosaccharide avec des dérivés d'acide boronique (Schéma 10).

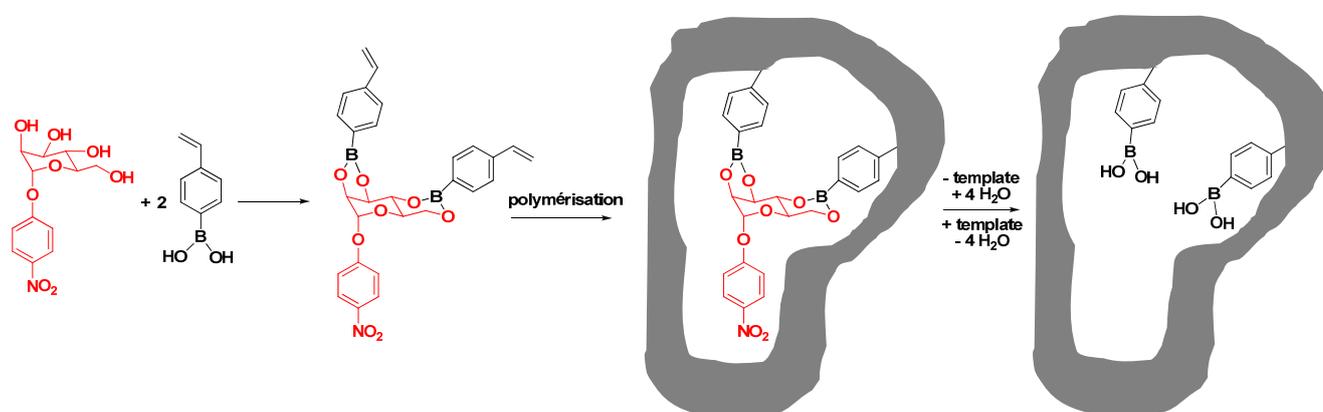


Schéma 9. Impression des sucres par l'approche covalente faisant intervenir des esters boroniques (d'après la référence 14).

Après polymérisation en masse, le template est extrait par réaction d'hydrolyse. La technique a été utilisée pour synthétiser des polymères pour le D-galactose, le D-fructose et le phényl- α -D-mannopyranoside. Les sélectivités pour un énantiomère donné ont été exprimées par le facteur de séparation α (rapport des coefficients de distribution des isomères D et L), obtenu par incubation des polymères en présence d'un mélange racémique du monosaccharide imprimé. La valeur la plus élevée de 4.5, a été obtenue pour le polymère préparé avec le phényl- α -D-mannopyranoside. Les résultats obtenus par le group de Wulff, avec les différents mélanges racémiques de monosaccharides, indiquent que la sélectivité est fortement influencée par l'orientation des groupes fonctionnels dans les sites de reconnaissance.

7.2.2. Approche non-covalente

L'approche non covalente a également été utilisée pour l'impression de monosaccharides par le groupe de Mosbach¹¹⁴. Dans le premier exemple (Schéma 11), des composés D-glucopyranosides ont été imprimés avec l'acide méthacrylique en présence d'un agent de réticulation (EGDMA). La formation de liaisons hydrogènes entre l'acide méthacrylique et le template dans le complexe de pré-polymérisation a été démontrée par des études RMN¹¹⁴. Après polymérisation et extraction du template par lavages successifs à l'éthanol, les particules imprimées ont été conditionnées dans des colonnes pour des études de séparation chromatographique. Cette technique a permis d'obtenir des sites de reconnaissance avec une sélectivité anomérique et épimérique élevées¹¹⁴.

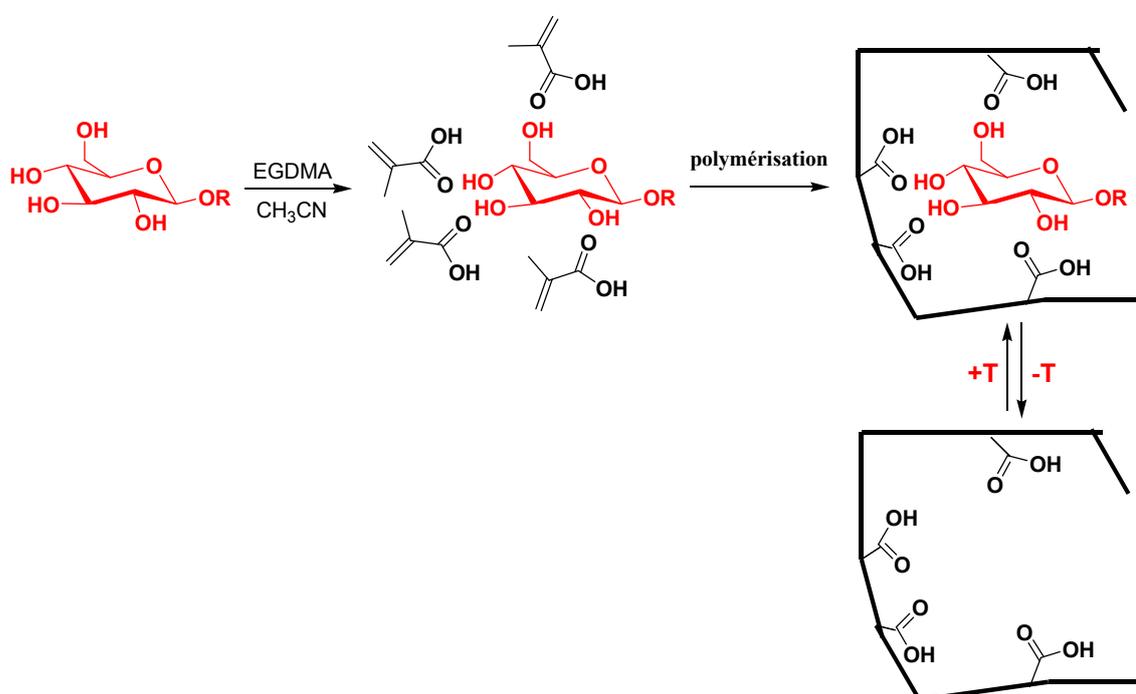


Schéma 10. Impression des sucres par l'approche non covalente faisant intervenir des liaisons hydrogène.

Par ailleurs, le groupe de Mosbach a rapporté que des glycosides tétraacétylés fonctionnalisés en position anomérique par un groupement phénylamine (Figure 56), peuvent être utilisés comme template en présence d'acide méthacrylique et d'EGDMA comme agent de réticulation¹¹⁵.

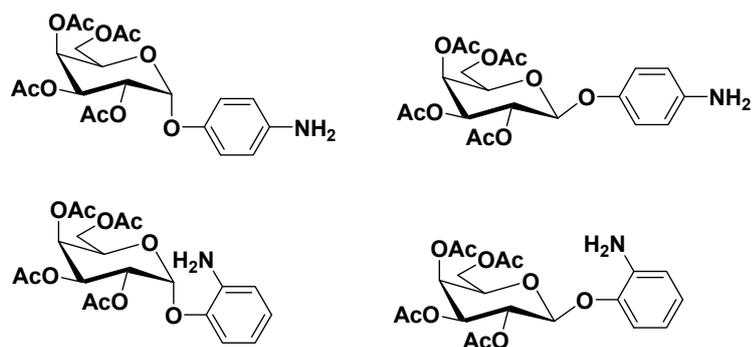


Figure 56. Dérivés du galactose utilisés comme template dans une approche non covalente *via* des interactions électrostatiques (d'après la référence 115).

Après polymérisation en masse et extraction du template par dans un milieu MeOH/acide acétique dilué, la reconnaissance moléculaire du sucre à l'intérieur des cavités du polymère imprimé fait intervenir des interactions ioniques entre l'acide méthacrylique et le groupement amine présent sur le sucre (Schéma 12). Les études menées sur les polymères imprimés ont montré que, dans ce type de système, la sélectivité entre le α - et le β -galactoside est fortement dépendante de la position du groupement amine sur le noyau aromatique (*ortho*, *mé*ta ou *para*). En revanche, aucune sélectivité n'est observée pour les polymères basés uniquement sur la complémentarité de forme.

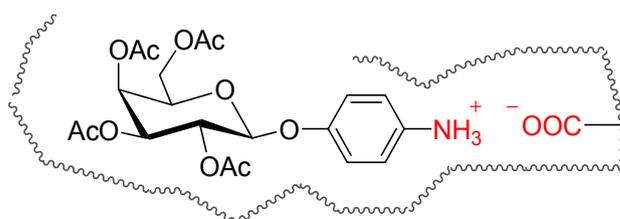


Schéma 11. Reconnaissance de dérivés du galactose par des interactions ioniques (d'après la référence 115).

Récemment, Papy-García et *al.* ont étudiés la préparation de polymères imprimés par une approche non-covalente, pour la reconnaissance spécifique de sucres sulfatés, en particulier des dérivés du glucose possédant un groupement sulfate en position 6 (Schéma 13)¹¹⁶.

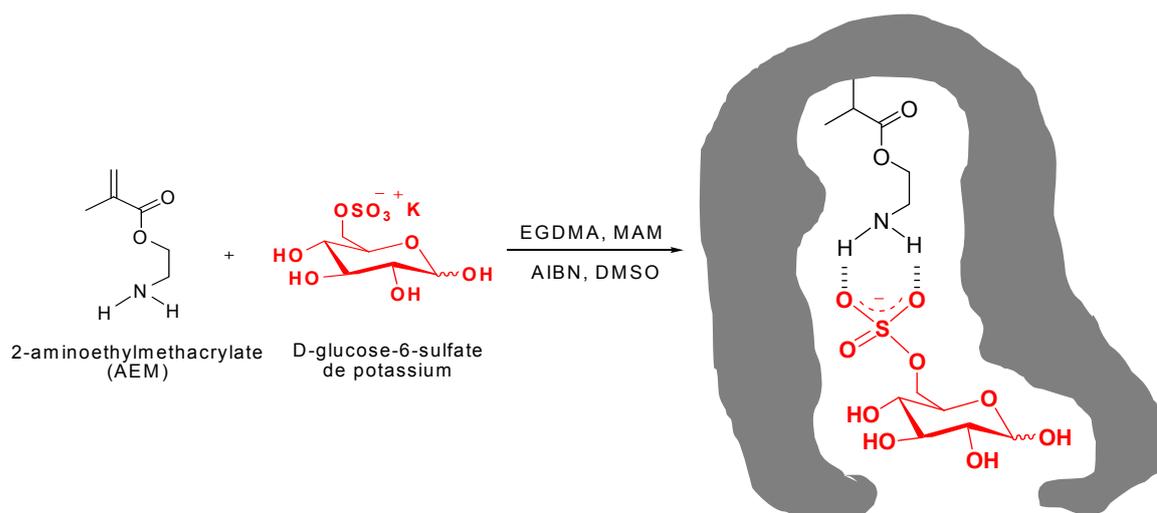


Schéma 12. Représentation schématique de la préparation du polymère imprimé pour la reconnaissance spécifique de sucres sulfatés (d'après la référence 116).

Les polymères imprimés ont été préparés par polymérisation en masse dans le DMSO, en présence d'EGDMA comme agent de réticulation. Différentes amines fonctionnalisées ont été utilisées comme monomère fonctionnel dans un rapport 1:1 avec le template sulfaté.

Les tests de reconnaissance moléculaire réalisés dans le DMSO, ont montré que le polymère imprimé préparé avec une amine primaire (AEM, Schéma 13) comme monomère fonctionnel, présente la meilleure capacité pour le D-glucose-6-sulfate de potassium. Les auteurs ont conclu que la reconnaissance du sucre sulfaté dans les cavités du polymère imprimé est assurée par la formation de deux liaisons hydrogène entre l'amine primaire et le groupe sulfate (Schéma 13).

De plus, ils ont montré que la sélectivité du polymère imprimé est fortement influencée par la position du groupe sulfate dans le template. Les sucres ayant le sulfate en positions 6 sont les mieux reconnus par le polymère imprimé.

Un autre exemple d'approche non covalente pour la reconnaissance des sucres a été récemment décrit par le groupe de Shimizu¹¹⁷. Ils ont préparé des polymères imprimés en utilisant un monomère fonctionnalisé contenant une porphyrine chélatant un atome de zinc, en présence de *n*-octyl- β -D-glucopyranoside comme template (Schéma 14).

Avec cette approche, le complexe de porphyrine, responsable de la reconnaissance des sucres, est immobilisé dans une matrice polymérique très réticulée, et les polymères résultants sont bien adaptés pour des applications variées, comme la détection et la séparation sur support solide.

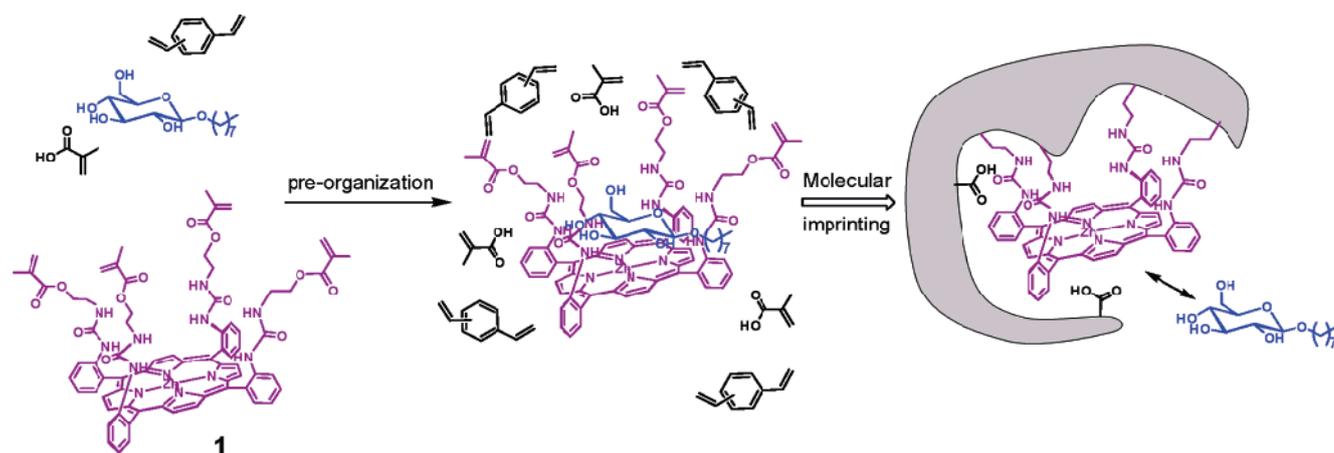


Schéma 13. Approche non covalente avec du monomère fonctionnalisé contenant de la porphyrine (d'après la référence 117).

Une publication très récente, de Okutuku et *coll.*¹¹⁸, décrit la préparation de polymères imprimés en utilisant le galactose comme template, *via* une approche non covalente. Les polymères imprimés ont été préparés par polymérisation en masse en présence de DMSO comme porogène. La polymérisation a lieu pendant 12 heures à 50 °C. L'agent de réticulation utilisé est l'EGDMA, et l'acrylamide a été choisi comme monomère fonctionnel. Les polymères imprimés ont été évalués dans la reconnaissance moléculaire de différents mono- et disaccarides dans l'eau, par la méthode du "batch process". Les polymères imprimés présentent une bonne capacité et sélectivité pour le galactose (Figure 57a). Les données obtenues lors de la reconnaissance moléculaire du galactose ont été traitées avec la méthode de scatchard (Figure 57b). Les sites de reconnaissance du polymère imprimé montrent une homogénéité remarquable (régression linéaire du scatchard plot) avec une constante de dissociation de 10.5 mM pour le galactose.

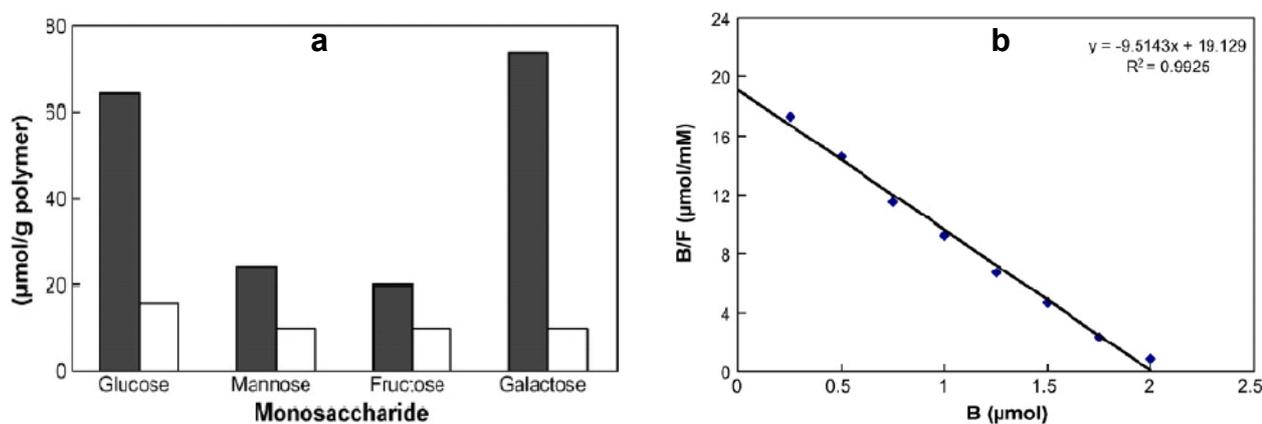


Figure 57. Reconnaissance moléculaire (a) et scatchard plot (b) obtenu pour le polymère imprimé du galactose par Okutuku et *coll.* (d'après la référence 118).

7.2.3. Approche avec des liaisons de coordination

Les approches covalente et non covalente utilisées pour la reconnaissance des sucres présentent des inconvénients comme la sensibilité à l'eau dans le premier cas, et la solubilité des analytes dans des milieux organiques dans le deuxième. Pour ces deux raisons principales et afin de développer des récepteurs artificiels pour les sucres dans des milieux aqueux, le groupe d'Arnold a étudié, en 1997, la reconnaissance de sucres libres par des liaisons de coordination avec des métaux de transition⁴². Les monomères fonctionnalisés à base de cuivre se coordinent avec le sucre à pH élevé (>10) dans un complexe de pré-polymérisation (Schéma 15). Après polymérisation et extraction, le polymère est chargé avec du Cu(II). Pendant la chélation du sucre des H⁺ sont libérés et par conséquent le pH de la solution diminue. La capacité du polymère à reconnaître le glucose est définie par la quantité de base nécessaire pour maintenir le pH de la solution constant. Lors des tests de complexation du glucose les auteurs ont observé une bonne réponse analytique pour le glucose et des cinétiques de binding assez rapide.

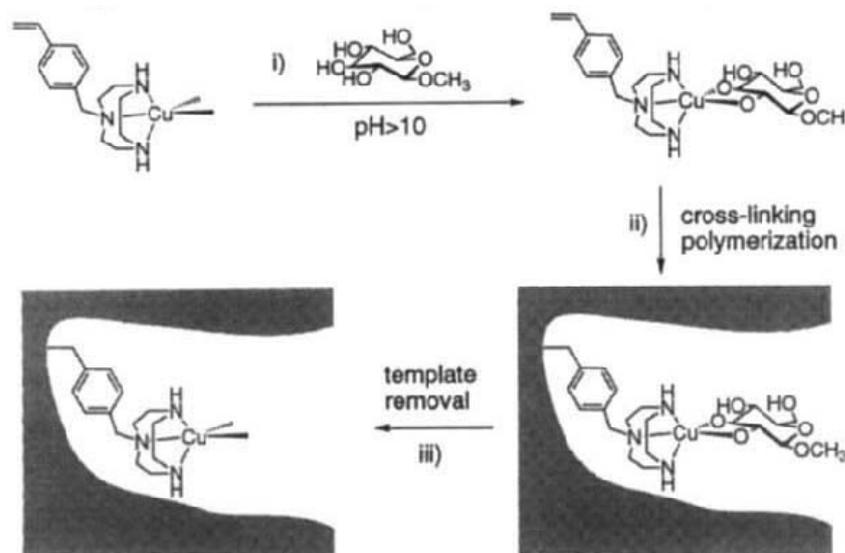


Schéma 14. Approche avec des liaisons de coordination proposée par Arnold (d'après la référence 42).

En 2001, le groupe de Striegler a décrit un modèle proche de celui d'Arnold mais permettant de travailler à pH physiologique compris entre 5,5 et 7,5⁴³. La formation du complexe de pré-polymérisation entre le monomère fonctionnel à base de cuivre (II) et le sucre (Schéma 15) se fait toujours à pH élevé (pH=12,4).

Après polymérisation, l'extraction du complexe et la recharge en ions Cu(II) dans les sites sont évaluées par analyse thermogravimétrique. Environ 96% du complexe introduit avant

polymérisation est extrait de la matrice polymérique par traitement avec une solution de EDTA et de HCl 0,1 N et presque la même quantité de Cu(II) extraite est rechargée dans les sites après équilibration avec une solution aqueuse 0,1 M de CuCl₂ (Schéma 16). Cette valeur élevée indique la formation de sites de reconnaissance avec une très bonne accessibilité pour les ions métalliques. Les essais de reconnaissance moléculaire des monosaccharides à pH physiologique ont été réalisés avec une solution de sucre sept fois plus concentrée que la quantité des sites disponibles sur le polymère.

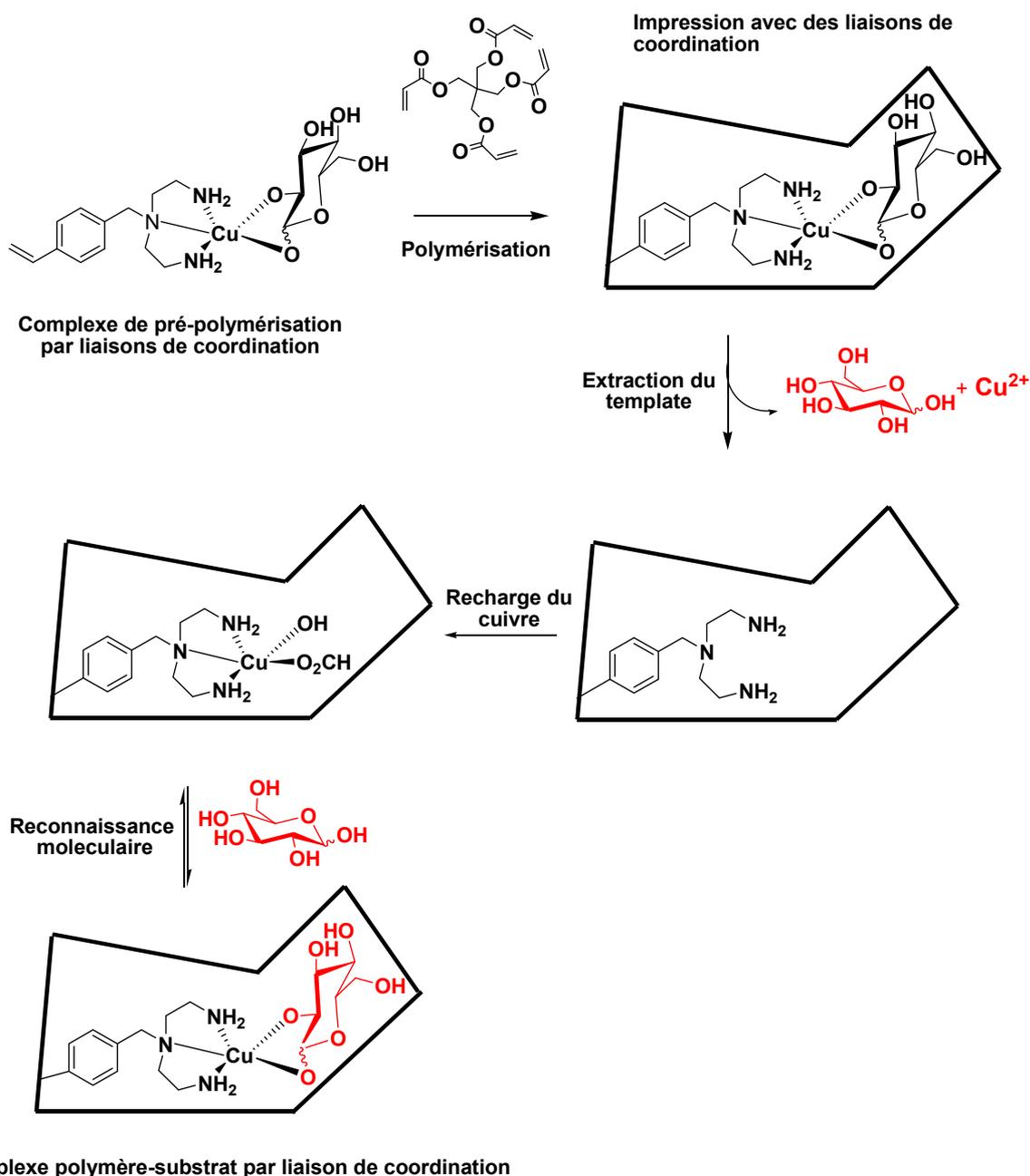


Schéma 15. Formation du complexe ternaire ligand polymérisable Cu-sucre dans le polymère imprimé proposé par Striegler (d'après la référence 43).

Dans ces conditions, le polymère imprimé avec du glucose a montré une meilleure capacité de reconnaissance moléculaire et une meilleure sélectivité pour son analyte "original", par rapport au galactose et au mannose (Figure 58). Plus de 90% des cavités peuvent être réoccupées par la molécule template et le facteur de sélectivité α pour le glucose sur les épimères galactose et mannose est respectivement de 8,3 et 9,0.

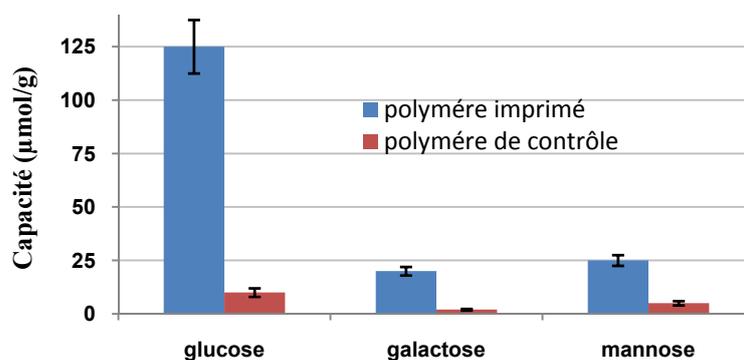


Figure 58. Capacité du polymère pour le glucose et les autres épimères galactose et mannose (d'après la référence 43).

Ainsi, la faible capacité observée pour le polymère de contrôle, préparé en absence de complexe Cu, indique un bon effet d'empreinte obtenu avec cette méthode. Le facteur d'empreinte pour le glucose, recalculé à l'aide des données de la publication, en utilisant les coefficients de partage est d'environ de 10. Les auteurs ont remarqué également que dans cette approche par liaisons de coordination, la forme de l'empreinte moléculaire joue un rôle important pour une bonne sélectivité vis-à-vis des épimères du glucose. Contrairement, au travail de Wulff^{14,74} concernant la préparation de polymères imprimés par approche covalente *via* des esters boroniques polymérisables, l'orientation de groupes fonctionnels à l'intérieur des sites de reconnaissance du polymère imprimé est le facteur plus important pour obtenir une bonne sélectivité.

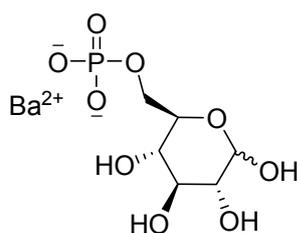
7.3. Polymères hydrogels comme récepteurs artificiels de monosaccharide

Les hydrogels ont récemment été employés pour la préparation de polymères à empreinte moléculaire pour la reconnaissance de sucres en milieux aqueux¹¹⁹.

En 2004, Kofinas et *coll.* ont rapporté la préparation de polymères hydrogels imprimés en utilisant une matrice polymérique à base de poly(allylamine)^{119a}. Cette dernière a été choisie pour sa bonne solubilité dans l'eau et pour sa structure polyaminée. Le sel de barium du D-glucose-6-phosphate (GPS-Ba, Figure 59) a été choisi comme template, plutôt que le glucose pure, pour avoir une

amélioration de l'affinité entre le template et groupements amines primaires présents sur le polymère, et donc pour augmenter la spécificité de l'empreinte pour le glucose.

Les résultats expérimentaux ont démontré que les hydrogels imprimés ont une bonne affinité pour le glucose par rapporte à un hydrogel de contrôle préparé en absence de GPS-Ba. Les polymères ont montré une capacité 600 mg de sucre par gramme de polymère sec. La sélectivité des hydrogels a été aussi mise en évidence dans la discrimination entre le glucose et le fructose dans des conditions physiologiques, avec un facteur de séparation glucose/fructose de 7.



Sel de barium du
D-Glucose-6-phosphate

Figure 59. Template utilisé pour la préparation d'hydrogels imprimés par le groupe de Kofinas^{119a}.

Dans le cadre d'une étude concernant le transport de médicaments, le groupe de Singh a proposé la préparation de polymères hydrogels imprimés en utilisant le glucose comme modèle^{119c}. Les hydrogels ont été préparés avec du *N,N*-méthylènebisacrylamide comme agent de réticulation, en présence de 2-hydroxyéthylméthacrylate (HEMA) et d'acide acrylique comme monomères fonctionnels. La polymérisation est effectuée dans l'eau, à 37 °C pendant 1 h 30, avec du persulfate d'ammonium (APS) comme initiateur de polymérisation. Différents polymères hydrogels ont été préparés en faisant varier la quantité initiale de template (glucose). Les auteurs ont observé que les polymères hydrogels préparés avec une concentration initiale de glucose plus élevée, sont plus performants lors de la recomplexation du glucose dans l'eau.

Chapitre 3

Préparation de récepteurs artificiels de monosaccharides par polymérisation en mini-émulsion en utilisant l'approche semi-covalente

8. Introduction

Pour la préparation de nouveaux polymères imprimés capables de lier spécifiquement des monosaccharides, en particulier des dérivés du glucose, nous avons décidé dans cette deuxième partie, d'appliquer l'approche semi-covalente en mettant en œuvre la polymérisation en mini-émulsion, décrite dans le chapitre 1.

Compte tenu des caractéristiques des templates utilisables dans cette approche, nous avons dans un premier temps préparé un dérivé du glucose possédant des groupes polymérisables (fonctions méthacryliques), une longue chaîne aliphatique et une tête polaire pour le rendre tensioactif.

Ce template à base de glucose a été utilisé pour synthétiser une série de polymères imprimés dans les mêmes conditions de mini-émulsion que celles utilisées pour les templates phosphorés **T1-T3** (voir partie 5.4, page 56). Enfin, nous avons étudié la capacité des polymères imprimés synthétisés à complexer sélectivement les dérivés du glucose, par la méthode du batch process. Les capacités expérimentales et les sélectivités obtenues avec les polymères imprimés ont été comparées aux résultats décrits dans la littérature. Puis, une étude d'optimisation des propriétés de reconnaissance (études cinétiques et d'évaluation de l'homogénéité de sites de reconnaissance) a été réalisée afin de mettre en évidence les avantages de la combinaison de l'approche semi-covalente et de la méthode de polymérisation en mini-émulsion.

8.1. Structure du template polymérisable tensioactif **T4** à base de glucose

La molécule template tensioactif (**T4**) que nous avons conçue à partir du glucose est représentée dans la figure 60.

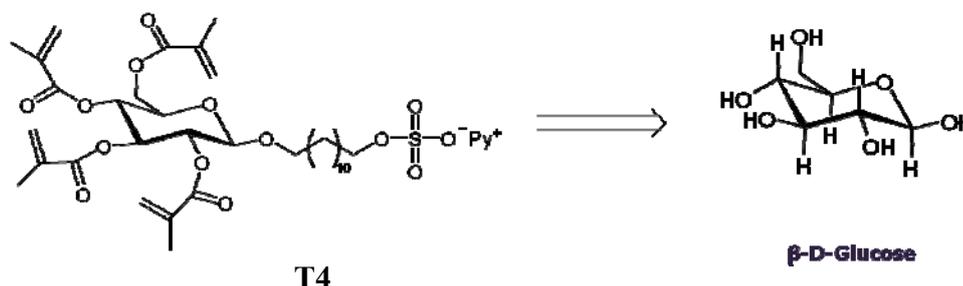


Figure 60. Structure du template **T4** à base de glucose.

Le template tensioactif **T4** copolymérisé dans les mêmes conditions de mini-émulsion que celles utilisées pour les templates phosphorés **T1-T3** (voir partie 5.4, page 56), devrait se positionner à la

surface des nanosphères de polymère formées. Après clivage des quatre liaisons esters et extraction du template **T4**, les nanosphères **IP_{T4}** présenteront des sites de reconnaissance avec quatre acides carboxyliques (Figure 61). De ce fait, la cavité ou l’empreinte aura une complémentarité de forme avec le glucopyranoside. Ainsi, la reconnaissance moléculaire des dérivés du glucose peut être assurée par quatre interactions non-covalentes réversibles, telles que les liaisons hydrogènes (Figure 61), en accord avec l'approche semi-covalente précédemment décrite.

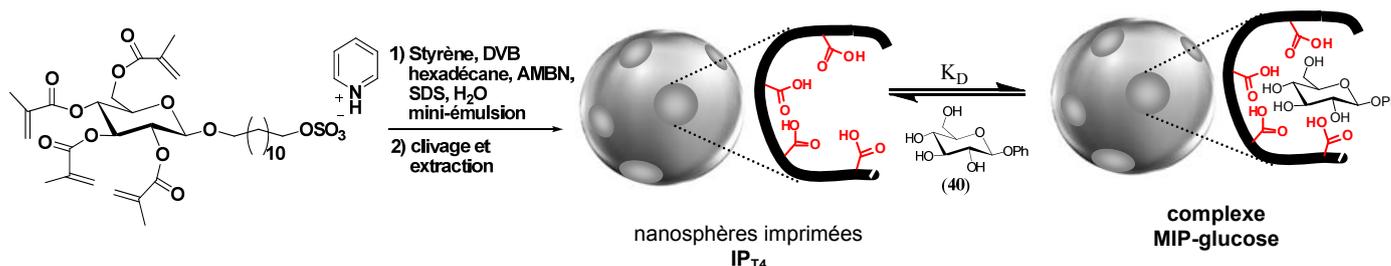


Figure 61. Formation des nanosphères imprimées en surface pour la reconnaissance spécifique du glucose.

Les résultats obtenus lors des tests d'affinité des molécules phosphorés **1-4** avec les polymères imprimés **IP_{T1-T3}**, ont montré que l'augmentation du nombre de fonctions acides carboxyliques à l'intérieur des sites de reconnaissance, conduit à des polymères imprimés plus performants au niveau de la sélectivité entre les phosphinates **1-3** (voir partie 5.6, page 64). Par conséquent, les nanosphères imprimées **IP_{T4}**, qui possèdent quatre fonctions acides (au lieu de deux pour le polymère **IP_{T3}**) devraient présenter une bonne capacité et sélectivité pour des glucopyranosides.

8.2. Synthèse du template tensioactif **T4**

Le template tensioactif **T4** est obtenu en cinq étapes avec un rendement global de 12% (Schéma 17). La première étape consiste en une réaction classique de glycosylation entre le composé commercial le glucose per-acétate **34** et l'alcool **35** en présence du complexe $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ¹²⁰. Le produit tétraacétylé **36** est obtenu avec un rendement de 48%. Ce dernier subit ensuite une déprotection avec de l'acétate de sodium dans les conditions de Zemplén¹²¹, pour donner le composé **37** avec un rendement de 94%. Puis, les fonctions polymérisables sont introduites par réaction avec l'anhydride méthacrylique, dans les mêmes conditions utilisées pour les templates phosphorés **T2-T3** (voir partie 5.3.2, page 51). Cette réaction de perméthacrylation des quatre fonctions alcools est l'étape limitante de la synthèse et quelque soit les conditions testées, le rendement en produit **38** n'excède pas 33%. La présence simultanée d'une fonction alcool primaire

et de trois fonctions alcools secondaires dans le composé **37**, rend la réaction de perméthacrylation particulièrement difficile.

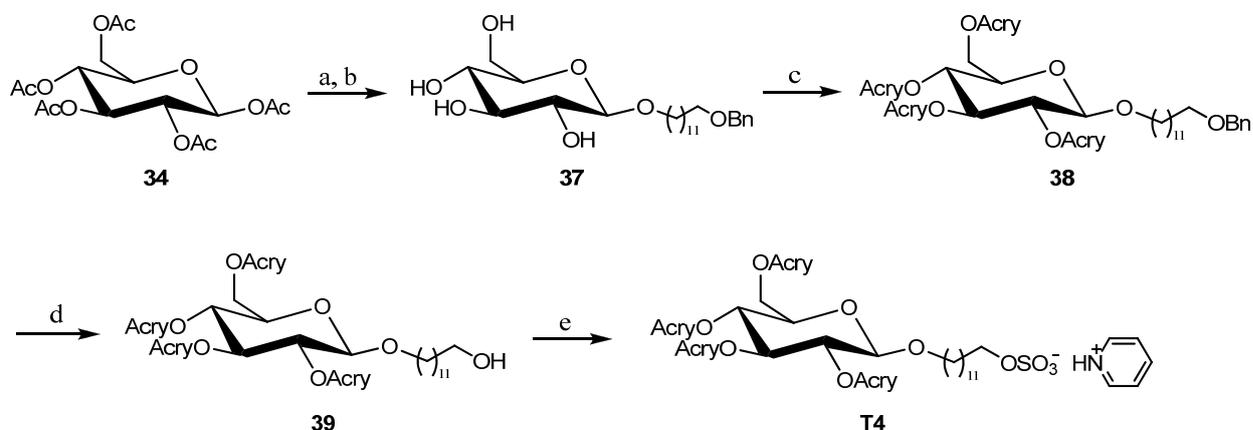


Schéma 16. a) $\text{OH}(\text{CH}_2)_{12}\text{OBn}$ (**35**, 3 eq), $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (3.3 eq), CH_2Cl_2 , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ (48%); b) MeOH , NaOMe (0,4 eq), CH_2Cl_2 , RT (94%); c) Anhydride acrylique (10 eq), NEt_3 (10 eq), DMAP (0,1 eq), CH_2Cl_2 (33%); d) DDQ (5 eq), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (10:1) (90%); e) $\text{Py} \cdot \text{SO}_3$ (2 eq), CH_2Cl_2 , reflux (76%). Ac=Acétyle, Acry=Méthacryloyl, Py=Pyridine, DMAP = 4-(Diméthylamino)-pyridine, DDQ =2,3-Dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone.

L'étape suivante de la synthèse du template **T4** est une réaction de déprotection de la fonction benzyle de **38** avec du DDQ dans un mélange dichlorométhane/eau. Le produit désiré **39** est obtenu avec un très bon rendement de 90%.

Enfin, la fonction alcool est transformée en sel de pyridinium par réaction avec le complexe $\text{Py} \cdot \text{SO}_3$, à reflux dans le dichlorométhane. Une fois mise au point la synthèse du template **T4**, ce dernier a été employé dans la synthèse des polymères imprimés dans les conditions de mini-émulsion.

8.3. Préparation des polymères imprimés avec le template **T4**

8.3.1. Formulation des polymères imprimés $\text{IP}_{\text{T4-T5}}$

Le template **T4** synthétisé a été copolymérisé en présence de styrène et divinylbenzène (DVB) en utilisant la procédure de polymérisation en mini-émulsion mise au point précédemment avec les templates phosphorés (voir partie 5.4.3, page 58). La composition des différents réactifs du mélange de polymérisation est la même que dans le cas de la préparation des polymères imprimés précédents. Les quantités utilisées et les rapports stœchiométriques entre les réactifs polymérisables sont consignés dans le tableau 12.

Tableau 12. Composition du mélange de polymérisation pour le polymère imprimé **IP_{T4}**.

Composants	Pourcentage en masse (%)	Quantités utilisées	Rapport stœchiométrique des réactifs polymérisables
Styrène		1.40 ml, 12.5 mmol	170
DVB	16.7	0.35 ml, 2.5 mmol	34
Template T4		52 mg, 0.072 mmol	1
Hexadécane	0.72	0.10 ml, 0.34 mmol	
AMBN	0.16	16 mg, 0.083 mmol	
SDS	0.64	63 mg, 0.26 mmol	
H ₂ O	81.8	8.0 ml	

Précédemment, lors de l'explication des principes généraux sur la polymérisation en mini-émulsion (voir partie 2.2, page 27), les raisons pour lesquelles la réalisation d'une mini-émulsion stable nécessite la présence d'un agent hydrophobe tel que l'hexadécane^{67,68} ont été discutés. Ce dernier agent élimine le mûrissement d'Ostwald, et permet d'obtenir des nanosphères polymériques avec un faible indice de polydispersité. Pour voir l'influence réelle de l'hexadécane sur la forme et la polydispersité des nanoparticules et surtout sur l'affinité que le polymère imprimé montre pour le glucose, une série de polymères **IP_{T5}** a également été synthétisée avec la même composition que le polymère imprimé **IP_{T4}** (Tableau 12), mais en l'absence d'hexadécane.

8.3.2. Procédure de préparation de la mini-émulsion

Une quantité connue de template **T4** est solubilisée dans le mélange organique styrène / DVB sous atmosphère inerte. Ensuite, tous les autres composants (AMBN, H₂O, SDS, hexadécane) sont ajoutés et le mélange est agité vigoureusement pendant 10-15 min pour obtenir une macro-émulsion. Dans le cas du polymère imprimé **IP_{T5}** le mélange de polymérisation ne contient pas de l'hexadécane. Puis, la macro-émulsion est transférée dans une unité à ultrasons (Appareil Bioblok Scientific Vibra-cell, 40% de puissance) et soniquée pendant 2 min à température ambiante⁷⁰. La mini-émulsion obtenue est ensuite mise dans un bain à 80 °C. La polymérisation est alors conduite avec une agitation constante et vigoureuse pendant 20 h.

Après polymérisation les nanoparticules formées sont récupérées par ultracentrifugation à 27000 tr/min. Comme dans les cas précédents de polymères imprimés **IP_{T1-T3}**, la séparation des particules a présenté de nombreuses difficultés et une série de plusieurs cycles d'ultracentrifugation est nécessaire pour récupérer une quantité suffisante de polymère.

Les nanoparticules sont ensuite lavées plusieurs fois avec un mélange 1:1 (v/v) acétone/H₂O pour éliminer les réactifs n'ayant pas polymérisés et la plupart du SDS. Le polymère est ensuite lavé,

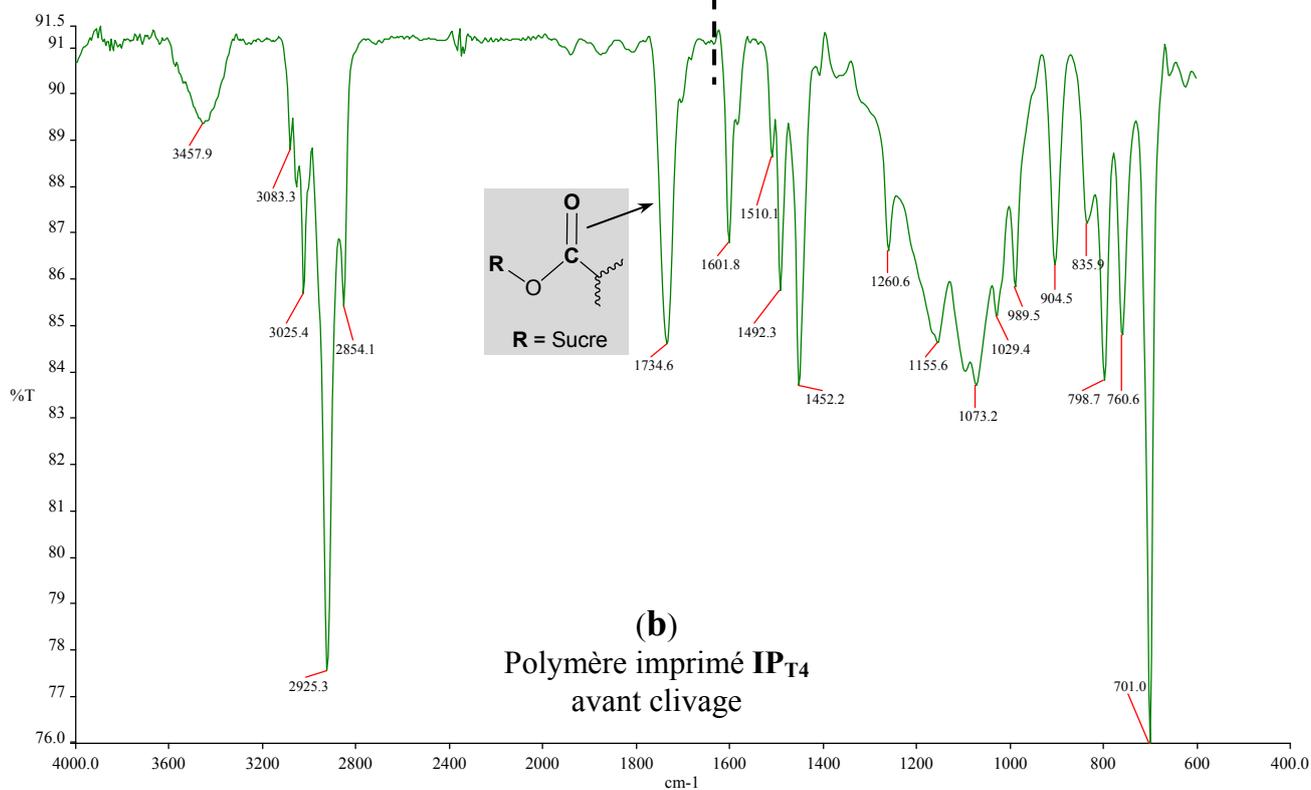
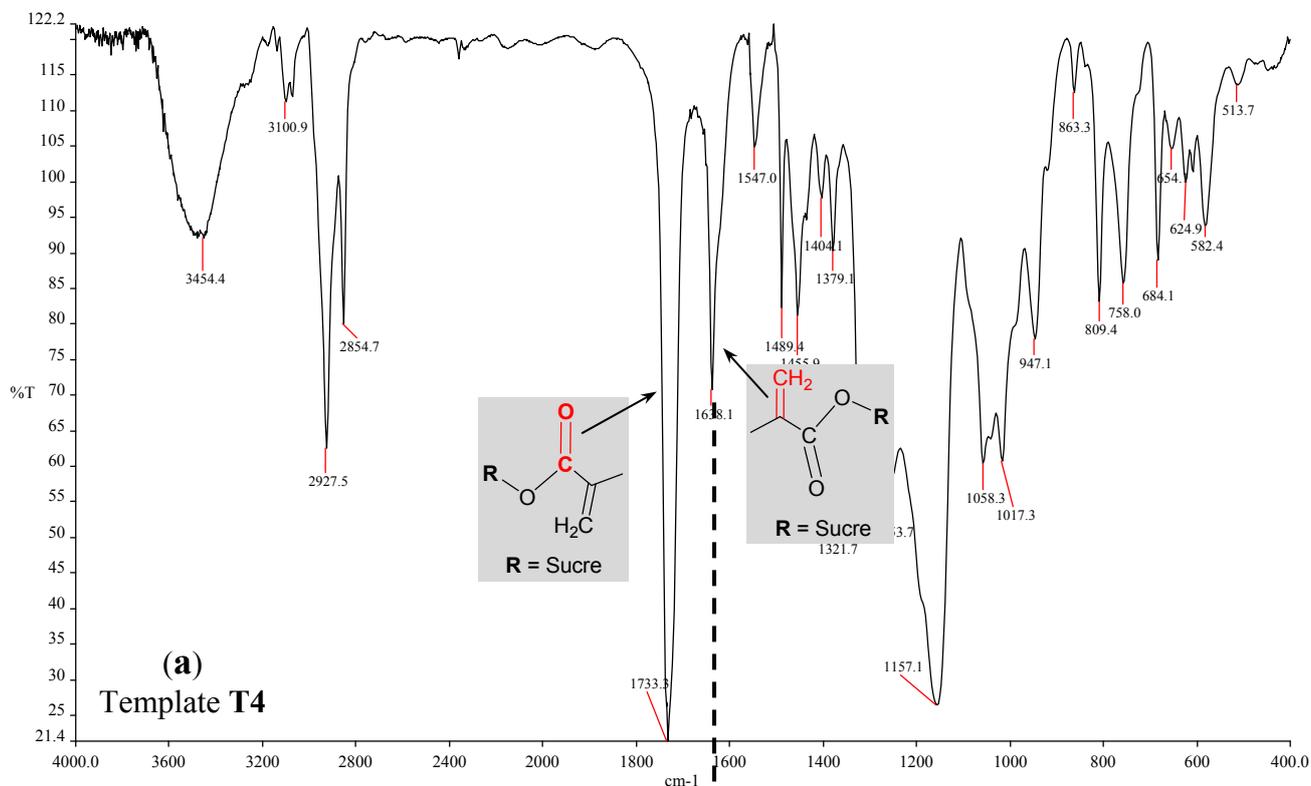
séché et lyophilisé puis soumis à l'hydrolyse pour extraire le template. Une fraction est séchée sous vide (nuit) puis ensuite lyophilisée, pour être caractérisée par des mesures physico-chimiques telles que l'analyse infrarouge (IR), la détermination de la surface spécifique (BET), la mesure de la polydispersité (par diffusion de la lumière) et la microscopie électronique à transmission (MET).

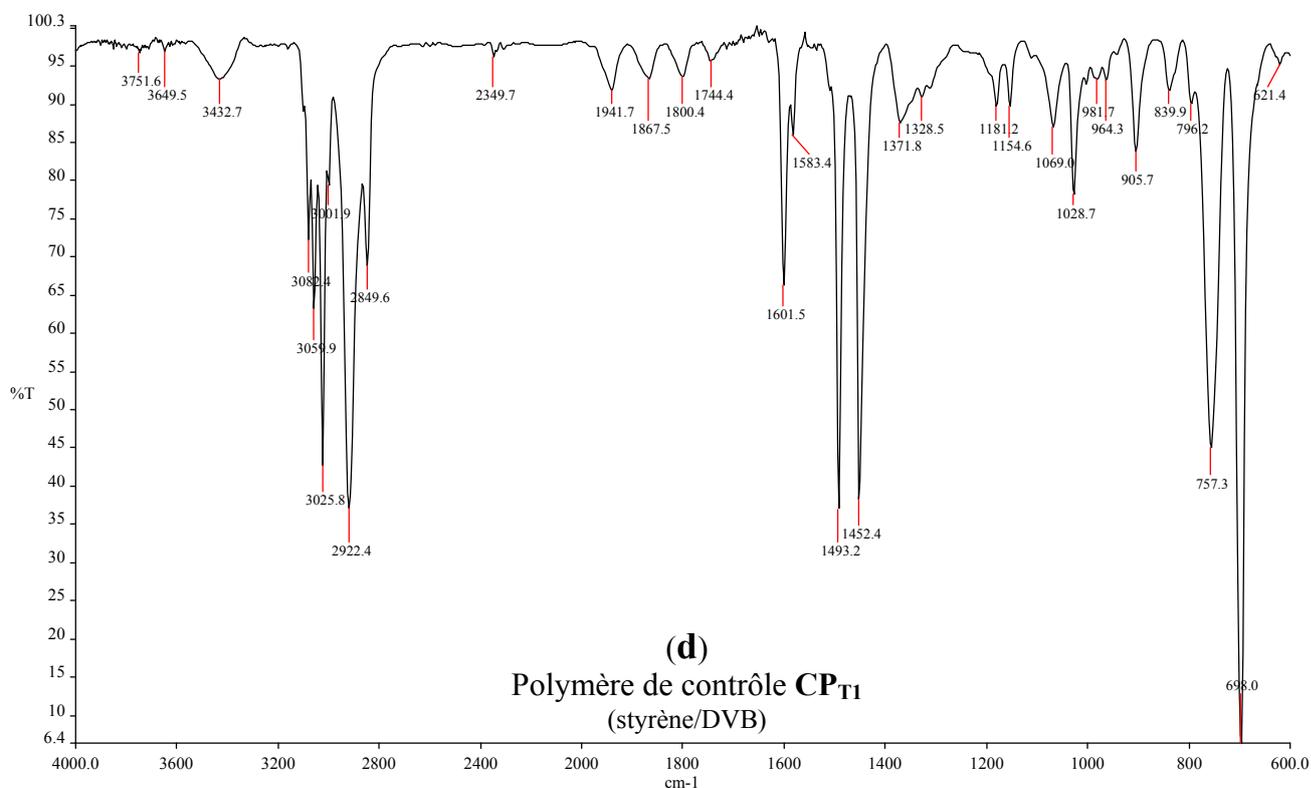
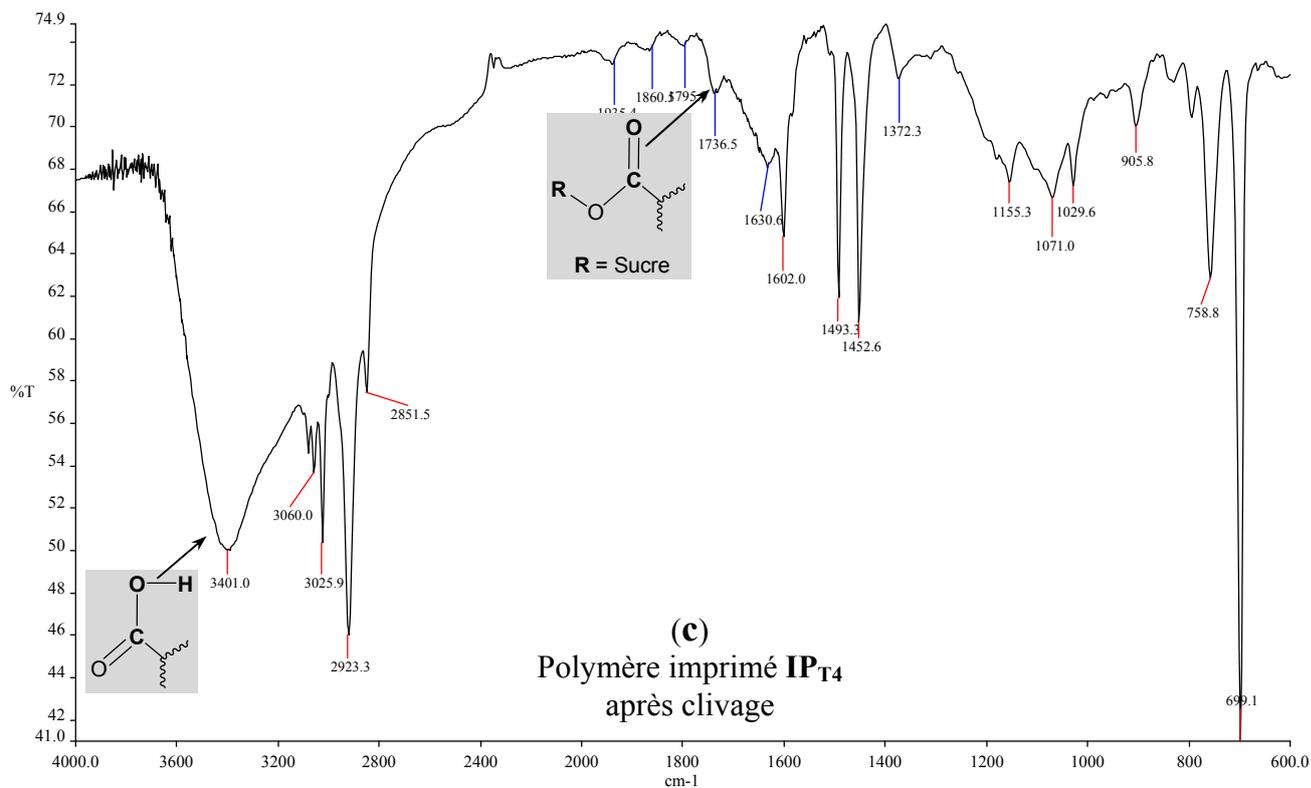
8.3.3. Extraction de la molécule template T4

L'extraction du template **T4** de la matrice polymérique a été effectuée par réaction de saponification dans un mélange 1:1 MeOH/NaOH (5M), à reflux pendant trois jours. Contrairement aux molécules templates précédentes (**T1-T3**), le composé **T4** ne contient pas d'hétéroatome. Donc, nous ne pouvons pas utiliser l'analyse élémentaire pour évaluer ni la quantité de template **T4** introduite dans la matrice polymérique, ni la quantité extraite lors de la rupture des liaisons esters.

Il est néanmoins possible de suivre qualitativement l'introduction et l'extraction du template par analyse infrarouge. Les spectres IR correspondants au template **T4**, au polymère imprimé avec **T4** avant et après extraction du template (**IP_{T4}**) et au polymère composé uniquement de styrène/DVB (c'est-à-dire le polymère de contrôle **CP_{T1}**) sont représentés à la page 118 et 119.

Dans le spectre infrarouge du template **T4** (spectre IR **a**), on identifie la bande d'absorption caractéristique du carbonyle de l'ester à 1734 cm^{-1} et celle de la vibration de la double liaison carbone-carbone à 1638 cm^{-1} . Après copolymérisation avec le styrène et le DVB (spectre IR **b**), la disparition de la bande d'absorption de la double liaison carbone-carbone et la présence simultanée de la bande du carbonyle ester située à 1734 cm^{-1} , constitue un élément permettant de montrer l'incorporation du template **T4** dans la matrice polymérique. Le spectre infrarouge du polymère imprimé **IP_{T4}** après clivage et extraction du template **T4** (spectre IR **c**), montre une diminution d'intensité de la bande du carbonyle de l'ester. Donc comme dans les cas des polymères imprimés **IP_{T2-T3}**, l'extraction du template **T4** n'est pas totale, ce qui confirme les difficultés dans la rupture des liaisons ester à l'intérieur de matrice polymérique.





La diminution d'intensité de la bande ester devrait coïncider avec l'apparition d'une bande vers $1680-1700\text{ cm}^{-1}$ correspondant à la vibration de valence des carbonyles des acides carboxyliques formés. Cette situation n'est pas complètement claire dans notre spectre (spectre IR **c**), même si on peut voir une variation du spectre dans la zone comprise entre $1650-1700\text{ cm}^{-1}$, par comparaison avec le spectre infrarouge du polymère **CP_{T1}** contenant uniquement du styrène et du DVB (spectre IR **d**). Dans ce dernier, nous n'observons pas de bandes d'absorptions entre $1650-1700\text{ cm}^{-1}$. À noter que dans le spectre du polymère **IP_{T4}** après clivage (spectre IR **c**), on peut également observer l'apparition d'une bande large et intense à 3400 cm^{-1} , qui est attribuée à la vibration de valence de la liaison O-H des acides carboxyliques. Par contre cette bande peut induire en erreur puisqu'elle peut aussi être due à la contribution des molécules d'eau restées bloquées dans la matrice polymérique.

8.3.4. Préparation du polymère de contrôle **CP_{T4}**

Le polymère de contrôle **CP_{T4}** a été préparé en utilisant 4 équivalents du monomère tensioactif **27** (voir partie 5.4.5, Figure 60), à la place du template **T4**. Après copolymérisation en présence et extraction de ce dernier, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les polymères précédents **IP_{T1-T3}**, les nanosphères **CP_{T4}** posséderont théoriquement à la surface, le même nombre d'acides carboxyliques que le polymère imprimé **IP_{T4}**, mais disposés de façon aléatoire, sans empreinte.

8.4. Caractérisation des polymères imprimés **IP_{T4-T5}** et du polymère de contrôle **CP_{T4}**

Comme dans le cas de la série des polymères imprimés précédents les polymères **IP_{T4-T5}** et le polymère de contrôle **CP_{T4}** synthétisés, ont été caractérisés par des mesures physico-chimiques telles que la détermination de la surface spécifique (BET), la mesure de la polydispersité et du diamètre des particules (par diffusion de la lumière) et par microscopie électronique à transmission (MET). Un récapitulatif de ces analyses est présenté dans le tableau 13.

Tableau 13. Diamètre des particules, polydispersité et surface spécifique pour les polymères **IP_{T4-T5}** et le contrôle **CP_{T4}**.

Entrée	Polymères	Hexadécane	Template	Diamètres particules (nm) ^a	Polydispersité ^a	Surface spécifique (m ² /g)	
						Après polymérisation	Après extraction
1	IP_{T4}	<i>oui</i>	T₄	154 nm	0.173	68.9	121.8
2	IP_{T5}	<i>non</i>	T₄	770 nm+ μm ^b	0.346	31.0	85.4
3	CP_{T4}	<i>oui</i>	27	141 nm	0.180	-	-

a: Les mesures ont été réalisées avec 1.3-1.5 mg de polymère séché et dispersé dans 1.0 ml de H₂O, en utilisant la diffusion de la lumière (Appareil Zetasizer Malvern).
b: Deux populations de particules sont observées.

Il s'avère que, le polymère imprimé IP_{T5} préparé sans hexadécane, possède des valeurs du diamètre des particules et de polydispersité plus hautes que les polymères imprimés (IP_{T4}) préparé avec l'hexadécane (Tableau 13, entrées 1-2). Les photographies prises par microscopie électronique à transmission (MET) pour le polymère imprimé IP_{T5} (Figure 62) montrent la formation d'agrégats de particules polymériques qui probablement, est à l'origine des différences dans les valeurs de polydispersité et diamètre de particules entre les polymères imprimés IP_{T4} et IP_{T5} observés précédemment (Tableau 13, entrées 1-2).

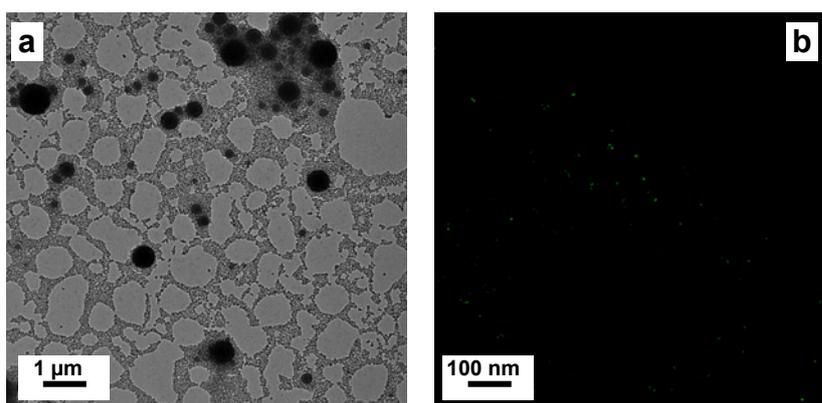


Figure 62. Photographies MET du polymère imprimé IP_{T5} synthétisé en absence d'hexadécane.

Pour le polymère imprimé IP_{T4} (préparé avec de l'hexadécane), les photographies MET (Figure 63) montrent la formation des particules sphériques avec une bonne homogénéité morphologique. Cela se traduit dans des valeurs inférieures de polydispersité et diamètre de particules comparé aux valeurs mesurées pour le polymère imprimé IP_{T5} préparé sans l'hexadécane.

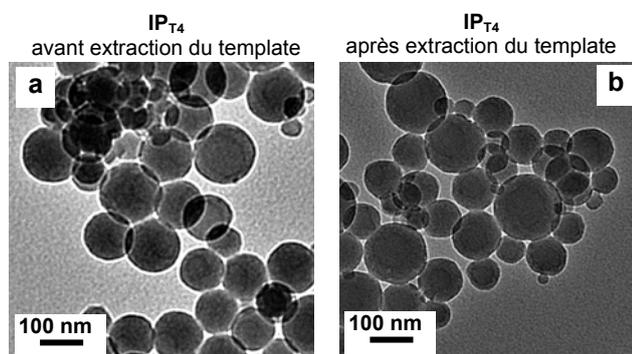


Figure 63. Photographies MET des polymères imprimés IP_{T4} avant (a) et après (b) extraction du template T4.

De plus, comme nous avons précédemment observés dans le cas des polymères imprimés **IP_{T2}** et **IP_{T3}** (voir partie 5.5, page 62), l'aspect des nanosphères n'est pas affecté par l'extraction du template dans les conditions basiques de saponification. Ainsi, les analyses de surface spécifique montrent une augmentation de la surface spécifique (Tableau 13), après clivage et extraction du template, pour tous les polymères. Ce dernier résultat expérimental est conforme à ce qui était attendu. En effet, lorsque le template est extrait de la matrice polymérique, la surface des nanosphères est modifiée ce qui se traduit par une augmentation de la surface spécifique^{70b}.

La poursuite de nos études nous a ensuite conduit à l'évaluation des caractéristiques de binding des polymères imprimés **IP_{T4}** et **IP_{T5}**, ainsi que du polymère de contrôle **CP_{T4}** avec le glucose, le template original.

8.5. Evaluation des propriétés de reconnaissance des polymères imprimés IP_{T4} et IP_{T5}.

La capacité d'un polymère imprimé à reconnaître sélectivement un analyte par rapport à un polymère de contrôle (effet d'empreinte) est l'une des propriétés les plus importantes de ces matériaux. Cette affinité particulière pour un analyte permet l'application des MIP dans différents secteurs tels que la chromatographie²⁷, la détection des molécules d'intérêt biologique⁵, la catalyse¹¹⁶. Ainsi, nous avons évalué dans un premier temps la capacité expérimentale et l'effet d'empreinte des polymères imprimés **IP_{T4}**, **IP_{T5}** à complexer un dérivé du glucose. Nous avons choisi comme molécule cible le composé **40** (Figure 66), substitué en position anomérique par un groupement phényle. De cette façon, la molécule cible présente un chromophore détectable par UV, facilitant ainsi les analyses et les quantifications par CLHP.

Par ailleurs, une série d'épimères du glucose (Figure 66), a été synthétisée dans le but d'évaluer la sélectivité du polymère imprimé **IP_{T4}** par rapport au template "originale" **40**.

8.5.1. Capacité et effet d'empreinte des polymères imprimés IP_{T4} et IP_{T5}

Nous avons d'abord étudié les capacités de reconnaissance moléculaire des polymères imprimés **IP_{T4}** et **IP_{T5}** avec la molécule cible **40**, en traçant la concentration de l'analyte liée aux polymères imprimés **IP_{T5}** (Figure 64a) et **IP_{T4}** (Figure 64b) en fonction de la concentration initiale d'analyte **40** (**C**). La concentration d'analyte liée au polymère (**B**) a été mesurée après 24 heures d'incubation, pour une masse constante de polymère (10 mg), à température ambiante (22 °C) dans l'acétonitrile.

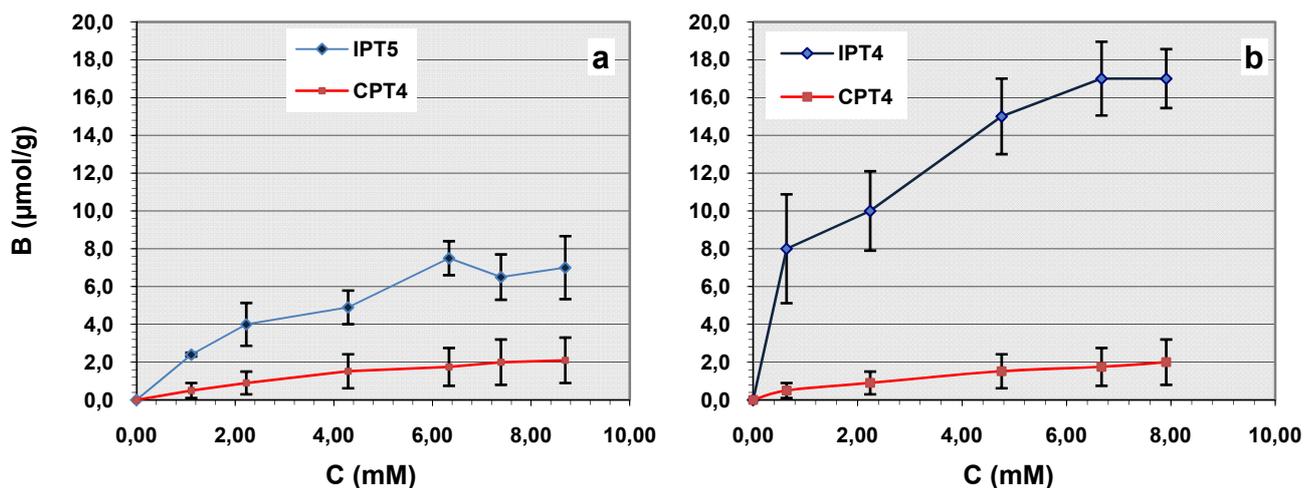


Figure 64. Reconnaissance spécifique (**B**) du monosaccharide **40** dans l'acétonitrile par les polymères imprimés IP_{T5} (**a**) et IP_{T4} (**b**) respectivement.

Dans les conditions de saturation ($C = 6.67$ mM), la reconnaissance de la molécule **40** avec le polymère imprimé IP_{T4} (Figure 64b) atteint une valeur de 17.0 ± 1.5 µmol/g, tandis que la reconnaissance avec le polymère imprimé IP_{T5} (Figure 60a) atteint une plus faible capacité (7.5 ± 1.0 µmol/g) à une concentration initiale similaire d'analyte **40**. La plus faible reconnaissance moléculaire du polymère imprimé IP_{T5} s'explique par le taux d'agrégation important de IP_{T5} , ce qui exclut une bonne accessibilité et diffusion du pyranoside **40** à l'intérieur des cavités. La présence d'hexadécane au cours de la polymérisation en mini-émulsion contribue donc à la préparation d'un matériau qui présente des meilleures propriétés physico-chimiques (polydispersité, diamètre des particules, morphologie) ainsi qu'une meilleure capacité à reconnaître l'analyte correspondante.

Nous avons été très encouragés par le fait que la reconnaissance du monosaccharide **40** avec le polymère de contrôle CP_{T4} (courbe rouge dans la figure 64b) est extrêmement faible (1.75 ± 1.0 µmol/g) lorsque la concentration initiale d'analyte **40** est de 6.67 mM. En accord avec la littérature³⁴ (voir aussi la partie 3.2, page 33), le facteur d'impression **I**, qui permet d'évaluer combien de fois le composé **40** est reconnu par le polymère imprimé IP_{T4} par rapport au polymère de contrôle, a été calculé. Le facteur a une valeur de 9.9 à la concentration d'analyte de 6.67 mM. Ce résultat confirme l'importance des quatre fonctions acides disposées spatialement dans la cavité du MIP pour former des liaisons hydrogènes multiples avec le monosaccharide **40**. Contrairement au polymère de contrôle CP_{T4} , où les fonctions acides carboxyliques sont distribuées de façon aléatoire sur la surface des nanosphères et n'offrent pas d'interactions multiples avec l'analyte **40**. Il se pourrait, qu'il y ait également un effet coopératif lors de la reconnaissance moléculaire entre le monosaccharide **40** et IP_{T4} . L'efficacité de la reconnaissance moléculaire entre le monosaccharide

40 et le polymère imprimé **IP_{T4}** grâce aux acides carboxyliques présents à l'intérieur du polymère imprimé à été vérifiée par des tests d'inhibition du binding par post-modification.

8.5.2. Inhibition de la reconnaissance moléculaire par estérification des fonctions acides

L'affinité des MIP pour un analyte est généralement évaluée par des tests de reconnaissance moléculaire afin de connaître la quantité d'analyte liée au polymère imprimé. Une autre technique pour démontrer les propriétés de reconnaissance moléculaire des MIP est la post-modification de la forme des cavités par effet thermique, ou la transformation chimique des groupes fonctionnels créés dans ces cavités après le processus d'impression moléculaire¹²². Cette méthode a pour effet d'annihiler les propriétés de reconnaissance des MIP.

Afin de prouver l'accessibilité et l'efficacité des acides carboxyliques à la surface des particules du polymère **IP_{T4}**, nous avons effectué une réaction d'estérification de ces fonctions en présence de triméthylsilyldiazométhane (TMSD), dans un mélange MeOH / Toluène (Figure 65). Après 1h d'agitation, une solution d'acide acétique est ajoutée dans le mélange réactionnel. Ensuite, les nanosphères estérifiées **IP_E** sont récupérées par centrifugation et lavées plusieurs fois avec un mélange acétonitrile / eau 1:1 (v/v). Après séchage sous vide pour une nuit, le polymère estérifié **IP_E** est lyophilisé avant d'être testé dans la reconnaissance du monosaccharide **40**.

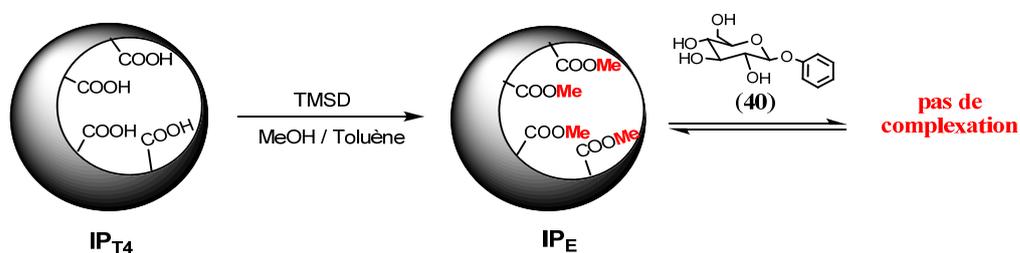


Figure 65. Post-estérification des fonctions acides carboxyliques dans le polymère imprimé **IP_{T4}**.

L'incubation de 10 mg du polymère estérifié **IP_E** dans 1 ml d'acétonitrile (6.67 mmol) contenant le monosaccharide **40**, à température ambiante (22 °C), pendant 24 h, a montré une capacité très faible de 1-2 $\mu\text{mol/g}$, alors qu'avant estérification elle était de 17.0 $\mu\text{mol/g}$. Cette perte des propriétés de reconnaissance moléculaire sont dues à l'impossibilité du polymère **IP_E** d'engager des liaisons hydrogènes avec le dérivé du glucose **40**.

Ayant démontré l'effet d'empreinte du polymère imprimé **IP_{T4}**, nous avons ensuite étudié sa sélectivité vis-à-vis des autres épimères du glucose (Figure 66).

8.5.3. Evaluation de la sélectivité du polymère imprimé IP_{T4}

La capacité du polymère imprimé IP_{T4} à reconnaître sélectivement le glucopyranoside **40**, a ensuite été étudié en comparant les propriétés de complexation du polymère avec d'autres analogues représentés dans la figure 66.

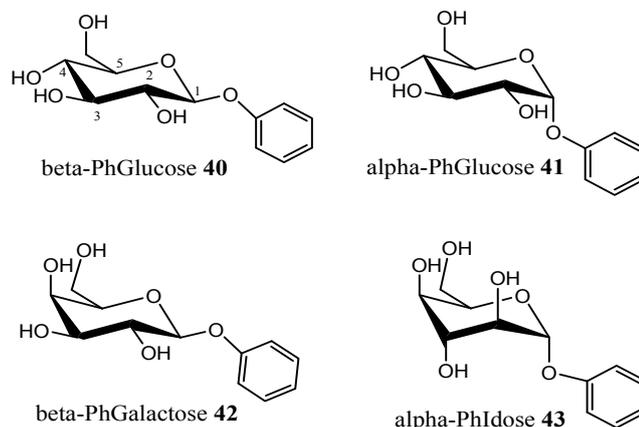


Figure 66. Structure des monosaccharides utilisés dans les tests de reconnaissance.

Expérimentalement, 10 mg des polymères de contrôle CP_{T1} , CP_{T4} et du polymère imprimé IP_4 ont été incubées séparément avec un 1 ml d'une solution d'acétonitrile 6.67 mmol des monosaccharides **41**, **42** et **43** (Figure 66), selon la même procédure utilisée pour le glucopyranoside **40**. Les résultats sont représentés dans l'histogramme de la figure 67.

La capacité pour le α -glucopyranoside **41** atteint la valeur de $12.8 \pm 2.2 \mu\text{mol/g}$. D'après ce résultat, il semble que la stéréochimie de l'atome de carbone anomérique du sucre ne semble pas être un élément discriminant important lors de la complexation MIP-monosaccharide, puisque seule une différence de $3.9 \mu\text{mol/g}$ entre les deux anomères **40** et **41** a été observée (Figure 67).

Ce résultat est en parfait accord avec nos prédictions compte tenu que l'empreinte a été créée à partir du template **T4**, qui possède une conformation β . La faible différence observée entre la reconnaissance moléculaire des deux anomères peut être attribuée à la forme des cavités à l'intérieur du polymère imprimé IP_{T4} .

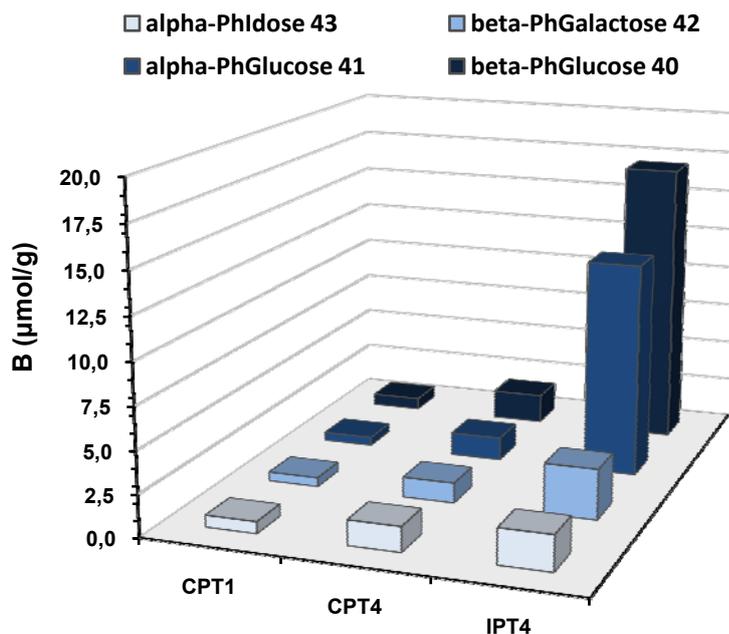


Figure 67. Reconnaissance moléculaire des monosaccharides **40**, **41**, **42** et **43** avec les polymères de contrôle **CP_{T1}**, **CP_{T4}** et le polymère imprimé **IP_{T4}** à la concentration de 6.67 mM dans l'acétonitrile.

Pour les monosaccharides **42** et **43** le maximum de reconnaissance moléculaire avec le polymère imprimé **IP_{T4}** est de 3.0 ± 1.7 et 2.1 ± 0.8 $\mu\text{mol/g}$, respectivement. Dans le cas de la reconnaissance moléculaire du monosaccharide **42**, le changement de la stéréochimie d'un seul carbone (C_4) empêche d'avoir une bonne reconnaissance avec les sites d'interactions du polymère imprimé **IP_{T4}**. Ainsi, dans le cas de l'analogue **43**, où la stéréochimie de carbone C_2 , C_3 et C_4 est inversé par rapport au glucose **40**, la reconnaissance moléculaire avec le polymère imprimé **IP_{T4}** est encore plus faible que celle mesurée avec l'analyte **42**. Ces derniers résultats suggèrent que la formation de quatre liaisons hydrogènes multiples entre le monosaccharide **40** et les fonctions acide carboxylique présentes dans les sites d'interactions du polymère imprimé **IP_{T4}**, sont indispensable pour avoir une bonne affinité et sélectivité. En accord avec ce qui a été rapporté par le groupe de Striegler⁷⁶ (voir aussi la partie 3.2, page 33), les facteurs de sélectivité α pour le glucopyranoside **40** par rapport aux autres analytes **42** et **43** ont été calculés à 6.5 et 9.6, respectivement.

À ce jour, différents travaux ont été consacrés à la préparation de polymères imprimés très sélectif vis-à-vis des monosaccharides (voir chapitre 2, page 109). La plupart de ces polymères imprimés, ont été préparés exclusivement par polymérisation en masse, en utilisant l'approche covalente par formation d'esters boroniques réversibles, l'approche par coordination avec un métal de transition (Cu, Zn) et l'approche non-covalent basée sur les liaisons hydrogènes réversibles. A notre connaissance, le facteur de sélectivité glucose/galactose ($\alpha_{40-42} = 6.5$) calculé pour le polymère

imprimés **IP_{T4}** est le facteur le plus élevé rapporté à ce jour, comparativement aux données disponibles pour un approche non-covalent avec des polymères imprimés basé sur un complexe porphyrine-Zn²⁺, proposé par le groupe de Shimizu¹¹⁷.

Le fait que le polymère imprimé **IP_{T4}** présente de bonnes sélectivités pour le glucopyranoside **40** par rapport aux autres épimères **42** et **43**, suggère fortement que le facteur dominant pour la reconnaissance des analytes, dépend essentiellement de l'orientation des groupes carboxyliques à l'intérieur des sites d'interaction du polymère imprimé^{14,114}. Contrairement aux MIP préparés par polymérisation en masse avec une approche non covalente, impliquant des interactions ioniques¹¹⁵, et aux MIP préparés par une approche utilisant des liaisons de coordination avec un métal⁴³, qui ont révélé que la stéréochimie de la position anomérique est un paramètre crucial pour une bonne sélectivité.

Après la mise en évidence de l'effet d'impression et de la sélectivité du polymère **IP_{T4}**, nous avons décidé, pour une meilleure caractérisation de la surface du polymère imprimé, d'étudier les cinétiques de binding.

8.6. Etude cinétique pour le polymère imprimé IP_{T4}

Jusqu'à présent, la concentration d'analyte reconnu par les polymères imprimés a été déterminée après un temps d'incubation de 24h. Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer la capacité du polymère imprimé **IP_{T4}** pour l'analyte **40** en fonction du temps.

L'étude cinétique a été conduite en traçant la concentration d'analyte **40** liée au polymère **IP_{T4}** (**B**) en fonction du temps d'incubation (Figure 68). Les essais ont été réalisés à la même concentration en monosaccharide **40** (6.67 mM), dans des "batch" indépendants pour une masse constante de polymère imprimé **IP_{T4}** (10 mg).

Il est intéressant de noter, que l'équilibre de complexation est atteint après 5h d'incubation à 22 °C, ce qui suggère une diffusion relativement efficace et rapide de la molécule **40** vers les sites d'interactions présents à la surface des nanosphères.

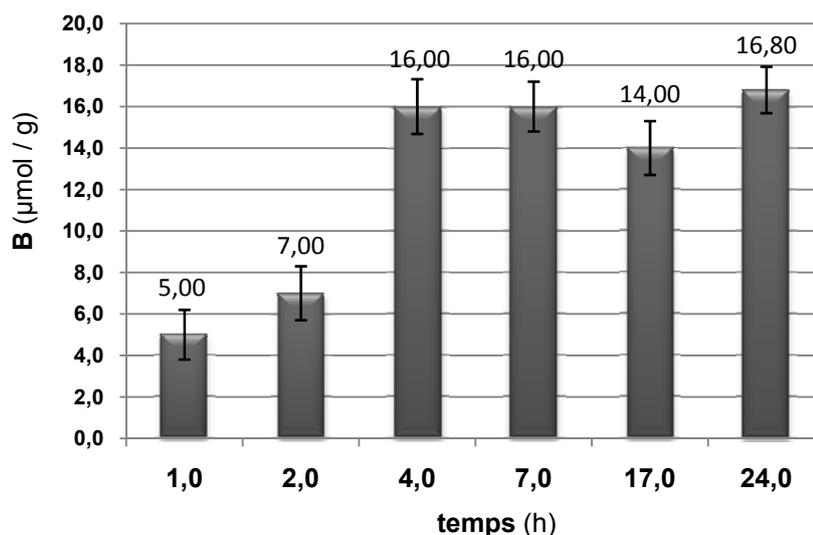


Figure 68. Etude cinétique pour le polymère imprimé IP_{T4} avec le glucopyranoside **34**.

Par rapport à la littérature, rapportant des expériences cinétiques impliquant des polymères imprimés préparés par la polymérisation en masse, ce temps d'équilibre peut être considéré comme rapide, puisque généralement 24 à 48 heures sont habituellement nécessaires pour établir l'équilibre polymère-analyte^{14,43,76}. Notons également que, dans ces conditions, la reconnaissance moléculaire de **40** par le polymère imprimé IP_{T4} atteint également une valeur maximale de $16.0 \pm 1.1 \mu\text{mol/g}$, conformément au résultat obtenu après 24h d'incubation ($17.0 \pm 1.5 \mu\text{mol/g}$).

8.7. Caractérisation de l'homogénéité des sites d'interaction du polymère imprimé IP_{T4}

Suite à l'étude cinétique, l'isotherme de complexation précédemment tracée après 24h d'incubation (Figure 64b), a été répétée pour 5h d'incubation dans les mêmes conditions expérimentales.

De façon générale, le traitement des ces données par des modèles mathématiques (Langmuir, Freundlich), permet de donner des informations qualitatives et quantitatives sur la nature (homogène ou hétérogène) des sites de reconnaissance de MIP.

Dans un premier temps le traitement des données avec le logiciel GraphPad Prism (version 3.02), permet de calculer pour un « one binding site model » comme meilleur modèle d'approximation, une constante de dissociation (K_D) de $1158 \pm 300 \mu\text{M}$, associée à une capacité maximale de $21.2 \pm 1.3 \mu\text{mol/g}$ (Figure 69).

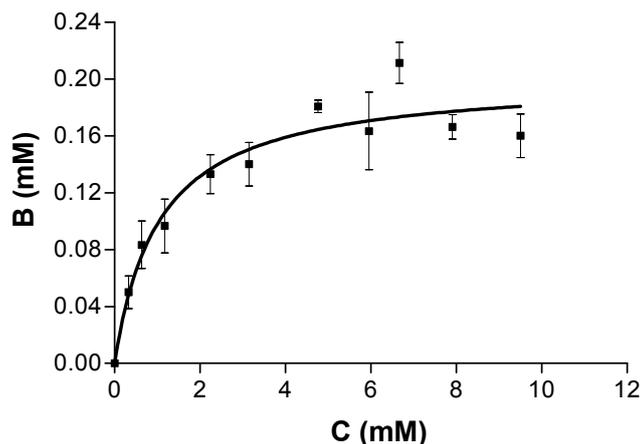


Figure 69. Courbe isotherme de complexation pour le polymère imprimé IP_{T4} après 5h d'incubation obtenue après traitement par le logiciel GraphPad Prism.

Cependant, l'erreur associée à la valeur de K_D révèle que le traitement des données est aberrant et pas adapté. En effet, le traitement des données avec le logiciel GraphPad Prism, est généralement applicable pour l'étude des systèmes biologiques homogènes tels que des enzymes ou des anticorps. L'application d'un modèle plus précis permettant de caractériser de façon plus rationnelle l'homogénéité des sites d'interaction de nos MIP est nécessaire. À ce sujet, des études intéressantes sur la caractérisation des sites de reconnaissance des MIP, ont été réalisés par le groupe de Shimizu^{27b,31}. Différents modèles mathématiques sont appliqués tels que le modèle de Langmuir et Freundlich, pour étudier les caractéristiques d'homogénéité des MIP préparés selon différentes approches covalentes et non-covalentes. La conclusion de ce travail a été que la plupart des polymères imprimés montre une hétérogénéité des sites de reconnaissance, et que cette hétérogénéité est moins marquée pour les MIP préparés par approche covalente.

Très peu de systèmes d'impression moléculaires sont connus dans la littérature pour avoir une distribution homogène des sites de reconnaissance^{33,118}. L'exemple le plus intéressant a été rapporté par Whitcombe en 1995, pour des polymères imprimés préparé par approche semi-covalente avec un espaceur sacrifié, utilisés pour la reconnaissance moléculaire du cholestérol³³. Les sites de reconnaissance ont montré une haute homogénéité avec une constante de dissociation de 0.59 ± 0.12 mM et une capacité expérimentale de 114 ± 6 $\mu\text{mol/g}$.

Pour bien caractériser les sites d'affinité du polymère IP_{T4} , nous avons traitées les données obtenues lors de la reconnaissance moléculaire du monosaccharide **40** avec le modèle mathématique de Langmuir et de Freundlich.

8.8. Application des modèles Langmuir et Freundlich au polymère imprimé IP_{T4}

Dans l'introduction de ce manuscrit, nous avons présenté les modèles mathématiques permettant de caractériser la nature des sites d'interactions des polymères imprimés (voire partie 3.3, page 34). Dans ce paragraphe nous allons à appliquer ces modèles aux données obtenues avec le polymère imprimé IP_{T4} lors de la reconnaissance du glucopyranoside **40**.

La première étape, consiste à construire le graphique du « scatchard plots » en traçant l'évolution du rapport B/F (B = concentration reconnue par le polymère tandis que F = concentration libre d'analyte en solution) en fonction de la concentration reconnue par le polymère (B). Tous les systèmes d'empreintes moléculaires coïncidentes à une régression linéaire entre le rapport B/F en fonction de la concentration libre F , sont caractérisés par un modèle homogène de sites d'affinité^{77a}. Malheureusement, comme la plupart des MIP, la reconnaissance moléculaire du monosaccharide **40** par le polymère imprimé IP_{T4} , ne suit pas le modèle homogène de sites d'affinité. Le graphique du « scatchard plots » obtenu pour ce polymère est représenté dans la figure 70. Les points expérimentaux sont interprétables par un modèle hétérogène de sites d'affinité, décrit comme le modèle de Bi-Langmuir.

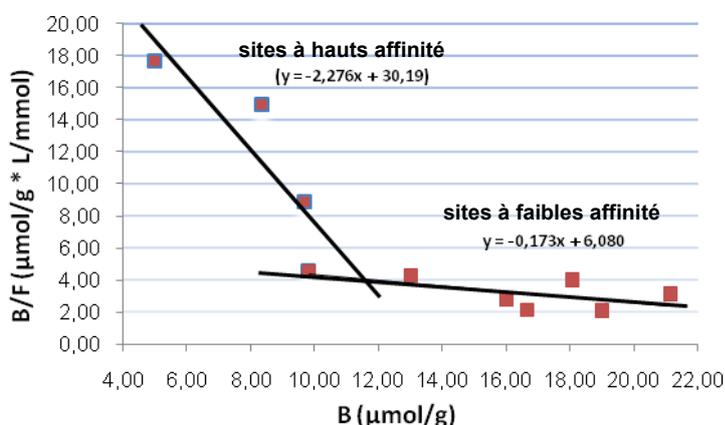


Figure 70. Le modèle Bi-Langmuir appliqué au polymère imprimé IP_{T4} .

Deux droites peuvent être différenciées, l'une correspondant à des sites à haute affinité et l'autre à des sites à faible affinité. La pente de ces deux droites correspond à la constante d'affinité. Pour les sites à hautes affinités la constante de dissociation K_D est de $439 \mu\text{M}$, et pour les sites à faibles affinités est de $5780 \mu\text{M}$.

Cependant, ce dernier moyen d'analyse est trop simple pour caractériser avec précision l'hétérogénéité des sites d'interactions du polymère imprimé IP_{T4} . En accord avec la

littérature^{31,73,74} (voir aussi partie 3.3, page 34), les courbes isothermes de reconnaissance moléculaire sont analysées avec l'équation de « Freundlich » ($\mathbf{B} = \mathbf{aF}^m$).

Tout d'abord, la reconnaissance du monosaccharide **40** par le polymère imprimé \mathbf{IP}_{T4} est représentée sous la forme de $\log \mathbf{B}$ en fonction de $\log \mathbf{F}$ (Figure 71a). La ligne droite obtenue correspond à l'équation « Freundlich » sous sa forme logarithmique :

$$\log \mathbf{B} = m \log \mathbf{F} + \log \mathbf{a}$$

où \mathbf{m} et \mathbf{a} sont respectivement deux paramètres correspondants à la pente et à la valeur de $10^{(y\text{-intersection})}$ de la ligne droite obtenue. Ces deux variables permettent de calculer le nombre de sites d'interactions \mathbf{N}_i qui ont une certaine constante d'affinité \mathbf{K}_i , par l'équation suivante :

$$\mathbf{N}_i = 2.3 \mathbf{a} \mathbf{m} (1 - m^2) \mathbf{K}_i^{-m} \quad (2)$$

En théorie selon l'équation **2** proposée précédemment, la distribution du nombre de sites d'interactions (\mathbf{N}_i) peut être calculée dans l'ensemble des constantes d'affinité \mathbf{K}_i . Dans la pratique, le minimum (\mathbf{K}_{\min}) et le maximum (\mathbf{K}_{\max}) de la distribution des constantes d'affinités sont donnés par les limites de concentration de l'analyte, utilisés lors des essais d'incubation avec le polymère imprimé :

$$\mathbf{K}_{\min} = 1 / \mathbf{F}_{\max}$$

$$\mathbf{K}_{\max} = 1 / \mathbf{F}_{\min}$$

La courbe de la distribution des sites d'affinité pour le polymère imprimé \mathbf{IP}_{T4} est représentée dans la figure 71b. Le nombre de sites d'interaction peut être calculé avec l'équation **3**, correspondant à la surface de la zone située sous la courbe de la distribution, entre les limites \mathbf{K}_{\min} et \mathbf{K}_{\max} (Figure 71b):

$$\mathbf{N}_{(\mathbf{K}_{\max}-\mathbf{K}_{\min})} = \mathbf{a} (1 - m^2) (\mathbf{K}_{\max}^{-m} - \mathbf{K}_{\min}^{-m}) \quad (3)$$

Dans le cas du polymère imprimé \mathbf{IP}_{T4} , le nombre de sites d'interactions selon l'équation **3** est de 14.5 $\mu\text{mol/g}$, ce qui est en accord avec nos données expérimentales déterminées après 5h d'incubation (16.6 $\mu\text{mol/g}$).

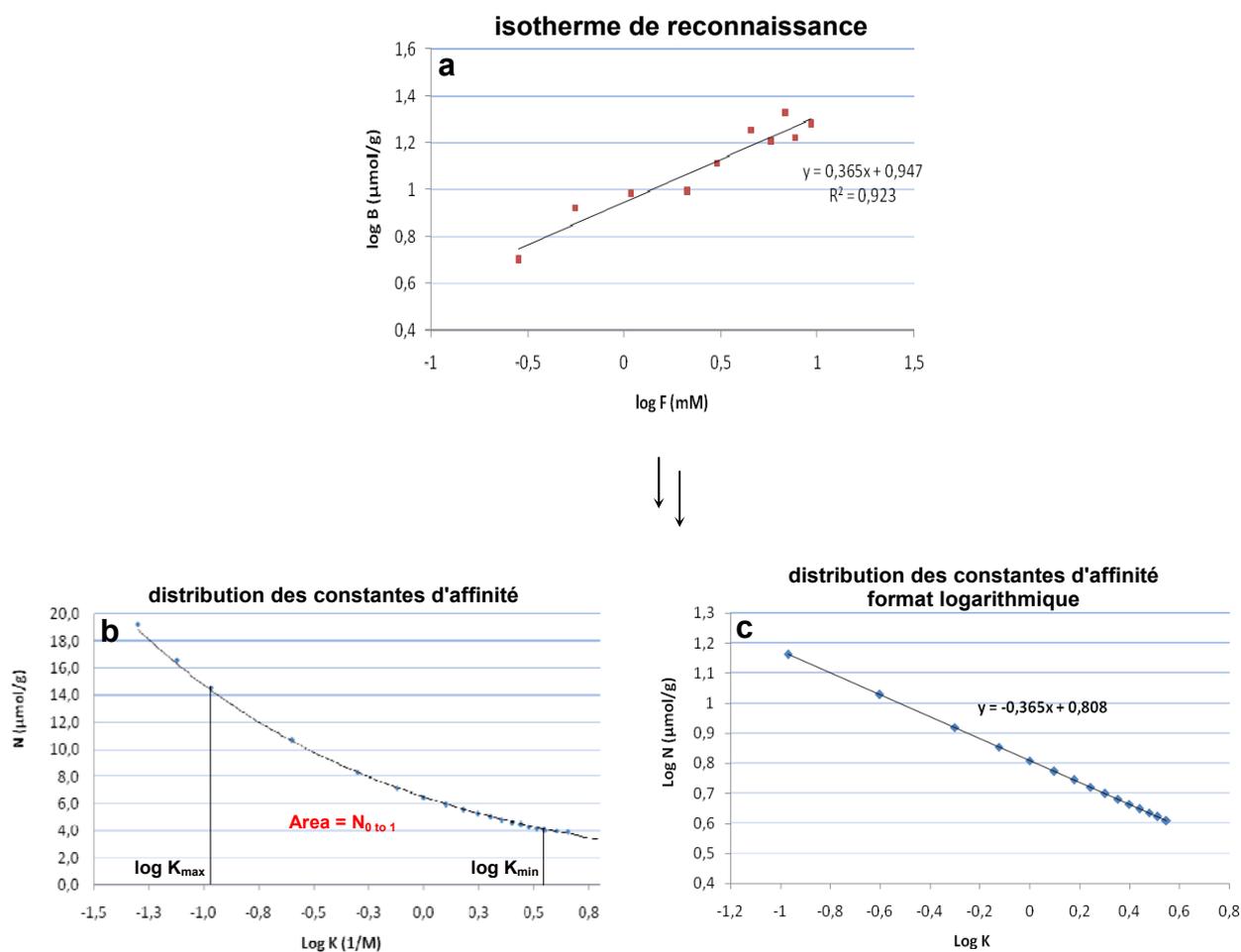


Figure 71. Représentation de l'équation « Freundlich » (a) et de la distribution des constantes d'affinité (b et c) pour la reconnaissance du glucopyranoside **40** par le polymère imprimé **IP_{T4}**.

L'application du modèle mathématique de « Freundlich » aux données obtenues lors de la reconnaissance moléculaire du monosaccharide **40** avec le polymère imprimé **IP_{T4}**, a permis de conclure que ce polymère imprimé montre différents types de sites d'interactions chacun avec une constante d'affinité K_i , comme décrit pour la plupart des MIP^{27b,31}. Contrairement aux enzymes ou aux anticorps, les sites d'interactions des polymères imprimés varient en taille, forme et rigidité, ce qui génère l'hétérogénéité des constantes d'affinités. Cette tendance est également observée pour le polymère **IP_{T4}**, préparé avec la combinaison de l'approche semi-covalente et de la technique de polymérisation en mini-émulsion.

À l'heure actuelle, à notre connaissance, peu de polymères imprimés pour la reconnaissance spécifique des sucres¹¹⁸, ont été caractérisés en utilisant les modèles mathématiques présentés précédemment. Bien que les mesures des constantes d'affinités sont sensibles à la méthode et aux conditions utilisées, les valeurs obtenues pour notre polymère imprimé **IP_{T4}**, sont raisonnablement

comparables avec celles rapportées dans la littérature, en particulier pour des récepteurs artificielles impliquant exclusivement des liaisons hydrogènes multiples comme éléments de reconnaissance¹²³.

8.9. Conclusions deuxième partie

La nouvelle méthode pour la préparation des polymères imprimés en surface, développée dans le laboratoire, a été appliquée avec succès dans la préparation de nouveaux récepteurs artificiels pour les monosaccharides, en particulier pour les dérivés du glucose.

Le polymère imprimé **IP_{T4}**, préparé à l'aide d'un template polymérisable basé sur le glucose, montre un excellent facteur d'impression et une sélectivité remarquable en comparaison à d'autres épimères, tels que le galactose ou l'idose. Le facteur de sélectivité entre le dérivé du glucose **40** et le dérivé du galactose **42** observé avec le polymère imprimé **IP_{T4}** est le plus élevé rapporté à ce jour.

Les sites d'affinité des polymères imprimés ont montré des propriétés d'hétérogénéité que nous avons caractérisées grâce à l'application de modèles mathématiques (Bi-Langmuir et Freundlich). L'hétérogénéité des sites d'interactions, signalée dans la plupart des polymères imprimés préparés par différentes techniques de polymérisation, est également observée pour nos polymères, issu de la combinaison de l'approche semi-covalente et de la technique de polymérisation en mini-émulsion.

Conclusion générale

Le travail présenté dans ce mémoire a été consacré au développement de l'approche semi-covalente pour la préparation de nanosphères imprimées en surface, par la technique de polymérisation en mini-émulsion "one stage". Nous avons mis au point une nouvelle méthode de préparation de nanosphères imprimées en surface, en combinant pour la première fois l'approche semi-covalente avec la technique de polymérisation en mini-émulsion "one stage".

Dans une première partie de ce manuscrit, nous avons synthétisé une série de templates phosphorés à la fois tensioactifs et polymérisables. Ces derniers ont été ensuite utilisés pour la préparation de polymères imprimés *via* une technique de polymérisation en mini-émulsion. Après extraction du template les polymères imprimés présentaient un nombre croissant de points d'ancrage (acides carboxyliques) à l'intérieur des sites de reconnaissance.

La série des MIP synthétisée a été caractérisée par des mesures physico-chimiques telles que la détermination de la surface spécifique (BET) la mesure de la polydispersité (par diffusion de la lumière) et la microscopie électronique à transmission (MET). La conclusion de ces analyses est que l'optimisation et la maîtrise du processus de mini-émulsification, a conduit à la formation de nanoparticules polymériques très homogènes dans leur forme et dans leur taille, et avec de faible valeur de polydispersité.

L'analyse élémentaire des polymères avant et après clivage du template, a confirmé que la difficulté majeure de l'approche semi-covalente réside dans la rupture des liaisons esters à l'intérieur de la matrice polymérique. En effet seulement 30 à 40% du template incorporé dans la matrice polymérique a pu être extrait. La fonctionnalisation en surface des nanosphères obtenues grâce à la mini-émulsion n'a donc pas permis d'améliorer le clivage des fonctions esters, malgré l'avantage supposé être attendu, d'accessibilité des ces fonctions en surface.

Les résultats de notre étude ont montré que chaque polymère imprimé reconnaît davantage l'analyte qui ressemble le plus au template ayant servi à faire l'empreinte. On remarque également qu'une augmentation du nombre d'acides carboxyliques à l'intérieur des sites de reconnaissance des nanosphères, permet d'obtenir un récepteur artificiel avec une meilleure sélectivité pour la reconnaissance des templates originaux. Dans le cas du polymère préparé avec une approche non-covalente purement hydrophobe, la complémentarité de forme entre l'empreinte et l'analyte est le facteur prédominant pour avoir des capacités et des sélectivités élevées.

Par ailleurs, nous avons également entrepris d'employer les polymères imprimés avec le template phosphorés, dans la discrimination faciale pour la réduction énantiosélective de cétones. Nous avons démontré que dans une cavité initialement préparée pour complexer un analyte tétraédrique tel qu'un phosphinate, il est possible également de reconnaître sélectivement une cétone qui possède une conformation planaire sp^2 . Par ailleurs, les tests de réduction asymétrique de cétones en présence du polymère chiral **IP_{ch}** restent encore à étudier plus en détail.

Dans la deuxième partie de ce mémoire, la nouvelle méthode pour la préparation des polymères imprimés en surface, a été appliquée avec succès à la préparation de nouveaux récepteurs artificiels du glucose. Pour ce faire, nous avons synthétisé un template tensioactif et polymérisable basé sur le glucose. La polymérisation de ce dernier dans les conditions de mini-émulsion, a conduit à la formation d'un polymère imprimé **IP_{T4}** présentant des sites de reconnaissance avec quatre acides carboxyliques. Le polymère imprimé **IP_{T4}** montre un excellent facteur d'impression et une sélectivité remarquable pour le dérivé du glucose, en comparaison à d'autres épimères. Le facteur de sélectivité entre le dérivé du glucose **40** et le dérivé du galactose **42** observé avec le polymère imprimé **IP_{T4}** est le plus élevé rapporté à ce jour.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'étude des propriétés d'homogénéité des sites de reconnaissance du polymère imprimé **IP_{T4}**. Les données de la reconnaissance moléculaire du glucose par **IP_{T4}**, ont été traitées par des modèles mathématiques tels que le Bi-Langmuir et le modèle de Freundlich. Les sites d'affinité du polymère imprimé **IP_{T4}**, créés par la combinaison de l'approche semi-covalente et de la technique de polymérisation en mini-émulsion ont montré des caractéristiques d'hétérogénéité similaires à celles des polymères imprimés décrits dans la littérature.

Partie expérimentale

Generalities

▪ Equipment:

^1H -NMR, ^{13}C -NMR spectra used for the characterization of the products were recorded on Bruker DPX200 et DPX300. Chemical shifts (δ) are quoted in parts per million and are calibrated relative to solvent residual peaks. Multiplicity are reported as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet, q = quadruplet br = broad.

Thin layer chromatography (TLC) was carried out using Merck silica gel plates 0.25 mm (Kieselgel 60 F₂₅₄, 40-60 μm , 230-400 mesh ASTM). TLC plates were visualized using a combination of UV lamps (254, 365 nm), followed by detection with *p*-anisaldehyde, ceric ammonium molybdate, ninhydrin, α -naphthol, iodine vapor.

Flash chromatography was performed using silica gel Merck Kieselgel (40-60 μm , 230-400 mesh ASTM).

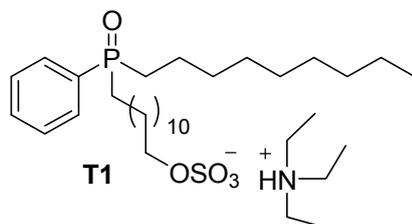
Mass spectra were recorded on a MS/MS high resolution Micromass ZABSpecTOF spectrometry. Infrared spectra of samples were taken using a Perkin-Elmer 2000 FT-IR spectrometer. The samples were prepared either film deposited on a pellet cesium iodide (CsI) or on a pellet of potassium bromide (KBr). The wave numbers are expressed in cm^{-1} .

The percentage of binding was measured by HPLC (Shimadzu LC 10 ADVP) using a Thermo Betasil Column (4,6 mm 5 μ BS diol 100) for the sucres analytes **40-43**, and a Zorbax 300SB-C₁₈ (5 μm , 4.6 x 250 mm) for phosphorous analytes

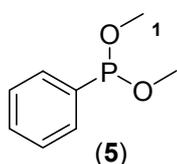
▪ Techniques:

All reactions were carried out under an argon atmosphere. Organic solvents were distilled under an argon atmosphere using standard drying agents or stored over molecular sieves (4Å). All starting material were purchased commercially and used without further purification. Commercially available styrene, divinyl benzene and methacrylic acid (MAA) were distilled before use. 2,2'-Azobisisobutyronitrile (AIBN) was recrystallized from methanol.

Synthesis of polymerizable surfactant template T1:



Synthesis of dimethyl phenylphosphonite 5:



To a solution of 39.0 ml (0.279 mol) of dichloro(phenyl)phosphonite in 150 ml of anhydrous hexane was added pyridine 48 ml (0.59 mol). Then the solution was cooled to 0 °C and a solution of 23 ml (0.56 mol) of MeOH in 8 ml of hexane was slowly added within 1 h. Stirring was continued for an additional hour. Then, the precipitated solid was filtered off and the filtrate was evaporated. Distillation of the residual oily liquid gave 36.7 g (77%) of a colourless oily liquid (b.p. 56-58 °C, $2.0 \cdot 10^{-1}$ mbar).

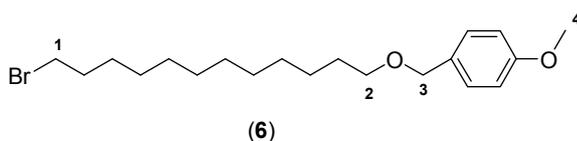
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 3.58 (d, 6 H, \underline{H}^1 , $J_{\text{P,H}} = 10.6$ Hz), 7.41-7.43 (m, 3 H, $\text{Ar}\underline{H}$), 7.62-7.57 (m, 2 H, $\text{Ar}\underline{H}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz) δ = 140.4 (d, $J_{\text{P-C}} = 9.8$ Hz), 129.9 (d, $J_{\text{P-C}} = 11.0$ Hz), 129.5, 128.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.0$ Hz), 54.1 (d, $J_{\text{P-C}} = 9.4$).

MM-ES (m/z): 170.4 $[\text{M}]^+$.

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 81.0 MHz) δ = 161.0 ppm.

Synthesis of 1-Bromo-12-*p*-methoxybenzyloxydodecane 6:



A suspension of 15.0 g (74.1 mmol) 1,12-dibromododecane, 2.05 g (14.8 mmol) *p*-anisylalcohol and 251 mg (0.74 mmol) of tetrabutylammonium hydrogensulfate in 14 ml of benzene and a solution of 2.96 g (74.1 mmol) NaOH in 6 ml of H_2O was heated to reflux for 39 h. After cooling down the mixture to r.t. 30 ml of H_2O were added and the mixture was extracted

with Et₂O (3x 25 ml). The combined organic phases were washed with 30 ml of brine, dried over MgSO₄, filtered and evaporated to give 16.0 g of a colourless oily liquid, which solidified after a while. Column chromatography on silica gel of the crude material (two columns: Cyclohexane/EA 95:5) yielded 4.10 g (72%) of a colourless oily liquid.

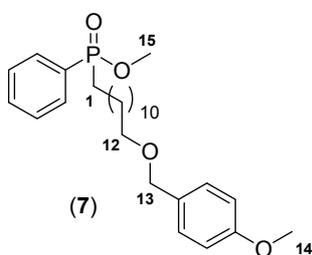
¹H-NMR (CDCl₃, 300.1 MHz) δ = 1.25-1.44 (m, 16 H, CH₂), 1.52-1.65 (m, 2 H, CH₂), 3.42-3.45 (m, 4 H, H¹ + H²), 3.81 (s, 3 H, H⁴), 4.42 (s, 2 H, H³), 6.87-6.90 (m, 2 H, ArH), 7.25-7.30 (m, 2 H, ArH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ = 26.3, 28.6, 29.2, 29.4, 29.6 (2C), 29.8, 30.9, 55.3 (C⁴), 70.3 (C²), 72.6 (C³), 113.8, 129.3, 130.9, 132.3, 148.2, 159.2.

MM-ES (m/z): 384.7 [M]⁺.

IR (neat): 3063, 3001, 2927, 2853, 1613, 1513, 1464, 1247, 1100, 821 cm⁻¹.

Synthesis of methyl 12-(4-methoxybenzyloxy)-dodecyl (phenyl) phosphinate 7:



A mixture of 856 mg (5.03 mmol) dimethyl phenylphosphonite **5** and 3.8 g (9.9 mmol) 1-bromo-12-*p*-methoxybenzyloxydodecane **6** was heated to 130 °C under vacuum (13 mbar) for 5 h. The remaining material was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EA 1:1 → EA) yielding 1.56 g (67%) of a pale yellow oil.

R_f = 0.34 (cyclohexane / ethyl acetate 3:7).

¹H-NMR (CDCl₃, 300.1 MHz) δ = 1.20-1.94 (m, 22 H, CH₂), 3.41 (t, 1H, H¹², J = 6.6 Hz), 3.59 (d, 3 H, H¹⁵, J_{P-C} = 10.9 Hz), 3.77 (s, 3 H, H¹⁴), 4.41 (s, 2 H, H¹³), 6.83-6.80 (m, 2H, ArH), 7.23-7.12 (m, 2H, ArH), 7.42-7.57 (m, 3 H, ArH), 7.71-7.83 (m, 2 H, ArH).

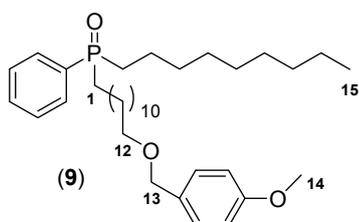
¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ = 21.7 (d, J_{P-C} = 4.5 Hz), 26.3, 28.6, 29.2, 29.4, 29.6 (2C), 29.8, 30.6 (d, J_{P-C} = 5.2 Hz), 30.9, 51.1 (d, J_{P-C} = 9.8 Hz, C¹⁵), 55.3 (C¹⁴), 70.3 (C¹²), 72.6 (C¹³), 113.8, 128.7 (d, J_{P-C} = 18.9 Hz), 129.3, 130.9, 131.8 (d, J_{P-C} = 14.3 Hz), 132.3, 159.2.

³¹P-NMR (CDCl₃, 121.5 MHz) δ = 47.0 ppm.

MM-ES (m/z): 483.7 $[M+Na]^+$.

IR (neat): 3105, 3001, 2927, 2853, 1613, 1514, 1248, 1038, 820, 555 cm^{-1} .

Synthesis of 12-(4-methoxybenzyloxy)-dodecyl nonyl (phenyl) phosphine oxide 9:



In a flame-dried 2-necked flask with reflux condenser and gas outlet tube were put 528 mg (21.7 mmol) of magnesium and some crystals of iodine and the mixture was heated with a heat gun. Then, a solution of 4.50 g (21.7 mmol) 1-bromononane dissolved in 15 ml of anhydrous THF was added dropwise with initial heating, until an exothermic reaction could be observed.

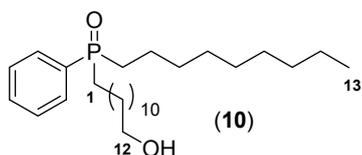
After complete addition the mixture was heated to 70 °C for 45 min. After this period nearly all Mg had dissolved. After cooling the reaction mixture to r.t. a solution of 2.00 g (4.34 mmol) methyl 12-(4-methoxybenzyloxy)dodecyl(phenyl)phosphinate 7 in 10 ml abs. THF was added and the mixture was heated to reflux for 21 h. After that time nearly complete conversion of the phosphonate could be observed by TLC. The mixture was cooled to r.t. and hydrolyzed with 10 ml of H₂O and subsequently 5 % HCl until all formed had dissolved. The mixture was extracted with ethyl acetate (4 x, Σ = 60 ml), the organic phases dried over MgSO₄, filtered and evaporated. Purification by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EA 70:30 → Cy/EA 1:1) furnished 1.95 g (80%) of a yellowish oil which solidified to a colourless solid.

¹H-NMR (CDCl₃, 200.1 MHz) δ = 0.89 (t, 3 H, H^{15} , J = 7.8 Hz), 0.98-2.07 (m, 38 H, CH_2), 3.45 (t, 1H, H^{12} , J = 6.6 Hz), 3.82 (s, 3 H, H^{14}), 4.45 (s, 2 H, H^{13}), 6.83-6.80 (m, 2H, ArH), 7.23-7.12 (m, 2H, ArH), 7.42-7.57 (m, 3 H, ArH), 7.71-7.83 (m, 2 H, ArH).

³¹P-NMR (CDCl₃, 81.0 MHz) δ = 45.9 ppm.

IR (neat): 3108, 3004, 2925, 2855, 1615, 1515, 1465, 1365, 1300, 1250, 1180, 820, 700 cm^{-1} .

Synthesis of 12-(Nonyl(phenyl)phosphoryl)dodecan-1-ol 10:



A solution of 9 (500 mg, 0.89 mmol) in DCM (10 ml) was cooled to 0°C and treated with H₂O (1 ml) and DDQ (1 g, 5 eq.). The mixture was stirred at 0 °C for 1h45 min, diluted with

DCM, washed with aqueous NaHCO₃ and aqueous saturated solution of NaHSO₄, and finally dried with Na₂SO₄. The resulting crude product was purified by chromatography (Cy/EA 1:1 → EA) yielding 1.07 g (86 %) of a yellow oil which solidified after standing for few days.

R_f = 0.32 (ethyl acetate).

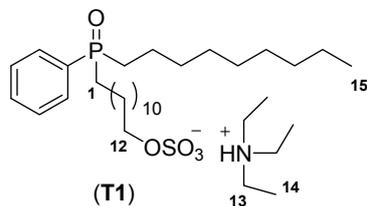
¹H-NMR (CDCl₃, 300.1 MHz) δ = 0.84 (t, 3 H, C¹³, J = 7.9 Hz), 1.19-2.02 (m, 38 H, CH₂), 3.63 (t, 2H, C¹², J = 6.6 Hz), 7.42-7.57 (m, 3 H, ArH), 7.71-7.83 (m, 2 H, ArH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3 MHz) δ = 13.9, 21.6, 22.4, 25.5, 28.9, 29.0, 29.2, 29.3, 29.4, 30.3, 30.7, 31.0, 31.6, 32.5, 62.6, 128.8, 129.0, 131.2, 131.9.

³¹P-NMR (CDCl₃, 121.5 MHz) δ = 44.5 ppm.

IR (neat): 3401, 3110, 2915, 2855, 1614, 1510, 1465, 1365, 1250, 1180, 820, 700 cm⁻¹

Synthesis of triethylammonium 12-(Nonyl(phenyl)phosphoryl)dodecyl sulfate T1:



To a suspension of 50 mg (0.115 mmol) phosphine oxide **10** in 2 ml of Et₂O at 0 °C were added 7.9 μl (0.115 mmol) of chlorosulfonic acid. After 13 min stirring at 0 °C the mixture was clear, after 1 h turbid again and 50 μl of abs. pyridine were added. The mixture was allowed to reach r.t. and stirred for an

additional hour. After evaporation of the solvent, the residual solid was dissolved in ethylacetate and the solution was acidified by half-conc. HCl and extracted with ethylacetate 4 times. The solvent was evaporated without drying and the resulting material redissolved in CH₂Cl₂ and treated with 1 ml of Et₃N. The solvent was evaporated again and the resulting material purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N 10:1:0.1) furnishing 50 mg (70%) of a colourless oil.

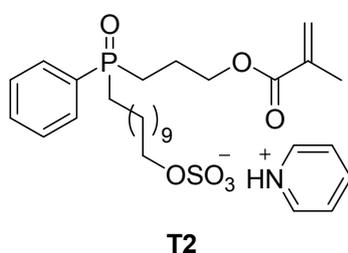
¹H-NMR (CDCl₃, 200.1 MHz) δ = 0.81 (t, 3 H, H¹⁵, J = 6.9 Hz) 1.16-2.00 (m, 47 H, CH₂), 3.12 (dq, 6 H, H¹³, J = 4.9, 7.3 Hz), 3.98 (t, 2 H, H¹², J = 6.7 Hz), 7.48-7.56 (m, 3 H, ArH), 7.70-7.74 (m, 2 H, ArH).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz) $\delta = 8.6$ (C^{14}), 13.9 (C^{15}), 21.25, 21.29, 22.5, 25.6, 28.9, 29.0, 29.1, 29.2, 29.3, 30.2, 30.7, 30.9, 31.6, 46.4 (C^{13}) 67.9 (C^{12}), 128.4 (d, $J_{\text{P-C}} = 10.6$ Hz), 130.2 (d, $J_{\text{P-C}} = 8.3$ Hz), 131.3, 132.5 (d, $J_{\text{P-C}} = 90.6$ Hz).

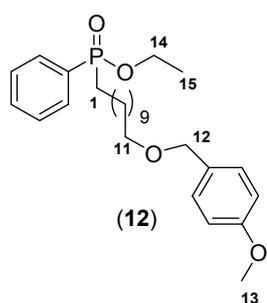
^{31}P -NMR (CDCl_3 , 121.5 MHz) $\delta = 46.5$ ppm.

IR (neat): 3101, 2915, 2855, 1610, 1461, 1365, 1110, 1250, 1180, 700 cm^{-1}

Synthesis of polymerizable surfactant template T2:



Synthesis of ethyl 11-(4-methoxybenzyloxy)-undecyl (phenyl) phosphinate 12:



Commercial ethyl phenylphosphinate (1.10 g, 6.47 mmol), alkene **11** (4 g, 1.2 eq.) and recrystallized AIBN (212 mg, 0.2 eq.) were dissolved in dry benzene under argon. The resulting mixture was heated at 80°C. After 16 h 30 min the reaction finished and the solvent was evaporated under vacuum. The compound was obtained as colourless oil (5.29 mmol, 82%) after purification by column chromatography on silica gel (EA: Cyclohexane 3:2).

$R_f = 0.41$ (cyclohexane / ethyl acetate 1:4).

^1H -NMR (CDCl_3 , 300.1 MHz): $\delta = 1.24$ (t, 3H, \underline{H}^{16} , $J = 7.2$ Hz), 1.18-1.91 (m, 20H, \underline{CH}_2), 3.38 (t, 2H, \underline{H}^{11} , $J = 6.4$ Hz), 3.73 (s, 3H, \underline{H}^{13}), 3.71-3.83 (m, 1H, \underline{H}^{14a}), 3.97-4.10 (m, 1H, \underline{H}^{14b}), 4.37 (s, 2H, \underline{H}^{12}), 6.80-6.83 (m, 2H, $\text{Ar}\underline{H}$), 7.12-7.23 (m, 2H, $\text{Ar}\underline{H}$), 7.39-7.52 (m, 3H, $\text{Ar}\underline{H}$), 7.70-7.76 (m, 2H, $\text{Ar}\underline{H}$).

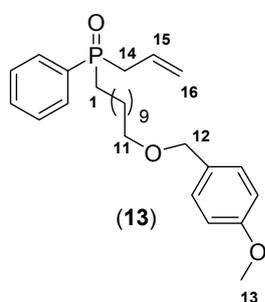
^{13}C -NMR (CDCl₃, 50.3 MHz): δ = 159.1, 132.1 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 11.7 Hz), 131.7, 131.5, 130.7, 129.1, 128.7, 128.4, 113.7, 72.5, 70.1, 60.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 26.4 Hz), 55.2, 30.8 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 20.5 Hz), 30.5, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 26.5 Hz), 29.0, 28.7, 26.2, 21.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 14.6 Hz), 21.0, 14.2.

^{31}P -NMR (CDCl₃, 81.0 MHz): 45.0 ppm.

MM-ES (m/z): 461.3 [M+H]⁺.

IR (neat): 3057, 2928, 2854, 1247, 1036 cm⁻¹.

Synthesis of 11-(4-methoxybenzyloxy)-undecyl allyl (phenyl) phosphine oxide **13**:



A stirred solution of the phosphinate **12** (2.15 g, 4.67 mmol) in dry THF (20 ml) under *vacuo* was cooled at 0 °C. After that, a solution 1M in THF of chloro-allylmagnesium (1.7 mL, 5 eq.) was added slowly. The colourless solution changed into bright orange, and after 3h 30 min, the reaction is finished. Then, water and HCl 1N were added, and the product was obtained (1.47 g, 69%) clean enough for the next step, as a colourless oil.

R_f = 0.28 (ethyl acetate).

^1H -NMR (CDCl₃, 300.1 MHz): δ = 7.70-7.03 (m, 2H, ArH), 7.52-7.42 (m, 2H, ArH), 7.12-7.25 (m, 2H, ArH), 6.80-6.75 (m, 2H, ArH), 5.75-5.66 (m, 1H, H^{15}), 5.16-5.06 (m, 2H, H^{16}), 4.39 (s, 2H, H^{12}), 3.76 (s, 3H, H^{13}), 3.39 (t, 2H, J = 6.4 Hz, H^{11}), 2.76 (dd, 2H, J = 7.5, 15.1 Hz, H^{14}), 2.01-1.19 (m, 20H, CH_2).

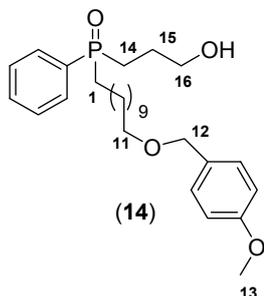
^{13}C -NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 159.1, 131.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 8.8 Hz), 130.8, 130.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 35.2 Hz), 129.1, 128.6, 128.5, 127.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 35.2 Hz), 120.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 48.4 Hz), 113.7, 72.5, 70.5, 70.2, 55.2, 36.9, 36.0, 31.0, 30.8, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 29.0, 28.2, 26.2, 21.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 17.6 Hz).

^{31}P -NMR (CDCl₃, 121.5 MHz): 38.1 ppm.

MM-ES (m/z): 457.4 [M+H]⁺.

IR (neat): 2927, 2854, 1636, 1613, 1513, 1248, 1175, 824 cm⁻¹.

Synthesis of 11-(4-methoxybenzyloxy)-undecyl 3-hydroxypropyl (phenyl) phosphine oxide **14**:



The phosphine oxide (137.6 mg, 0.311 mmol) was dissolved in THF (1.7 mL) and $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ 1.0 M in THF (398 μL , 1.28 eq.) was added slowly at room temperature. The reaction was stirred for 4h 40 min and then treated with aqueous NaOH (3 N, 1.2 mL) and 30 % aqueous H_2O_2 (1.2 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 30 min and subsequently diluted with Et_2O and H_2O . The layers were separated and the aqueous phase was further extracted with Et_2O (three

times). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The residue was purified (57.1 mg, 40%) by column chromatography on silica gel (DCM: MeOH, 20:1) and the expected product was obtained as a colourless oil.

$R_f = 0.28$ (ethyl acetate:MeOH 4:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300.1 MHz) $\delta = 7.72\text{-}7.66$ (m, 2H, ArH), 7.54-7.49 (m, 3H, ArH), 7.28-7.24 (m, 2H, ArH), 6.89-6.83 (m, 2H, ArH), 4.42 (s, 2H, \underline{H}^{12}), 3.80 (s, 3H, \underline{H}^{13}), 3.67 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz, \underline{H}^{16}), 3.42 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, \underline{H}^{11}), 2.12-1.21 (m, 24H, $\text{CH}_2 + \underline{H}^{14} + \underline{H}^{15}$).

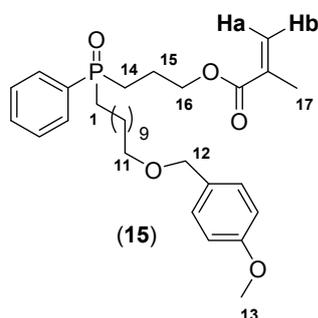
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): $\delta = 159.1, 131.9, 131.8$ (d, $J_{\text{P-C}} = 13.2$ Hz), 130.7, 130.7, 130.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 35.2$ Hz), 129.2, 128.8 (d, $J_{\text{P-C}} = 43.9$ Hz), 113.7, 72.5, 70.2, 62.1 (d, $J_{\text{P-C}} = 48.4$ Hz), 55.2, 30.9, 30.7, 30.2, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 29.0, 27.0, 26.1, 24.9 (d, $J_{\text{P-C}} = 17.6$ Hz), 21.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 13.2$ Hz), 18.2.

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 121.5 MHz): 43.4 ppm.

MM-ES (m/z): 475.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR (neat): 3350, 2926, 2986, 2853, 1613, 1513, 1248, 1172, 820 cm^{-1} .

Synthesis of 11-(4-methoxybenzyloxy)-undecyl 3-(methacryloyloxy)propyl (phenyl) phosphine oxide **15**:



To a solution of phosphine oxide **14** (186.9 mg, 0.406 mmol) in dry DCM (5 mL) were added Et₃N (140 μL, 2.5 eq.) and a catalytic amount of DMAP. The mixture was cooled to 0°C and then was added the methacrylic anhydride (90.6 μL, 1.5 eq.). The reaction mixture was then allowed to warm to room temperature, and after 3 h the reaction finished. Then, more DCM was added and washed with aqueous 1 N HCl, saturated aqueous NaHCO₃ and distilled

H₂O. The organic layer was dried with Na₂SO₄ and the solvent was evaporated. Purification by flash column chromatography on silica gel (EA: Cyclohexane, 9:1) yielded 92 mg (43%) of the final product **15**.

R_f = 0.38 (ethyl acetate).

¹H-NMR (CDCl₃, 300.1 MHz): δ = 7.72-7.66 (m, 2H, ArH), 7.52-7.46 (m, 3H, ArH), 7.28-7.24 (m, 2H, ArH), 6.89-6.84 (m, 2H, ArH), 6.06 (m, 1H, Ha), 5.55 (m, 1H, Hb), 5.30 (s, 2H, H¹²), 4.14 (t, 2H, J = 6.2 Hz, H¹⁶), 3.80 (s, 3H, H¹³), 3.42 (t, 2H, J = 6.5 Hz, H¹¹), 2.08-1.55 (m, 24H, CH₂ + H¹⁴ + H¹⁵).

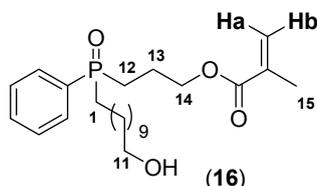
¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 167.3, 159.2, 136.2, 131.8, 130.9, 130.5 (d, J_{P-C} = 35.2 Hz), 129.3, 128.8 (d, J_{P-C} = 43.9 Hz), 125.7, 113.8, 72.6, 70.3, 64.6 (d, J_{P-C} = 61.5 Hz), 55.4, 31.1, 30.9, 30.6, 29.9, 29.7, 29.5, 29.4, 29.1, 27.1, 26.3, 26.1, 21.4 (d, J_{P-C} = 48.4 Hz), 18.4.

³¹P-NMR (CDCl₃, 121.5 MHz): 40.3 ppm.

MM-ES (m/z): 543.2 [M+H]⁺.

IR (neat): 2927, 2854, 1719, 1638, 1613, 1514, 1248, 1172, 819 cm⁻¹.

Synthesis of 11-(hydroxy)-undecyl 3-(methacryloyloxy)propyl (phenyl) phosphine oxide **16**:



A solution of **15** (496.6 mg, 0.888 mmol) in DCM (9.6 mL) was cooled to 0 °C and treated with H₂O (1.1 mL) and DDQ (1 g, 5 eq.). The mixture was stirred at 0°C for 1 h 45 min, diluted with DCM, washed with aqueous NaHCO₃ and aqueous saturated solution of NaHSO₄, and finally dried with Na₂SO₄. The residue was purified

(322.1 mg, 86 %) by column chromatography on silica gel (EtOAc:MeOH 1%) and the product **16** is obtained as a yellow oil.

$R_f = 0.33$ (ethyl acetate:MeOH 5%).

¹H-NMR (CDCl₃, 300.1 MHz): $\delta = 7.72-7.66$ (m, 2H, ArH), 7.55-7.47 (m, 3H, ArH), 6.07 (br.s, 1H, Ha), 5.55 (br.s, 1H, Hb), 4.16-4.08 (m, 2H, H¹⁴), 3.63 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, H¹¹), 2.04-1.22 (m, 27H, CH₂, H¹² + H¹³ + H¹⁵).

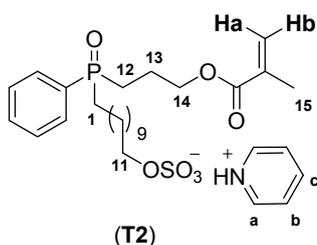
¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3 MHz): $\delta = 167.0, 135.9, 132.6, 131.6$ (d, $J_{P-C} = 11.7$ Hz), 130.7, 130.4 (d, $J_{P-C} = 35.1$ Hz), 128.7, 128.5, 125.5, 64.4 (d, $J_{P-C} = 61.5$ Hz), 62.3, 32.7, 30.8, 30.5 (d, $J_{P-C} = 17.6$ Hz), 29.3 (d, $J_{P-C} = 20.5$ Hz), 29.1, 28.9, 26.9, 25.7, 25.6, 21.2 (d, $J_{P-C} = 17.6$ Hz), 21.0 (d, $J_{P-C} = 14.6$ Hz), 18.1.

³¹P-NMR (CDCl₃, 81.0 MHz): 40.6 ppm.

MM-ES (m/z): 423.3 [M+H]⁺.

IR (neat): 3375, 2927, 2854, 1719, 1637, 1438, 1297, 1168.9, 813 cm⁻¹.

Synthesis of pyridinium 11-(3-(methacryloyloxy)propyl (phenyl) phosphoryl)undecyl sulfate **T2**:



Hydroxy phosphine oxide **16** (277 mg, 0.656 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (20 ml) in a flask equipped with a reflux condenser. Then the sulfur trioxide-pyridine complex (209 mg, 1.31 mmol) was added and the mixture heated at reflux for 30 min. The mixture was then cooled at 0 °C, filtered and the solvent was evaporated to give

0.320 g of pyridinium sulfate **T2** (84%) as clear wax.

¹H-NMR (CDCl₃, 200.1 MHz): δ = 8.96 (d, 2H, ArH^b, J = 3.5 Hz), 8.49 (t, 1H, ArH^c, J = 5.3 Hz), 8.0 (app.t, 2H, ArH^a, J = 4.3 Hz), 7.71-7.66 (m, 2H, ArH), 7.52-7.31 (m, 3H, ArH), 6.06 (br.s, 1H, Ha), 5.55 (br.s, 1H, Hb), 4.15-4.09 (m, 4H, H¹¹ + H¹⁴), 2.04-1.22 (m, 27H, CH₂, H¹² + H¹³ + H¹⁵).

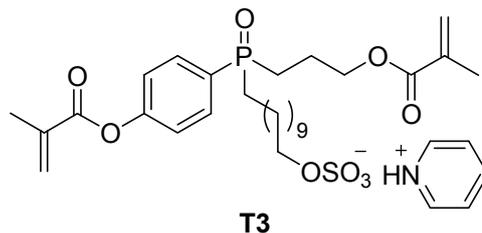
¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3 MHz): δ = 167.0, 146.3, 142.1, 135.9, 132.6, 131.6 (d, J_{P-C} = 11.7 Hz), 130.7, 130.4 (d, J_{P-C} = 35.1 Hz), 128.7, 128.5, 125.5, 64.4 (d, J_{P-C} = 61.5 Hz), 62.3, 32.7, 30.8, 30.5 (d, J_{P-C} = 17.6 Hz), 29.3 (d, J_{P-C} = 20.5 Hz), 29.1, 28.9, 26.9, 25.7, 25.6, 21.2 (d, J_{P-C} = 17.6 Hz), 21.0 (d, J_{P-C} = 14.6 Hz), 18.1.

³¹P-NMR (CDCl₃, 121.5 MHz): 41.5 ppm.

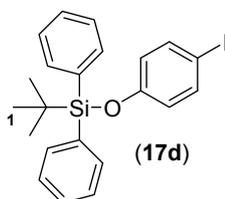
MM-ES (m/z): 423.3 [M- (C₅H₆N)⁺- sulphate(SO₃)⁻ +H]⁺.

IR (neat): 3449, 3136, 3067, 2927, 2854, 1716, 1637, 1488, 1437, 1297, 1253, 1170, 1120, 759, 687 cm⁻¹.

Synthesis of polymerizable surfactant template **T3**:



Synthesis of tert-butyl(4-iodophenoxy)diphenylsilane **17d**:



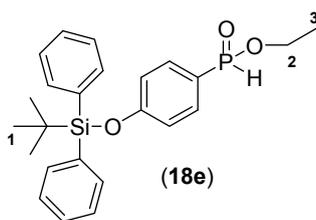
To a solution of iodophenol (1 g, 4.54 mmol) in dry DCM (10 mL) at rt, was added slowly TBDPSCI (1.53 mL, 1.3 eq.) under argon. After Et₃N (1.26 mL, 2 eq.) and catalytic amount of DMAP are added, while a white precipitate was formed. The reaction was finished after 1h. Filtration of the solid, evaporation of the solvent under vacuum, and purification by column chromatographic on silica gel (EA: Cyclohexane, 1:9), afforded the corresponding compound **17d** (1.66 g) with 80% yield.

¹H-NMR (CDCl₃, 200.1 MHz): δ = 7.84-7.80 (m, 4H, ArH), 7.52-7.44 (m, 8H, ArH), 6.68-6.64 (m, 2H, ArH), 1.22 (s, 9H, 3 x H¹).

¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3 MHz) δ = 155.6, 138.2, 135.5, 132.5, 130.2, 128.0, 122.2, 83.7, 26.6, 19.5.

MM-ES (*m/z*): 459.1 [M+H]⁺.

Synthesis of ethyl 4-(tert-butylidiphenylsilyloxy) phenyl phosphinate **18e**:



To a suspension of Pd(OAc)₂ (37 mg, 10 mmol %) in THF (1 mL) was added slowly triethylsilane (25 μL, 10 mmol %) and the solution was turned into black immediately. At the same time, in another flask, to a suspension of anilinium hypophosphite (0.77 g, 3 eq.) was added 3-aminopropyltriethoxysilane (1.16 ml, 3 eq.) in THF (15 mL) at 80°C. This solution was added slowly to the first

flask solution and the mixture was heated at 80°C. After that, we added DABCO (185 mg, 1 eq.) and the starting material (758 mg, 1.65 mmol). After 3 h, the mixture was cooled to rt, diluted with EtOAc and washed successively with HCl (1 M). The organic phase was extracted with saturated aq NaHCO₃ and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The compound **18e** was obtained as a colorless oil (0.938 mmol, 57%) after purification by column chromatography on silica gel (EA: Cyclohexane 9:1).

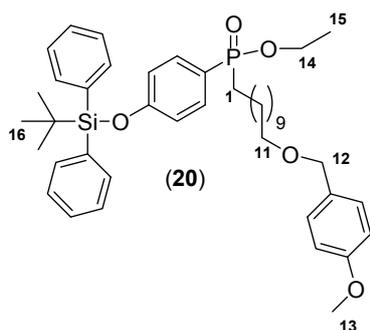
¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ = 7.70-7.67 (m, 4H, ArH), 7.57-7.33 (m, 8H, ArH), 7.49 (d, 1H, *J* = 560 Hz, PH), 6.88-6.82 (m, 2H, ArH), 4.17-4.03 (m, 2H, H²), 1.34 (t, 3H, *J* = 6.8 Hz, H³), 1.10 (s, 9H, 3 x H¹).

¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3 MHz) δ = 159.0, 135.1, 132.6 (d, *J*_{P-C} = 52.7 Hz), 131.7, 130.0, 127.7, 119.9 (d, *J*_{P-C} = 58.6 Hz), 61.4 (d, *J*_{P-C} = 26.4 Hz), 26.2, 19.2, 16.1 (d, *J*_{P-C} = 26.4 Hz).

³¹P-NMR (CDCl₃, 121.5 MHz): 24.8 ppm.

MM-ES (*m/z*): 424.1 [M]⁺.

Synthesis of ethyl 4-(tert-butyldiphenylsilyloxy)phenyl 11-(4-methoxybenzyloxy)undecyl phosphinate **20**:



Ethyl phenylphosphinate **18e** (3.0 g, 7.06 mmol), alkene **11** (4.1 g, 2 eq., 14.12 mmol) and recrystallized AIBN (580 mg, 0.5 eq., 3.53 mmol) were dissolved in dry benzene (30 ml) under argon. The resulting mixture was heated at 80°C. After 12h the reaction was finished and the solvent was evaporated under vacuum. The compound was obtained as an oil (4.20 g, 82%) after purification by column chromatography on silica gel eluting with EA:Cyclohexane 1:1.

R_f = 0.41 (ethyl acetate:Cyclohexane 7:3).

¹H-NMR (CDCl₃, 200.1 MHz): δ = 7.70-7.67 (m, 4H, ArH), 7.57-7.33 (m, 8H, ArH), 7.27-7.23 (m, 2H, ArH), 6.89-6.79 (m, 4H, ArH), 4.42 (s, 2H, H¹²), 4.13-3.98 (m, 2H, H¹⁴), 3.79 (s, 3H, H¹³), 3.42 (t, 2H, H¹¹, *J* = 6.4 Hz), 1.80-1.20 (m, 23H, CH₂ + H¹⁵), 1.10 (s, 9H, 3 x H¹⁶).

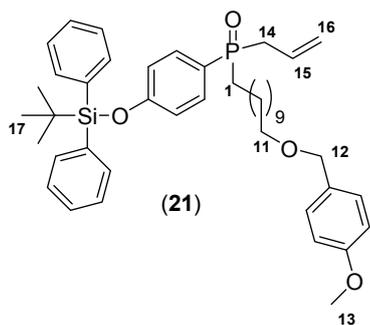
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50.3 MHz): $\delta = 159.2, 158.9, 135.1, 132.1$ (d, $J_{\text{P-C}} = 11.7$ Hz), 131.7, 131.5, 130.7, 129.1, 128.7, 128.4, 135.1, 132.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 52.7$ Hz), 131.7, 130.0, 127.7, 119.9 (d, $J_{\text{P-C}} = 58.6$ Hz), 72.5, 70.1, 60.4 (d, $J_{\text{P-C}} = 26.4$ Hz), 55.2, 30.8 (d, $J_{\text{P-C}} = 20.5$ Hz), 30.5, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 29.0, 28.7, 26.2, 21.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 14.6$ Hz), 21.0, 19.2, 14.2.

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 81.0 MHz): 44.5 ppm.

HRMS $[\text{M}]^+$ calculated for $\text{C}_{43}\text{H}_{59}\text{O}_5\text{PSi}$: 714.3885, found: 714.3869.

IR (neat): 3125, 3057, 2918, 2864, 1506, 1240, 1025 723 cm^{-1} .

Synthesis of 11-(4-methoxybenzyloxy)undecyl allyl 4-(tert-butyldiphenylsilyloxy) phenyl phosphine oxide 21:



A stirred solution of the phosphinate **20** (0.6 g, 0.84 mmol) in dry THF (10 ml) under *vacuo* was cooled at 0 °C. Then, a 2M THF solution in chloro-allylmagnesium (2.1 ml, 5 eq.) was added slowly. The colourless solution changed into bright orange, and after 1 h, the reaction is finished. Then, water and HCl 1N were added, the aqueous layer was extracted with ether, and the combined organic layers were then washed with brine,

dried, and evaporated under reduced pressure. The product was obtained (360 mg, 60 %) clean enough for the next step, as colourless oil.

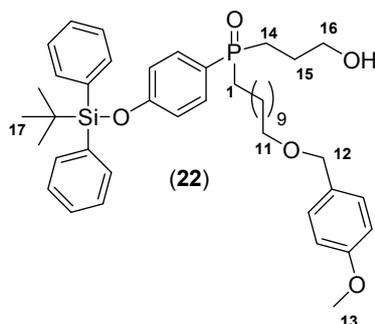
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300.1 MHz): $\delta = 7.70\text{-}7.67$ (m, 4H, ArH), 7.48-7.39 (m, 8H, ArH), 7.27-7.24 (m, 2H, ArH), 6.88-6.81 (m, 4H, ArH), 5.70-5.64 (m, 1H, H^{15}), 5.14-5.01 (m, 2H, H^{16}), 4.42 (s, 2H, H^{12}), 3.83 (s, 3H, H^{13}), 3.42 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, H^{11}), 2.72 (dd, 2H, $J = 7.6, 15.2$ Hz, H^{14}), 1.80-1.20 (m, 20H, CH_2), 1.10 (s, 9H, 3 x H^{17}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50.3 MHz): $\delta = 159.2, 158.9, 135.1, 132.1$ (d, $J_{\text{P-C}} = 11.7$ Hz), 131.7, 131.5, 130.7, 129.1, 128.7, 128.4, 135.1, 132.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 52.7$ Hz), 131.7, 130.0, 127.7, 119.9 (d, $J_{\text{P-C}} = 58.6$ Hz), 72.5, 70.1, 60.4 (d, $J_{\text{P-C}} = 26.4$ Hz), 55.2, 30.8 (d, $J_{\text{P-C}} = 20.5$ Hz), 30.5, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 29.0, 28.7, 26.2, 21.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 14.6$ Hz), 21.0, 19.2, 14.2.

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 121.5 MHz): 38.5 ppm.

HRMS $[M]^+$ calculated for $C_{44}H_{59}O_4PSi$: 710.3935, found 710.3920.

Synthesis of 11-(4-methoxybenzyloxy)undecyl (3-hydroxypropyl) 4-(tert-butyl-diphenylsilyloxy) phenyl phosphine oxide 22:



The phosphine oxide **21** (754 mg, 1.06 mmol) was dissolved in THF (10 mL) and $BH_3 \cdot THF$ 1.0 M in THF (1 mL, 1 eq.) was added slowly at 0 °C. Then, the reaction was stirred for 2h at room temperature. The mixture was treated with aqueous NaOH (3 N, 5.3 mL) and 30 % aqueous H_2O_2 (2.3 mL) at 0 °C. The resulting mixture was stirred for 1h at the same temperature, subsequently diluted with Et_2O and H_2O . The layers were separated and the aqueous phase was further

extracted with Et_2O 3 times. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The residue was purified (310 mg, 40%) by column chromatography on silica gel and afforded **22** (EA \rightarrow EA:MeOH 5%) as a colourless oil.

R_f = 0.25 (ethyl acetate:MeOH 4:1).

1H -NMR ($CDCl_3$, 300.1 MHz): δ = 7.70-7.67 (m, 4H, ArH), 7.46-7.34 (m, 8H, ArH), 7.27-7.24 (m, 2H, ArH), 6.88-6.82 (m, 4H, ArH), 4.42 (s, 2H, H^{12}), 3.79 (s, 3H, H^{13}), 3.64 (td, 2H, J = 5.5, 1.5 Hz, H^{16}), 3.44 (t, 2H, J = 6.6 Hz, H^{11}), 2.02-1.53 (m, 8H, CH_2 , H^{15}), 1.80-1.20 (m, 16H, CH_2), 1.10 (s, 9H, 3 x H^{17}).

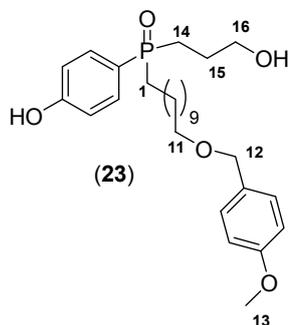
^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 50.3 MHz): δ = 159.2, 158.9, 135.6, 132.3 (d, J_{P-C} = 29.2 Hz), 132.0, 130.9, 130.2, 129.3, 128.0, 123.9, 120.4 (d, J_{P-C} = 46.9 Hz), 116.7 (d, J_{P-C} = 12.6 Hz), 113.9, 72.6, 70.4, 62.9 (d, J_{P-C} = 8.3 Hz), 58.5, 31.1, 30.8 (d, J_{P-C} = 20.5 Hz), 29.9, 29.5, 29.4, 29.3, 29.0, 28.5, 27.1, 26.6, 26.3, 25.5 (d, J_{P-C} = 4.5 Hz), 21.8 (d, J_{P-C} = 4.5 Hz), 19.6, 18.5.

^{31}P -NMR ($CDCl_3$, 121.5 MHz): 43.8 ppm.

HRMS $[M]^+$ calculated for $C_{44}H_{61}O_5PSi$: 728.4065, found 728.4026.

IR (neat): 3306, 3071, 3001, 2930, 2855, 1594, 1512, 1463, 1283, 1245, 1170, 1114, 914, 822, 702, 504 cm^{-1} .

Synthesis of 11-(4-methoxybenzyloxy)undecyl (3-hydroxypropyl) 4-hydroxy-phenyl phosphine oxide **23**:



A 1.0 M solution of $\text{Bu}_4\text{N}^+ \text{F}^-$ in THF (0.68 ml, 2 eq.) was slowly added at 0°C to a stirred THF (5 ml) solution of phosphine oxide **22** (250 mg, 0.34 mmol). The mixture was stirred over night at room temperature. After treatment with acetic acid (23 μL , 1.16 eq.), the solvent was evaporated under reduced pressure and the resulting colorless oil was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc \rightarrow EtOAc:MeOH 5%) to afford the corresponding di-hydroxy phosphine oxide **23** with 90% (150 mg) of yield.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300.1 MHz): $\delta = 7.49\text{-}7.42$ (m, 2H, ArH), $7.27\text{-}7.24$ (m, 2H, ArH), $6.96\text{-}6.85$ (m, 4H, ArH), 4.42 (s, 2H, H^{12}), 3.79 (s, 3H, H^{13}), 3.64 (td, 2H, $J = 5.5, 1.5$ Hz, H^{16}), 3.43 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, H^{11}), $2.02\text{-}1.53$ (m, 8H, CH_2 , H^{15}), $1.80\text{-}1.20$ (m, 16H, CH_2).

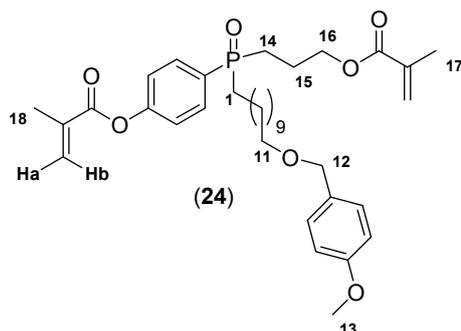
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50.3 MHz): $\delta = 161.2, 159.2, 132.6$ (d, $J_{\text{P-C}} = 9.8$ Hz), $130.8, 129.4, 119.4$ (d, $J_{\text{P-C}} = 99.7$ Hz), 116.8 (d, $J_{\text{P-C}} = 12.4$ Hz) $113.9, 72.6, 70.4, 62.8$ (d, $J_{\text{P-C}} = 10.0$ Hz), $55.4, 31.2$ (d, $J_{\text{P-C}} = 14.3$ Hz), $30.4, 29.9, 29.6, 29.55, 29.4, 29.1, 27.8, 26.9, 26.3, 25.6$ (d, $J_{\text{P-C}} = 4.7$ Hz), 21.8 (d, $J_{\text{P-C}} = 4.0$ Hz).

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 121.5 MHz): 46.4 ppm.

MM-ES (m/z): 490.3 $[\text{M}]^+$.

IR (neat): 3326, 3081, 3011, 2930, 2855, 1594, 1512, 1463, 1245, 1170, 914, 822, 699, 504 cm^{-1} .

Synthesis of 11-(4-methoxybenzyloxy)-undecyl 3-(methacryloyloxy)-propyl 4-(methacryloyloxy)-phenyl phosphine oxide **24**:



To a solution of phosphine oxide **23** (200 mg, 0.27 mmol) in dry DCM (5 mL) were added Et_3N (0.22 ml, 6 eq.) and a catalytic amount of DMAP. The mixture was cooled to 0°C and then methacrylic anhydride (1.08 mmol, 0.16 ml) was added. The reaction mixture was then allowed to warm to room temperature, and after 1h the reaction was finished. Then, more DCM was added,

and the organic phase was washed with aqueous 1N HCl, saturated aqueous NaHCO₃ and distilled H₂O. The organic layer was dried with Na₂SO₄ and the solvent was evaporated using a rotavapor. Purification by flash column chromatography on silica gel eluting with EA: Cyclohexane, 9:1 yielded 110 mg (65%) of the product **24**.

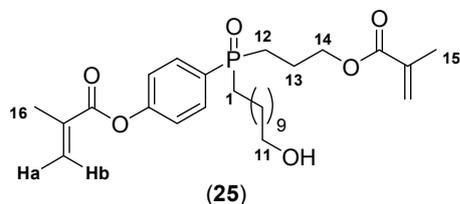
$R_f = 0.38$ (ethyl acetate:Cyclohexane 4:1).

¹H-NMR (CDCl₃, 200.1 MHz): $\delta = 7.77$ -7.68 (m, 2H, ArH), 7.30-7.23 (m, 2H, ArH), 6.89-6.85 (m, 4H, ArH), 6.37-6.07 (m, 2H, 2 x Ha), 5.83-5.56 (m, 2H, 2 x Hb), 4.42 (s, 2H, H¹²), 4.19 (app.t, 2H, $J = 6.0$ Hz, H¹⁶), 3.79 (s, 3H, H¹³), 3.43 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, H¹¹), 2.10-1.91 (m, 8H, CH₂ + H¹⁷ + H¹⁸), 1.59-1.47 (m, 6H, CH₂), 1.80-1.20 (m, 16H, CH₂).

³¹P-NMR (CDCl₃, 81.0 MHz): 40.7 ppm.

MM-ES (m/z): 649.3 [M+Na]⁺.

Synthesis of 11-(hydroxy)-undecyl 3-(methacryloyloxy)-propyl 4-(methacryloyloxy)-phenyl phosphine oxide **25**:



A solution of **24** (90 mg, 0.14 mmol) in DCM (2.7 ml) was cooled to 0°C and treated with H₂O (0.3 ml) and DDQ (163 mg, 0.72 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 1 h, diluted with DCM, washed with aqueous NaHCO₃ and aqueous saturated solution

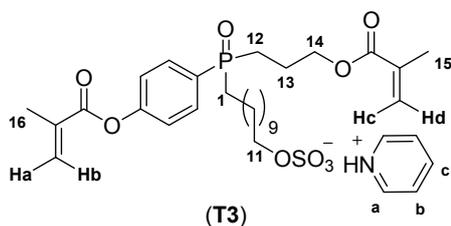
of NaHSO₄, and finally dried with Na₂SO₄. The residue was purified (61 mg, 86 %) by column chromatography on silica gel (EA) to give **25** as an oil.

¹H-NMR (CDCl₃, 200.1 MHz): $\delta = 7.74$ -7.68 (m, 2H, ArH), 7.29-7.26 (m, 2H, ArH), 6.34 (br.s, 1H, Ha), 6.04 (br.s, 1H, Hb), 5.78 (br.s, 1H, Hc), 6.53 (br.s, 1H, Hd), 4.13 (app.t, 2H, $J = 6.0$ Hz, H¹⁴), 3.63 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, H¹¹), 2.10-1.91 (m, 12H, CH₂ + H¹⁵ + H¹⁶), 1.59-1.47 (m, 4H, CH₂), 1.80-1.20 (m, 16H, CH₂).

³¹P-NMR (CDCl₃, 81.0 MHz): 40.5 ppm.

MM-ES (m/z): 507.3 [M+H]⁺.

Synthesis of pyridinium 11-(3-methacryloyloxy-propyl 4-methacryloyloxy-phenyl)-phosphoryl)-undecyl sulfate T3:



Hydroxy phosphine oxide **25** (50 mg, 0.099 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (2 ml) in a flask equipped with a reflux condenser. Then the sulfur trioxide-pyridine complex (31 mg, 0.198 mmol) was added and the mixture heated at reflux for 1 h. The mixture was then cooled at 0 °C, filtered and the solvent was evaporated to give 0.060

g of pyridinium sulfate **T3** (91%) as clear wax.

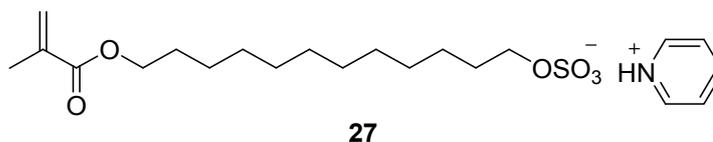
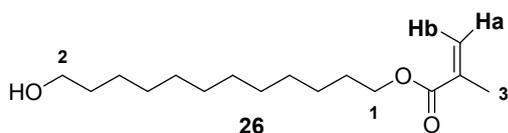
¹H-NMR (CDCl₃, 200.1 MHz): δ = 8.96 (d, 2H, H^b, J = 3.5 Hz), 8.49 (t, 1H, H^c, J = 5.3 Hz), 8.0 (app.t, 2H, H^a, J = 4.3 Hz), 7.74-7.68 (m, 2H, ArH), 7.29-7.26 (m, 2H, ArH), 6.34 (br.s, 1H, H^a), 6.04 (br.s, 1H, H^b), 5.78 (br.s, 1H, H^c), 6.53 (br.s, 1H, H^d), 4.12-4.05 (m, 4H, H¹¹ + H¹⁴), 2.02-1.86 (m, 12H, CH₂, H¹⁵ + H¹⁶), 1.80-1.20 (m, 16H, CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3 MHz): δ = 167.3, 165.4, 153.9, 146.1, 142.3, 135.8 (d, *J*_{P-C} = 31.8 Hz), 132.0 (d, *J*_{P-C} = 9.4 Hz), 128.1, 127.4, 125.8, 122.4 (d, *J*_{P-C} = 11.8 Hz), 68.6, 64.5 (d, *J*_{P-C} = 15.4 Hz), 31.0, 30.7, 29.9, 29.6, 29.5, 29.0, 27.2, 25.8, 21.4, 21.2, 18.4.

³¹P-NMR (CDCl₃, 121.5 MHz): 41.9 ppm.

HRMS: [M – pyridinium + H]⁺ calculated for C₂₈H₄₄O₉PS: 587.2444, found: 587.2439.

IR (neat): 3463, 3071, 3069, 2928, 2855, 1738, 1718, 1637, 1209, 1169, 1128, 1014, 808, 762, 686, 582 cm⁻¹.

Synthesis of polymerizable surfactant template 27:**Synthesis of 1-methacryloyl-12-hydroxy-dodecane:**

At room temperature a suspension of 1,12-dodecanediol (1 g, 4.94 mmol) in dichloromethane (20 ml) was stirred with NEt₃ (1.0 ml, 7.41 mmol).

After 10 minutes methacrylic anhydride (0.74 ml, 4.94 mmol) was added dropwise, followed by DMAP (60 mg, 0.5 mmol). After 20h the reaction was quenched with water and the aqueous layer was extracted once with dichloromethane. The solvent was removed under vacuum and the residue was purified by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:3) to give 0.210 g of 1-methacryloyl-12-hydroxy-dodecane **26** (16%) as an oil.

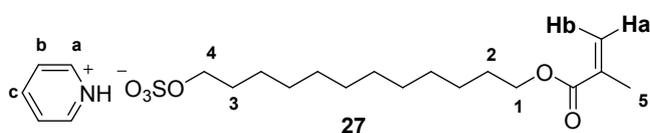
$R_f = 0.34$ (cyclohexane /ethyl acetate 3:2).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) $\delta =$ 1.26-1.38 (m, 16H, $\underline{CH_2}$), 1.50-1.57 (m, 2H, $\underline{CH_2}$), 1.61-1.70 (m, 2H, $\underline{CH_2}$), 1.93 (br.s, 3H, $\underline{H^3}$), 3.62 (t, 2H, $\underline{H^2}$, $J = 6.8$ Hz), 4.12 (t, 2H, $\underline{H^1}$, $J = 6.6$ Hz), 5.52-5.54 (m, 1H, \underline{Ha}), 6.08 (br.s, 1H, \underline{Hb}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): $\delta =$ 18.4, 25.9, 26.1, 28.7, 29.4, 29.5, 29.60, 29.64, 29.7, 32.9, 63.2, 65.0, 125.3, 136.7, 167.7.

IR (neat): 3423 (OH), 1720 (C=O), 1641 (C=C), 1463, 1324 (Ar) cm⁻¹.

HRMS [M+Li]⁺ calculated for C₁₆H₃₀O₃Li: 277.2355, found: 277.2350.

Synthesis of pyridinium 12-(1-methacryloyl)-dodecane-sulfate :

1-methacryloyl-12-hydroxy-dodecane **26** (100 mg, 0.37 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (5 ml) in a flask equipped with a

reflux condenser. Then the sulfur trioxide-pyridine complex (118 mg, 0.74 mmol) was added and the mixture heated at reflux for 30 min. The mixture was then cooled at 0 °C, filtered and washed with hexane. Evaporation of the solvent gave 0.157 g of pyridinium 12-(1-methacryloyl)-dodecane-sulfate **T2** (quant.) as a white solid.

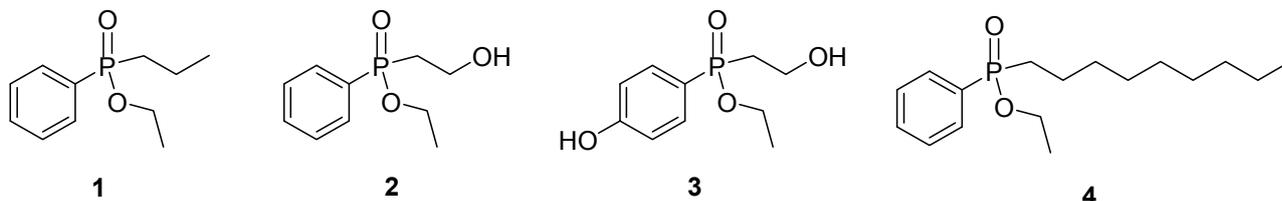
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ= 1.23-1.40 (m, 16H, CH₂), 1.60-1.71 (m, 4H, CH₂), 1.92 (br.s, 3H, C⁵), 4.06-4.13 (m, 4H, C¹ + C⁴), 5.51 (m, 1H, H_a), 6.07 (br.s, 1H, H^b), 7.99-8.04 (m, 2H, C^a), 8.45-8.51 (m, 1H, C^c), 8.99-9.02 (m, 2H, C^a).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ= 18.4, 25.9, 26.1, 28.7, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6 (4C), 64.9, 68.6, 125.2, 127.4, 136.6, 142.5, 145.9, 167.7.

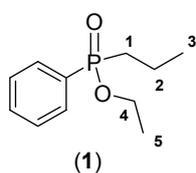
IR (neat): 3478, 3102, 1720 (C=O), 1641 (C=C), 1546, 1491, 1463 (Ar) cm⁻¹.

HRMS [M]⁻ calculated for C₁₆H₂₉O₆S⁻: 349.1690, found: 349.1690.

Synthesis of phosphorus analytes 1-4:



Synthesis of ethyl phenyl(propyl)phosphinate 1:



Ethyl phenylphosphinate (500 mg, 2.94 mmol) was placed under vacuum in a dry flask 10 min before used. Anhydrous THF (10 mL) was then added under argon. The solution was placed at -78°C and desoxygenated under vacuum for 5 min. The reaction flask was then back-filled with argon, and LHMDS (1.0 M in THF, 2.94 mL, 1 eq.) was added under argon. After 10 min, alkyl bromide (270 μL , 1 eq.) was added under argon. After addition, the temperature of the solution was slowly allowed to warm to rt. When the reaction finished, it was quenched with NH_4Cl /brine, extracted with ethyl acetate, dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated in vacuum. The resulting oil was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc) to afford the compound **1** with 65% of yield.

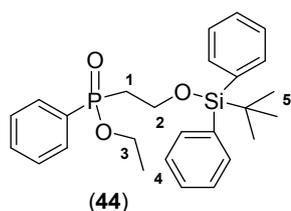
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300.1 MHz): $\delta = 7.82\text{-}7.70$ (m, 2H, ArH), $7.58\text{-}7.40$ (m, 3H, ArH), $4.21\text{-}3.96$ (m, 1H, $\text{H}^{4\text{a}}$), $3.91\text{-}3.72$ (m, 1H, $\text{H}^{4\text{b}}$), $1.94\text{-}1.76$ (m, 2H, H^1), $1.66\text{-}1.48$ (m, 2H, H^2), 1.27 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, H^3), 0.95 (dt, 3H, $J = 1.2, 7.3$ Hz, H^3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50.3 MHz): $\delta = 132.0, 131.9, 131.5, 131.3, 128.5, 128.3, 60.2, 32.7, 30.7, 16.4, 16.3, 15.4$ (d, $J_{\text{P-C}} = 29.3$ Hz), $15.3, 15.1$.

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 81.0 MHz): 48.4 ppm.

MM-ES (m/z): 213.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Retention time = 2.63 min. (Column: Zorbax 300SB- C_{18} , 5 μm , 4.6 x 250 mm, eluent: $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$ 99:1, flow rate: 1 mL / min., RT and the UV wavelength was set to 220 nm).

Synthesis of ethyl 2-(tert-butyldiphenylsilyloxy)ethyl(phenyl)phosphinate 44:

Following the same procedure as in the synthesis of the compound **1**, we used 500 mg (443 μL , 2.94 mmol) of the ethyl phenyl-H-phosphinate in 10 mL of THF, 2.94 mL (1 eq.) of a 1.0 M solution in THF of LHMDS and 1.07 g (1 eq.) of (2-bromoethoxy)(tert-butyl)-diphenylsilane. After 1 h 50 min, the resulting oil was purified by column chromatography on silica gel (EA : Cyclohexane 3:1) to afford the compound **44** with 43% (572 mg) of yield.

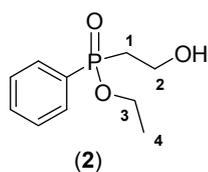
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200.1 MHz): $\delta = 7.76\text{-}7.70$ (m, 2H, ArH), 7.61-7.56 (m, 4H, ArH), 7.45-7.31 (m, 9H, ArH), 4.12-3.76 (m, 4H, $\underline{H}^2 + \underline{H}^3$), 2.33-2.23 (m, 2H, \underline{H}^1), 1.23 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, \underline{H}^4), 0.96 (s, 9H, \underline{H}^5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50.3 MHz): $\delta = 135.3$, 136.7 (d, $J_{\text{P-C}} = 13.2$ Hz), 132.0 (d, $J_{\text{P-C}} = 8.8$ Hz), 131.9, 131.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 39.6$ Hz), 129.5, 128.4 (d, $J_{\text{P-C}} = 48.3$ Hz), 127.5, 60.2 (d, $J_{\text{P-C}} = 26.4$ Hz), 57.8, 34.1, 32.8, 26.6, 26.7, 18.8, 16.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 26.4$ Hz).

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 121.5 MHz): 41.7 ppm.

MM-ES (m/z): 214.1 [M-TBDPS] $^+$.

IR (neat): 3071, 1428, 1390, 1233, 1039, 822 cm^{-1} .

Synthesis of ethyl 2-hydroxyethyl-(phenyl)-phosphinate 2:

A 1.1 M solution of $\text{Bu}_4\text{N}^+ \text{F}^-$ in THF (1.21 mL, 1.1 eq.) was added at 0°C over 2 min, to a stirred solution of **44** (499.1 mg, 1.1 mmol) in THF (10 ml) and the stirred was continued for a further 20 min. After treatment with acetic acid (72 μl , 1.16 eq.), the solution was washed with water and chloroform to eliminate acetic acid traces. The resulting colourless oil was purified by column chromatography on silica gel (DCM : MeOH 9:1) to afford the compound **54** with 96% (226 mg) of yield.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200.1 MHz): $\delta = 7.77\text{-}7.68$ (m, 2H, ArH), 7.56-7.41 (m, 3H, ArH), 4.10-3.72 (m, 4H, $\underline{H}^2 + \underline{H}^3$), 3.57 (br s, 1H, OH), 2.36-1.99 (m, 2H, \underline{H}^1), 1.25 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, \underline{H}^4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50.3 MHz): $\delta = 132.6, 131.5$ (d, $J_{\text{P-C}} = 62.1$ Hz), 128.8 (d, $J_{\text{P-C}} = 76.7$ Hz), 60.9 (d, $J_{\text{P-C}} = 36.5$ Hz), $56.4, 33.8, 31.9, 16.4$ (d, $J_{\text{P-C}} = 40.2$ Hz).

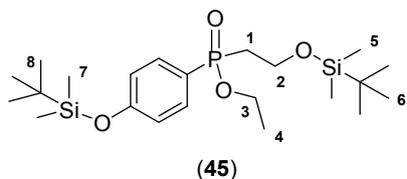
$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 81.0 MHz): 44.4 ppm.

MM-ES (m/z): 214.8 $[\text{M}]^+$.

IR (neat): 3382, 1209, 1038, 822 cm^{-1} .

Retention time = 2.93 min. (Column: Zorbax 300SB- C_{18} , 5 μm , 4.6 x 250 mm, eluent: $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$ 99:1, flow rate: 1 mL / min., RT and the UV wavelength was set to 220 nm).

Synthesis of ethyl 2-(tert-butyldimethylsilyloxy)-ethyl (4-(tert-butyldimethylsilyloxy)-phenyl)-phosphate **45**:



Following the same procedure as the one used for the synthesis of the compound **1**, we used 500 mg (1.66 mmol) of the ethyl 4-(tert-butyldimethylsilyloxy)phenylphosphate **18d** in 10 ml of THF, 1.66 ml (1.66 mmol, 1 eq.) of a 1.0 M solution in THF of LHMDS and 439 mg (1.83 mmol, 1.1 eq.)

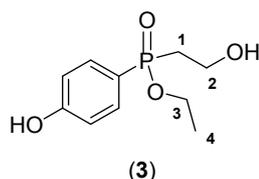
of (2-bromoethoxy)(tert-butyl)dimethylsilane. After 1h50 min, the resulting oil was purified by column chromatography on silica gel (EA : Cyclohexane 1:1) to afford the compound **45** with 30% of yield.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200.1 MHz): $\delta = 7.68-7.58$ (m, 2H, ArH), $6.92-6.87$ (m, 2H, ArH), $4.05-3.80$ (m, 4H, $\underline{H}^2 + \underline{H}^3$), $2.26-2.12$ (m, 2H, \underline{H}^1), 1.25 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, \underline{H}^4), 0.97 (s, 9H, \underline{H}^8), 0.81 (s, 9H, \underline{H}^6), 0.21 (s, 6H, \underline{H}^7), 0.03 (s, 6H, \underline{H}^5).

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 81.0 MHz): 40.9 ppm

MM-ES (m/z): 481.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Synthesis of ethyl 2-(tert-butyldimethylsilyloxy)-ethyl (4-(tert-butyldimethylsilyloxy)-phenyl)-phosphinate 3:



Following the same procedure as the one used for the synthesis of the compound **2**, we used 200 mg of compound **45** in 10 ml of THF, and 1.32 ml of a 1.0 M solution in THF of TBAF (1.33 mmol, 3 eq.). The crude product was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc → EA : MeOH 5%) to afford the compound **3** with 91% of yield.

¹H-NMR (CDCl₃, 200.1 MHz): δ = 7.70-7.69 (m, 2H, ArH), 6.70-6.61 (m, 2H, ArH), 4.10-3.72 (m, 4H, H² + H³), 2.36-1.99 (m, 2H, H¹), 1.25 (t, 3H, J = 6.8 Hz, H⁴).

¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3 MHz): δ = 159.2, 132.5 (d, J_{P-C} = 62.1 Hz), 126.4, 119.8 (d, J_{P-C} = 65.7 Hz), 61.0 (d, J_{P-C} = 36.5 Hz), 55.4, 33.8, 32.0, 16.3 (d, J_{P-C} = 40.2 Hz).

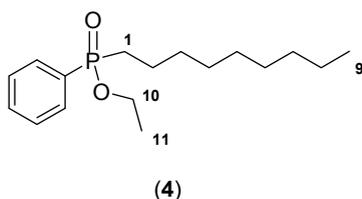
³¹P-NMR (CDCl₃, 121.5 MHz): 41.4 ppm.

MM-ES (m/z): 253.1 [M+Na]⁺.

IR (neat): 3402, 3057, 1534, 1465, 1209, 1038, 822 cm⁻¹.

Retention time = 3.13 min. (Column: Zorbax 300SB-C₁₈, 5 μm, 4.6 x 250 mm, eluent: CH₃CN / H₂O 99:1, flow rate: 1 mL / min., RT and the UV wavelength was set to 220 nm).

Synthesis of ethyl nonyl-(phenyl)-phosphinate 4:



Following the same procedure presented before for the synthesis of the compound **1**, we used 225.8 mg (1.33 mmol) of the ethyl phenyl-H-phosphinate in 5 ml of THF, 1.33 ml (1 eq.) of a 1.0 M solution in THF of LHMDS and 254 μl (1 eq.) of the 1-bromononane. The resulting oil was purified by column

chromatography on silica gel (EA:Cyclohexane 2:1) to afford the compound **4** with 62% (242 mg) of yield.

¹H-NMR (CDCl₃, 300.1 MHz): 7.69-7.62 (m, 2H, ArH), 7.44-7.31 (m, 3H, ArH), 4.01-3.91 (m, 1H, H^{10a}), 3.77-3.64 (m, 1H, H^{10b}), 1.87-1.63 (m, 2H, H¹), 1.17-1.09 (m, 17H, CH₂ + H¹¹), 0.73 (t, 3H, J = 7.3 Hz, H⁹).

^{13}C -NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): 132.0, 131.5 (d, $J_{\text{P-C}} = 39.6$ Hz), 128.5 (d, $J_{\text{P-C}} = 48.3$ Hz), 60.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 26.4$ Hz), 31.7, 30.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 65.9$ Hz), 30.4, 29.2, 29.1 (d, $J_{\text{P-C}} = 44.0$ Hz), 29.0, 22.6, 21.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 13.2$ Hz), 16.4 (d, $J_{\text{P-C}} = 26.4$ Hz), 14.0.

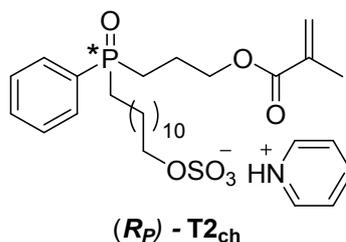
^{31}P -NMR (CDCl₃, 121.5 MHz): 45.0 ppm.

MM-ES (m/z): 297.2 [M+H]⁺.

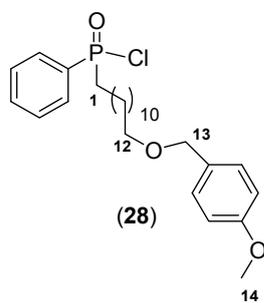
IR (neat): 3057, 2927, 2855, 1226, 1039, 822 cm⁻¹

Retention time = 2.50 min. (Column: Zorbax 300SB-C₁₈, 5 μm, 4.6 x 250 mm, eluent: CH₃CN / H₂O 95:5, flow rate: 1 mL / min., RT and the UV wavelength was set to 276 nm).

Synthesis of chiral polymerizable surfactant template **T2_{ch}**:



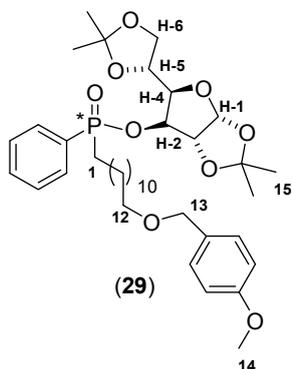
Synthesis of 12-(4-methoxybenzyloxy)-dodecyl (phenyl)-phosphinic chloride 28:



To a solution of phosphinate **7** (0.78 g, 1.69 mmol) in CCl₄ (5 ml) was added at room temperature, 0.42 g of PCl₅. The mixture was refluxed for 1h 30 min. After this time, the ^{31}P -NMR confirmed that the start material is totally converted into chloride derivate. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product (very thick red oil) is directly used for the following reaction.

^{31}P -NMR (CDCl₃, 121.5 MHz): 57.0 ppm

Synthesis of (S_P)-diacetone- α -D-glucose 12-(4-methoxybenzyloxy)-dodecyl (phenyl) phosphinate **29**:



Et₃N (0.8 ml, 5.6 mmol, 10 eq.) was added to an ice-cold solution of the crud phosphinic chloride **28** (1.69 mmol, 3 eq.) in toluene (5 ml) and stirred for 10 min. A solution of diacetone-D-glucose (DAG) (0.150 g, 0.56 mmol, 1 equiv) in toluene (5 ml) was then added slowly. The stirring was continued at 0 °C until all the DAG was consumed (TLC analysis). The solvent was removed under reduced pressure and the residue was suspended in Et₂O. The formed solid was filtered and the solvent was removed. The diastereomeric ratio is

easily determined by ¹H-NMR analysis of the crude product due to the large difference in the chemical shift of the anomeric protons H-1, proton H-2 and also in the proton H-4 of the sugar ring in the phosphinate esters (S_P:R_P = **90:10**). Diastereomeric separation was achieved chromatographically on flash silica gel using a mixture of CH₂Cl₂ : Acetone 95:5. The yield in the two diastereomeric compounds was 77%.

$[\alpha]_D^{20} = -35.9$ (0.0412 g in 2 ml of CHCl₃).

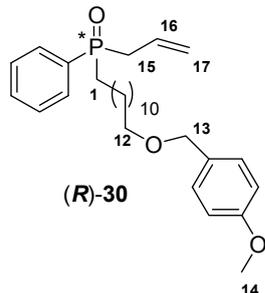
¹H-NMR (CDCl₃, 300.1 MHz) $\delta = 7.95$ -7.89 (m, 2 H, ArH), 7.61-7.49 (m, 3 H, ArH), 7.28-7.25 (m, 2H, ArH), 6.89-6.87 (m, 2H, ArH), 5.95 (d, 1H, *J* = 3.5, H-1), 5.11 (s, 1H, *J* = 3.8, H-2), 3.43-4.40 (m, 3H, H¹³ + H-3), 4.31-4.26 (m, 1H, H-5), 4.16-4.11 (m, 1H, H-6a), 4.05-3.97 (m, 2H, H-4 + H-6b), 3.77 (s, 3 H, H¹⁴), 3.42 (t, 1H, H¹², *J* = 6.6 Hz), 1.96-1.89 (m, 1H, H¹), 1.63-1.21 (m, 32H, CH₂ + 4 x H¹⁵).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) $\delta = 159.2$, 132.7, 132.6, 131.0, 129.3, 128.6 (d, *J*_{P-C} = 13.3 Hz), 113.9, 112.3, 109.3, 105.4, 83.9, 81.0 (d, *J*_{P-C} = 7.7 Hz), 77.9 (d, *J*_{P-C} = 4.2 Hz), 72.6, 72.2, 70.4, 67.8, 55.4, 30.87, 30.70, 30.67, 29.9, 29.7, 29.5, 29.2, 26.9 (d, *J*_{P-C} = 8.8 Hz), 26.4 (d, *J*_{P-C} = 3.3 Hz), 25.6, 21.8.

³¹P-NMR (CDCl₃, 121 MHz) $\delta = 47.7$ ppm.

MM-ES (*m/z*): 711.1 [M+Na]⁺.

IR (neat): 3105, 3001, 2987, 2929, 2853, 1613, 1514, 1248, 1076, 1035, 844, 555 cm⁻¹.

Synthesis of (*R*_P) 12-(4-methoxybenzyloxy)-dodecyl allyl (phenyl) phosphine oxide 30:

Following the same procedure presented before in the synthesis of the compound **13**, we used 0.31 g (0.45 mmol) of the chiral phosphinate **29** in 5 ml of THF, and 0.45 ml (0.9 mmol, 1 eq.) of a 1.0 M solution in THF of chloro-allylmagnesium. The crud product was purified by column chromatography on silica gel (EA : Cyclohexane 4:1 → EA) to afford the compound (*R*)-**30** with 51% (0.108 g) of yield.

$[\alpha]_D^{20} = -5.90$ (0.012 g in 2 ml of CHCl₃).

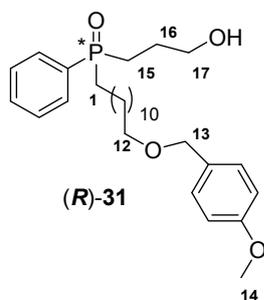
¹H-NMR (CDCl₃, 200.1 MHz): $\delta = 7.74$ -6.69 (m, 2H, ArH), 7.52-7.42 (m, 2H, ArH), 7.12-7.25 (m, 2H, ArH), 6.85-6.80 (m, 2H, ArH), 5.81-5.5.66 (m, 1H, H¹⁶), 5.30-5.07 (m, 2H, H¹⁷), 4.43 (s, 2H, H¹³), 3.80 (s, 3H, H¹⁴), 3.43 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, H¹²), 2.76 (dd, 2H, $J = 7.50, 15.1$ Hz, H¹⁵), 2.01-1.91 (m, 2H, H¹), 1.88-1.23 (m, 18H, CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): $\delta = 158.9, 131.6$ (d, $J_{P-C} = 8.8$ Hz), 130.8, 130.5 (d, $J_{P-C} = 35.2$ Hz), 129.1, 128.6, 128.5, 127.6 (d, $J_{P-C} = 35.2$ Hz), 120.4 (d, $J_{P-C} = 48.4$ Hz), 113.7, 72.5, 70.5, 70.2, 55.2, 36.9, 36.0, 31.0, 30.8, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 29.0, 28.2, 26.2, 21.2 (d, $J_{P-C} = 17.6$ Hz).

³¹P-NMR (CDCl₃, 121.5 MHz): 38.2 ppm.

MM-ES (m/z): 493.1 [M+Na]⁺.

IR (neat): 3053, 2997, 2928, 2854, 1636, 1613, 1513, 1248, 1175, 1114, 1037, 824, 515 cm⁻¹.

Synthesis of (*R*_P) 12-(4-methoxybenzyloxy)-dodecyl 3-hydroxypropyl (phenyl) phosphine oxide 31:

BH₃·Me₂S (80 μ l, 0.84 mmol) was added to a solution of cyclohexene (0.17 ml, 1.68 mmol) in THF (2 ml) at 0 °C. After 2 h of stirring at 0 °C, a solution of chiral compound **30** (130 mg, 0.28 mmol) in THF (3 ml) was added, warmed to room temperature and continued stirring 2 h, cooled to 0 °C again, and the reaction was then quenched with water, H₂O₂ (30%, 0.84 ml) was added, followed by NaOH (30%, 2 ml), the mixture was stirred at room temperature for 30 min and then diluted with ether. The two phases was separated, and the aqueous layer was further extracted with

ether, washed with brine and dried over MgSO_4 . Evaporation of solvent gave the crude alcohol, which was then purified by flash column (EA : MeOH 5%) on silica gel to give the pure product **31** (81 mg, 59%) as an oil.

$[\alpha]_D^{20} = -3.90$ (0.0117 g in 2 ml of CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300.1 MHz) $\delta = 7.71\text{-}7.65$ (m, 2H, ArH), 7.53-7.48 (m, 3H, ArH), 7.26-7.23 (m, 2H, ArH), 6.87-6.84 (m, 2H, ArH), 4.41 (s, 2H, \underline{H}^{13}), 3.79 (s, 3H, \underline{H}^{14}), 3.64 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz, \underline{H}^{17}), 3.41 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, \underline{H}^{12}), 2.12-1.21 (m, 24H, $\underline{CH}_2 + \underline{H}^{15} + \underline{H}^{16}$).

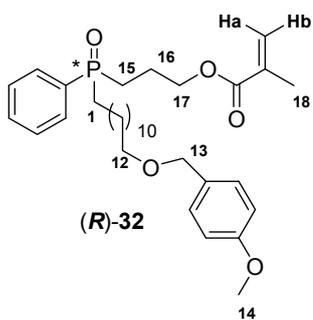
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50.3 MHz): $\delta = 159.2, 132.7, 131.8, 130.9, 130.6$ (d, $J_{\text{P-C}} = 8.8$ Hz), 129.3, 128.8 (d, $J_{\text{P-C}} = 11.1$ Hz), 113.8, 72.6, 70.3, 62.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 8.10$ Hz), 55.4, 31.1, 30.8, 30.6, 29.8, 29.6, 29.4, 29.2, 29.1, 28.5, 27.2, 26.3, 25.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 4.4$ Hz), 21.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 3.8$ Hz).

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 81.0 MHz): 43.6 ppm.

MM-ES (m/z): 489.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR (neat): 3350, 3057, 2927, 2853, 1613, 1513, 1248, 1172, 820, 747, 517 cm^{-1} .

Synthesis of (*R_P*)-11-(4-methoxybenzyloxy)-dodecyl 3-(methacryloyloxy)-propyl (phenyl) phosphine oxide **32**:



Following the same procedure presented before for the synthesis of the compound **15**, we used 0.450 g (0.92 mmol, 1 eq.) of the chiral phosphine alcohol **31** in 15 ml of DCM, Et_3N (0.32 ml, 2.30 mmol, 2.5 eq.), catalytic amount of DMAP, and 0.21 ml of methacrylic anhydride (1.38 mmol, 1.5 eq.). The reaction finished after 2 h. Purification of crud product by flash column chromatography (EA:Cyclohexane 9:1) yielded 0.430 g (82%) of the final product (*R*)-**32**.

$[\alpha]_D^{20} = -23.90$ (0.0157 g in 2 ml of CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200.1 MHz): $\delta = 7.72\text{-}7.63$ (m, 2H, ArH), 7.53-7.46 (m, 3H, ArH), 7.26-7.21 (m, 2H, ArH), 6.88-6.81 (m, 2H, ArH), 6.05 (br.s, 1H, \underline{H}_a), 5.53 (br.s, 1H, \underline{H}_b), 4.41 (s, 2H, \underline{H}^{13}), 4.12 (t, 2H, $J = 6.2$ Hz, \underline{H}^{17}), 3.78 (s, 3H, \underline{H}^{14}), 3.41 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz, \underline{H}^{12}), 2.08-1.55 (m, 29H, $\underline{CH}_2 + \underline{H}^{15} + \underline{H}^{16} + \underline{H}^{18}$).

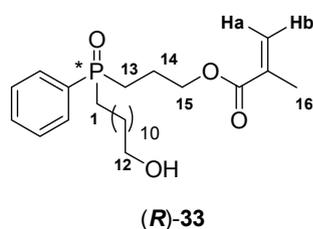
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): $\delta = 167.4, 159.3, 136.3, 131.8, 130.9, 130.5$ (d, $J_{\text{P-C}} = 35.2$ Hz), 129.3, 128.8 (d, $J_{\text{P-C}} = 43.9$ Hz), 125.7, 113.8, 72.6, 70.3, 64.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 61.5$ Hz), 55.4, 31.1, 30.9, 30.6, 29.9, 29.7, 29.5, 29.4, 29.1, 27.1, 26.3, 26.1, 21.4 (d, $J_{\text{P-C}} = 48.4$ Hz), 18.4.

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 121.5 MHz): 40.3 ppm.

MM-ES (m/z): 579.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

IR (neat): 3057, 2927, 2854, 1719, 1638, 1613, 1514, 1248, 1172, 819, 748, 549 cm^{-1} .

Synthesis of (*R*)-11-(hydroxy)-dodecyl 3-(methacryloyloxy)-propyl (phenyl)-phosphine oxide **33**:



Following the same procedure presented before for the synthesis of the compound **16**, we used 0.400 g (0.72 mmol, 1 eq.) of the chiral phosphine oxide **32** in DCM (9.0 ml). After 1 h the reaction was finished. The residue was purified (309 mg, 98 %) by column chromatography on silica gel (EA: MeOH 2%) as an oil.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -9.10$ (0.0117 g in 2 ml of CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200.1 MHz): $\delta = 7.72\text{-}7.66$ (m, 2H, ArH), 7.55-7.47 (m, 3H, ArH), 6.04 (br.s, 1H, Ha), 5.52 (br.s, 1H, Hb), 4.11 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz, \underline{H}^{15}), 3.60 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, \underline{H}^{12}), 2.08-1.77 (m, 12H, $\underline{\text{CH}}_2$, $\underline{H}^{13} + \underline{H}^{14} + \underline{H}^{16}$), 1.60-1.20 (m, 17H, $\underline{\text{CH}}_2$).

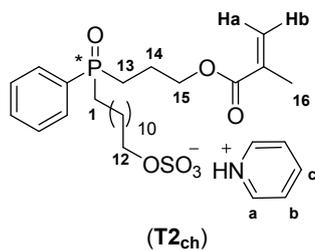
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): $\delta = 167.1, 136.0, 132.4, 131.6, 131.1, 130.7, 130.3$ (d, $J_{\text{P-C}} = 8.8$ Hz), 128.7 (d, $J_{\text{P-C}} = 11.1$ Hz), 125.5, 64.4 (d, $J_{\text{P-C}} = 15.5$ Hz), 62.5, 32.7, 30.7 (d, $J_{\text{P-C}} = 14.4$ Hz), 30.3, 29.44, 29.35, 29.16, 28.9, 26.8, 25.9, 25.7, 21.2 (d, $J_{\text{P-C}} = 4.4$ Hz), 21.0 (d, $J_{\text{P-C}} = 2.8$ Hz), 18.2.

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 121.5 MHz): 41.4 ppm.

MM-ES (m/z): 437.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR (neat): 3376, 3057, 2927, 2854, 1719, 1637, 1438, 1297, 1168, 813, 747, 547 cm^{-1} .

Synthesis of (*R_p*)-pyridinium 11-(3-(methacryloyloxy)-propyl (phenyl) phosphoryl)-dodecyl sulfate **T2_{ch}**:



Following the same procedure presented before in the synthesis of the template **T2**, we used 0.170 g (0.39 mmol, 1 eq.) of chiral hydroxy phosphine oxide **33** in 20 ml CH₂Cl₂, and 124 mg (0.78 mmol, 2 eq.) of sulfur trioxide-pyridine complex. After 30 min. the mixture was cooled at 0 °C, filtered and the solvent was evaporated, to give 0.211 g of chiral pyridinium sulfate **T2_{ch}** (91%) as clear wax.

¹H-NMR (CDCl₃, 200.1 MHz): δ = 8.98 (d, 2H, H^b, *J* = 3.5 Hz), 8.49 (t, 1H, H^c, *J* = 5.3 Hz), 8.0 (app.t, 2H, H^a, *J* = 4.3 Hz), 7.71-7.66 (m, 2H, ArH), 7.52-7.31 (m, 3H, ArH), 6.04 (br.s, 1H, H^a), 5.53 (br.s, 1H, H^b), 4.15-4.09 (m, 4H, H¹² + H¹⁵), 2.11-1.89 (m, 9H, CH₂ + H¹⁶), 1.73-1.59 (m, 2H, CH₂), 1.34-1.18 (m, 18H, CH₂).

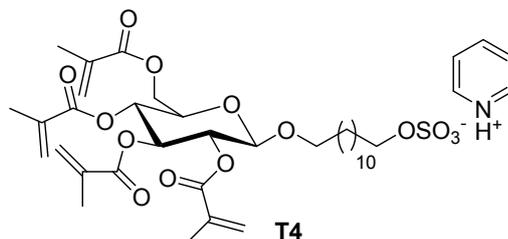
¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3 MHz): δ = 167.0, 146.3, 142.1, 135.9, 132.6, 131.6 (d, *J_{P-C}* = 11.7 Hz), 130.7, 130.4 (d, *J_{P-C}* = 35.1 Hz), 128.7, 128.5, 125.5, 64.4 (d, *J_{P-C}* = 61.5 Hz), 62.3, 32.7, 30.8, 30.5 (d, *J_{P-C}* = 17.6 Hz), 29.3 (d, *J_{P-C}* = 20.5 Hz), 29.1, 28.9, 26.9, 25.7, 25.6, 21.2 (d, *J_{P-C}* = 17.6 Hz), 21.0 (d, *J_{P-C}* = 14.6 Hz), 18.1.

³¹P-NMR (CDCl₃, 81.0 MHz): 42.1 ppm.

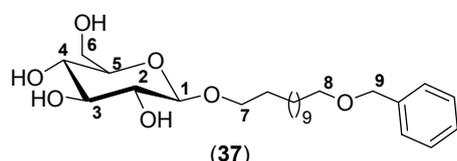
MM-ES (*m/z*): 436.3 [M- (C₅H₆N)⁺ - sulphate(SO₃)⁻ +H]⁺.

IR (neat): 3441, 3141, 3067, 2927, 2854, 1716, 1636, 1489, 1438, 1260, 1170, 1157, 757, 686, 580 cm⁻¹.

Synthesis of polymerizable surfactant template **T4**:



Synthesis of 12-benzyloxy-dodecyl β -D-glucopyranoside **37**:



β -D-glucose pentaacetate (100 mg, 0.26 mmol) was dissolved in dry dichloromethane (5 ml) together with 12-Benzyloxy-1-dodecanol^[1] (225 mg, 0.77 mmol) and boron trifluoride diethyl etherate (0.1 ml, 0.82 mmol) was added dropwise at 0°C. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, and then quenched by addition of saturated NaHCO₃ solution (5 ml). The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 5 ml) and the combined organic layers were then washed with brine, dried, and evaporated under reduced pressure. Flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 8:2) of the crude reaction mixture yielded 78 mg (48%) of 12-benzyloxy-dodecyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside **36** as an oil.

R_f = 0.32 (cyclohexane / ethyl acetate 7:3).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 1.26-1.40 (m, 16H, CH₂), 1.58-1.67 (m, 4H, CH₂), 2.02-2.09 (4 x s, 12H, 4 x COCH₃), 3.47 (t, 2H, H⁸, J = 6.6 Hz), 3.48 (dt, 1H, H^{7b}, J = 9.6, 6.6 Hz), 3.69 (ddd, 1H, H⁵, J = 9.5, 4.9, 2.6 Hz), 3.88 (dt, 1H, H^{7a}, J = 9.6, 6.4 Hz), 4.14 (dd, 1H, H^{6b}, J = 12.2, 2.5 Hz), 4.28 (dd, 1H, H^{6a}, J = 12.2, 4.5 Hz), 4.5 (d, 1H, H¹, J = 8.2 Hz), 4.51 (s, 2H, H⁹), 4.99 (dd, 1H, H², J = 9.5, 8.2 Hz), 5.1 (app. t, 1H, H⁴, J = 9.5 Hz), 5.22 (dd, 1H, H³, J = 9.5, 9.2 Hz), 7.35-7.25 (m, 5H, ArH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ = 20.7 (2C), 20.8 (2C), 25.9, 26.3, 29.4, 29.5 (2C), 29.6 (4C), 29.8, 62.1, 68.5, 70.3, 70.6, 71.4, 71.8, 79.9, 72.94, 100.9, 127.5, 127.7, 128.4, 138.8, 169.3, 169.5, 170.4, 170.7.

IR (neat): 1758 (C=O), 1454, 1433 (Ar) cm⁻¹.

The obtained tetraacetyl glucoside (1.6 g, 2.57 mmol) was dissolved in dichloromethane (12 mL) and stirred at room temperature with methanol (20 ml) for 5 min. Then a solution of sodium methoxide in water (0.21 ml, 1M) was added and the mixture was stirred for additional 3 h. The solution was neutralized by adding an ion exchange resin (Amberlite IR 120). The resin was filtered off and the solvent removed under vacuum. Crystallization of the crude residue yielded 1.12 g (96%) of the desired 12-benzyloxy-dodecyl β -D-glucopyranoside (**37**) as a white solid.

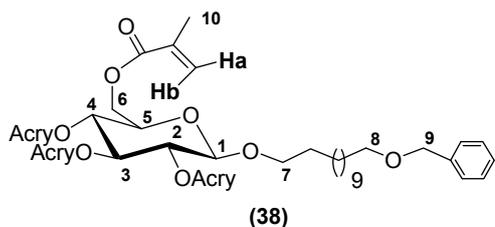
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 + D_2O 1%, 300 MHz) δ = 1.23-1.43 (m, 16H, CH_2), 1.48-1.54 (m, 4H, CH_2), 2.94 (app. t, 1H, C^2 , $J = 8.2$ Hz), 3.04-3.16 (m, 3H, $\text{C}^3 + \text{C}^4 + \text{C}^5$), 3.36-3.46 (m, 4H, $\text{C}^{6b} + \text{C}^{7b} + \text{C}^8$), 3.63-3.76 (m, 2H, $\text{C}^{6a} + \text{C}^{7a}$), 4.1 (d, 1H, C^1 , $J = 8.0$ Hz), 4.42 (s, 2H, C^9), 7.25-7.35 (m, 5H, ArH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75.5 MHz) δ = 27.1, 27.3, 30.5, 30.6, 30.7(5C), 62.8, 70.9, 71.4, 71.6, 73.8, 75.1, 77.9, 78.1, 104.3, 128.6, 128.8, 129.3.

IR (neat): 3384 (OH), 1597, 1454 (Ar) cm^{-1} .

HRMS [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{Na}$: 477.2828, found: 477.2834.

Synthesis of 12-benzyloxy-dodecyl-2,3,4,6-tetra-methacryloyl- β -D-glucopyranoside **38**:



At room temperature a solution of glucopyranoside **6** in dichloromethane (20 ml) was stirred with NEt_3 (1.5 ml, 11 mmol). After 10 minutes methacrylic anhydride (1.6 mL, 11 mmol) was added dropwise, followed by a catalytic amount of DMAP (0.13 g, 1.1 mmol). After 5h the reaction was quenched with water and the

aqueous layer was extracted once with dichloromethane. The solvent was removed under vacuum and the residue was purified by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to give 0.27 g of glucopyranoside **38** (33%) as an oil.

$R_f = 0.46$ (cyclohexane /ethyl acetate 8:2).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 1.23-1.38 (m, 16H, CH_2), 1.47-1.65 (m, 4H, CH_2), 1.82-1.95 (4 x s, 12H, 4 x H^{10}), 3.46 (t, 2H, H^8 , $J = 6.6$ Hz), 3.48 (dt, 1H, H^{7b} , $J = 9.9, 6.8$ Hz), 3.83-3.87 (m, 2H, $\text{H}^5 + \text{H}^{7a}$), 4.22 (dd, 1H, H^{6b} , $J = 12.2, 5.3$ Hz), 4.36 (dd, 1H, H^{6a} , $J = 12.2, 2.5$ Hz), 4.50 (s, 2H,

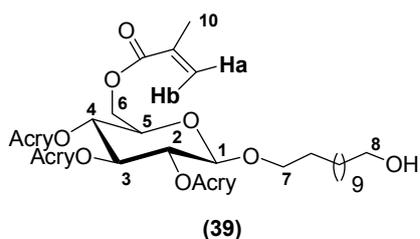
\underline{H}^9), 4.6 (d, 1H, \underline{H}^1 , $J = 8.0$ Hz), 5.14 (dd, 1H, \underline{H}^2 , $J = 8.0, 9.7$ Hz), 5.27 (dd, 1H, \underline{H}^4 , $J = 8.0, 8.4$ Hz), 5.43 (dd, 1H, \underline{H}^3 , $J = 8.0, 9.7$ Hz), 5.52-5.60 (4 x br.s, 4H, 4 x \underline{H}^a), 6.02-6.15 (4 x br.s, 4H, 4 x \underline{H}^b), 7.26-7.34 (m, 5H, Ar \underline{H}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz) $\delta = 18.3, 18.35, 18.4$ (2C), 25.9, 26.4, 29.47, 29.5, 29.7 (5C), 29.9, 32.9, 62.9, 69.3, 70.3, 70.7, 71.7, 72.1, 73.0 (2C), 101.2, 126.4 (2C), 127.1 (2C), 127.6, 127.8, 128.5, 135.2, 135.3, 135.7, 135.9, 138.9, 165.9 (2C), 166.6, 167.1.

IR (neat): 1735 (C=O), 1638 (C=C), 1454, 1378 (Ar) cm^{-1} .

HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{41}\text{H}_{58}\text{O}_{11}\text{Na}$: 749.3877, found: 749.3883.

Synthesis of 12-hydroxy-dodecyl-2,3,4,6-tetra-methacryloyl- β -D-glucopyranoside **39**:



The glucopyranoside **38** (0.24 g, 0.33 mmol) was stirred for 1 day at room temperature with DDQ (0.37 g, 1.65 mmol) in a mixture of CH_2Cl_2 / H_2O (10:1). Then the reaction was diluted with CH_2Cl_2 , washed with a saturated solution of NaHCO_3 and NaHSO_4 , dried with MgSO_4 and concentrated

in vacuum. Flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 8:2) of the crude reaction mixture yielded 0.19 g (90%) of glucopyranoside **39** as an oil.

$R_f = 0.22$ (cyclohexane / ethyl acetate 7:3).

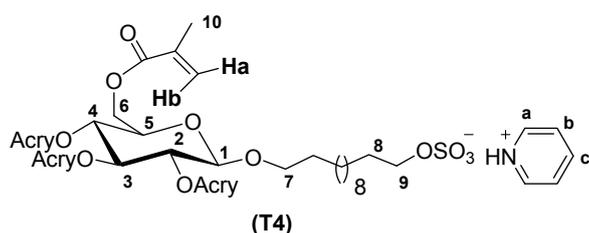
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) $\delta = 1.22$ -1.30 (m, 16H, $\underline{\text{CH}_2}$), 1.51-1.60 (m, 4H, $\underline{\text{CH}_2}$), 1.81-1.94 (4 x s, 12H), 3.48 (dt, 1H, \underline{H}^{7b} , $J = 9.6, 6.7$ Hz), 3.63 (t, 2H, \underline{H}^8 , $J = 6.7$ Hz), 3.81-3.88 (m, 2H, $\underline{H}^5 + \underline{H}^{7a}$), 4.22 (dd, 1H, \underline{H}^{6b} , $J = 12.2, 5.2$ Hz), 4.35 (dd, 1H, \underline{H}^{6a} , $J = 12.2, 2.6$ Hz), 4.6 (d, 1H, \underline{H}^1 , $J = 7.9$ Hz), 5.13 (dd, 1H, \underline{H}^2 , $J = 9.8, 7.9$ Hz), 5.23 (app. t, 1H, \underline{H}^4 , $J = 9.8$ Hz), 5.42 (app. t, 1H, \underline{H}^3 , $J = 9.6$ Hz), 5.51-5.59 (4 x br.s, 4H, 4 x \underline{H}^a), 6.01-6.15 (4 x br.s, 4H, 4 x \underline{H}^b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz) $\delta = 18.29, 18.35, 18.42$ (2C), 25.9, 29.4, 29.6, 29.7 (6C), 32.9, 62.9, 63.2, 69.3, 70.3, 71.7, 72.1, 72.9, 101.2, 126.4 (2C), 127.1 (2C), 135.2, 135.3, 135.7, 135.9, 165.9 (2C), 166.6, 167.1.

IR (neat): 3566 (OH), 1734 (C=O), 1638 (C=C), 1455, 1321 (Ar) cm^{-1}

HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_{11}\text{Na}$: 659.3407, found: 659.3402.

Synthesis of pyridinium 12-(2,3,4,6-tetra-methacryloyl- β -D-glucopyranoside)-dodecane-sulfate T4:



The glucopyranoside **39** (100 mg, 0.16 mmol) was dissolved in CHCl_3 (2 ml) in a flask equipped with a reflux condenser. Then the sulfur trioxide - pyridine complex (50 mg, 0.32 mmol) was added and the mixture heated at reflux for 1h. The mixture was then cooled at 0°C , filtered and washed with hexane. After evaporation of the solvent the obtained solid was recrystallized in Et_2O / n-pentane to give 86 mg of **T4** (76%) as clear wax.

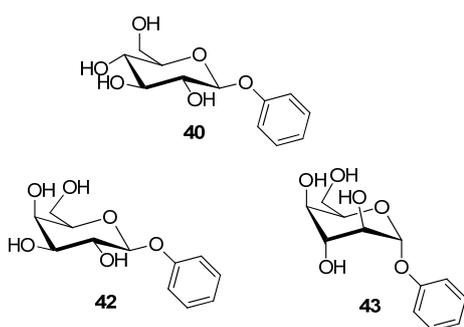
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 1.21-1.42 (m, 16H, CH_2), 1.48-1.58 (m, 2H, CH_2), 1.64-1.74 (m, 2H, H^8), 1.81-1.94 (4 x s, 12H, 4 x H^{10}), 3.48 (dt, 1H, H^{7b} , $J = 9.8, 6.4$ Hz), 3.82-3.89 (m, 2H, $\text{H}^5 + \text{H}^{7a}$), 4.12 (t, 2H, H^9 , $J = 6.6$ Hz), 4.22 (dd, 1H, H^{6b} , $J = 12.1, 5.7$ Hz), 4.35 (dd, 1H, H^{6a} , $J = 12.1, 2.6$ Hz), 4.6 (d, 1H, H^1 , $J = 7.9$ Hz), 5.13 (dd, 1H, H^2 , $J = 9.8, 7.9$ Hz), 5.23 (t, 1H, H^4 , $J = 9.8$ Hz), 5.43 (dd, 1H, H^3 , $J = 9.8, 9.4$ Hz), 5.51-5.59 (3 x br.s, 4H, 4 x H^a), 6.01- 6.15 (4 x br.s, 4H, 4 x H^b), 8.0 (dd, 2H, H^c , $J = 7.3, 6.5$ Hz), 8.48 (t, 1H, H^c , $J = 8.0$ Hz), 8.98 (d, 2H, H^b , $J = 6.7$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz) δ = 18.19, 18.26, 18.37, 18.44, 25.9, 29.38, 29.4, 29.6 (9C), 62.9, 68.6, 69.3, 70.3, 71.6, 72.0, 72.9, 101.1, 126.0, 126.4, 126.9, 127.0, 127.4, 135.1, 135.2, 135.6, 135.9, 142.3, 146.1, 165.8 (2C), 166.5, 167.0,

IR (neat): 1734 (C=O), 1638 (C=C), 1455, 1323 (Ar) cm^{-1} .

HRMS [$\text{M}-272.1054$] $^-$ calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{O}_{10}\text{S}$: 443.1951, found: 443.1957.

General procedure for the preparation of pyranosides 40, 42, 43:



The corresponding pentaacetate compounds of **40**, **42** and **43** were treated with phenol (2eq) in the same condition used for the synthesis of glucopyranoside **37**. After purification by column chromatography of the tetraacetyl derivative, Zemplen deprotection gave the pyranosides **40**, **42** and **43** with a good yield.

Phenyl β -D-glucopyranoside (40): $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): $\delta = 3.23$ (dd, 1H, \underline{H}^4 , $J = 3.5, 1.5$ Hz), 3.31-3.40 (m, 4H, $\underline{H}^3 + \underline{H}^5 + \underline{H}^{6a} + \underline{H}^{6b}$), 3.62 (dd, , 1H, \underline{H}^2 , $J = 11.9, 4.5$ Hz), 3.81 (d, 1H, \underline{H}^1 , $J = 11.9$ Hz), 6.91 (t, , 1H, $\text{Ar}\underline{H}_{\text{para}}$, $J = 7.1$ Hz) 7.10 (d, , 2H, $\text{Ar}\underline{H}_{\text{ortho}}$, $J = 8.2$ Hz), 7.19 (t, , 2H, $\text{Ar}\underline{H}_{\text{meta}}$, $J = 7.6$ Hz).

Retention time = 5.04 min (Column: Thermo Betasil 4,6 mm 5u BS diol 100, eluent: $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$ 95:5, flow rate: 1 mL / min., RT and the UV wavelength was set to 276 nm).

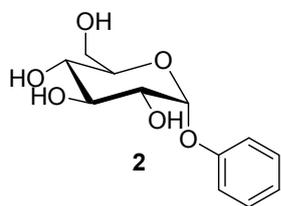
Phenyl β -D-galactopyranoside (42): $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz): $\delta = 3.56$ (dd, 1H, \underline{H}^3 $J = 9.8, 3.4$ Hz), 3.66 (ddd, 1H, \underline{H}^5 , $J = 7.3, 4.6, 1.0$ Hz), 3.71-3.78 (m, 2H, $\underline{H}^{6a} + \underline{H}^{6b}$), 3.78 (dd, 1H, \underline{H}^2 , $J = 9.8, 7.6$ Hz), 3.89 (dd, , 1H, \underline{H}^4 , $J = 3.4, 1.0$ Hz), 4.86 (d, 1H, \underline{H}^1 , $J = 7.6$ Hz), 6.99 (tt, 1H, $\text{Ar}\underline{H}^{\text{para}}$, $J = 7.1, 0.9$ Hz), 7.09 (dd, , 2H, $\text{Ar}\underline{H}^{\text{ortho}}$, $J = 8.5, 0.9$ Hz), 7.27 (dd, , 2H, $\text{Ar}\underline{H}^{\text{meta}}$, $J = 8.5, 7.1$ Hz).

Retention time = 5.50 min. (Column: Thermo Betasil 4,6 mm 5u BS diol 100, eluent: $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$ 95:5, flow rate: 1 mL / min., RT and the UV wavelength was set to 276 nm).

Phenyl α -D-idopyranoside (43): $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): $\delta = 3.71$ -3.82 (m, 6H, $\underline{H}^2 + \underline{H}^3 + \underline{H}^4 + \underline{H}^5 + \underline{H}^{6a} + \underline{H}^{6b}$), 5.44 (d, 1H, \underline{H}^1 , $J = 3.4$ Hz), 7.05-7.18 (m, 2H, $\text{Ar}\underline{H}$), 7.30-7.39 (m, 2H, $\text{Ar}\underline{H}$).

Retention time = 4.46 min. (Column: Thermo Betasil 4,6 mm 5u BS diol 100, eluent: $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$ 95:5, flow rate: 1 mL / min., RT and the UV wavelength was set to 276 nm).

Synthesis of phenyl α -D-glucopyranoside 41:



β -D-glucose pentaacetate (2 g, 5.1 mmol) was dissolved in dry dichloromethane (20 ml) together with phenol (0.96 g, 10.24 mmol) and boron trifluoride diethyl etherate (2.1 ml, 16.9 mmol) was added dropwise at 0°C . The reaction mixture was kept under stirring for 24 h at reflux and then quenched by addition of saturated NaHCO_3 solution (20 mL). The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 15 ml) and the combined organic layers were then washed with brine, dried, and evaporated under reduced pressure. Flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 8:2) of the crude reaction mixture yielded 1.2 g (57%) of phenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranoside. Zemplen deprotection¹²¹ of the obtained

tetraacetyl glucoside (0.5 g, 1.23 mmol) in the condition described before for compound **37**, gave 0.28 g of phenyl- α -D-glucopyranoside (94 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 3.45 (app. t, 1H, \underline{H}^4 , $J = 9.9$ Hz), 3.58 (dd, 1H, \underline{H}^2 , $J = 3.7, 9.8$ Hz), 3.66-3.77 (m, 3H, $\underline{H}^5 + \underline{H}^{6a} + \underline{H}^{6b}$), 3.88 (app. t, 1H, \underline{H}^3 , $J = 9.4$ Hz), 4.49 (d, 1H, \underline{H}^1 , $J = 3.7$ Hz), 7.01 (at, 1H, $\text{Ar}\underline{H}^{\text{para}}$, $J = 7.4$ Hz), 7.17 (d, 2H, $\text{Ar}\underline{H}^{\text{ortho}}$, $J = 7.7$ Hz), 7.29 (app.t, 2H, $\text{Ar}\underline{H}^{\text{meta}}$, $J = 8.0$ Hz).

Retention time = 5.63 min. (Column: Thermo Betasil 4,6 mm 5u BS diol 100, eluent: $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$ 95:5, flow rate: 1 mL / min., RT and the UV wavelength was set to 276 nm).

Preparation and characterisation of imprinted polymers

General procedure for the preparation of MIPs via miniemulsion polymerisation:

The following procedure relates to the preparation of the imprinted polymer IP_{T4} with the surfactant template **T4**. The polymerization of others templates **T1-T3** has been performed under the same conditions, with composition of the polymerization mixture indicated in Table 1:

The template **T4** (52 mg, 0.072 mmol), styrene (1.4 ml, 12.4 mmol), divinylbenzene (0.35 ml, 2.5 mmol), hexadecane (0.1 ml, 0.34 mmol), the radical initiator 2,2'-azo(2-methylbutyronitrile) (AMBN, 16 mg, 0.083 mmol), sodium dodecyl sulfate (SDS, 63 mg, 0.26 mmol) and water (8 ml) were stirred vigorously for 15 min at room temperature under an argon atmosphere. Miniemulsification was then obtained by sonication using a Bioblok Scientific Vibra-cell, Model 72412, 40% power, for 2 min at room temperature. The polymerization was carried out by heating the reaction mixture at 80°C for 20h. At the end of the reaction, the latex was divided into four parts and was diluted with acetone (15ml). The solid was separated by ultracentrifugation (Kontron Ultracentrifuge, Centrikon T-2060, rotor TST. 28-38), at 27000 tr/min (90000 x g) for a total time of 1h. The solid recovered (between 50-80% of the theoretical yield), is then washed 4 times with 15 ml of a mixture of water/acetone (1:1, v/v) and the solid was always recovered by ultracentrifugation. We note that the separation of the solid presents some difficulties and to recover approximately 50% of the theoretical yield, 2-3 cycles of ultracentrifugation are required after every wash. Then, the polymer was dried in vacuum overnight to afford polymer IP_{T4} before cleavage and extraction of template. The control polymer CP_{T4} was prepared by the same method by replacing the template **T4** by four equivalents of the surfactant monomer **27**, in order to have the same theoretical quantity of carboxylic acids at the surface of the polymer IP_{T4} .

Table 1. Composition of the polymerization mixture for the imprinted polymers IP_{T1-T3} .

Compounds	Percentage en masse (%)	Used quantities	Stoichiometric ratio of the monomers
Styrène		1.68 ml, 14.62 mmol	170
DVB	16.7	0.42 ml, 2.92 mmol	34
Template (T1-T3)		0.086 mmol	1
Hexadécane	0.72	0.11 ml, 0.34 mmol	
AMBN	0.16	19 mg, 0.087 mmol	
SDS	0.64	75 mg, 0.32 mmol	
H ₂ O	81.8	9.5 ml	

General procedure for the template extraction from the imprinted polymers:

For the extraction of the template **T2**, **T3**, **T4** and surfactant monomer **27**, 200 mg of the imprinted corresponding nanospheres were treated with 20 ml of a 1:1 (v/v) mixture of MeOH/ NaOH 5M at reflux for 3 days. The nanospheres suspension was then divided into two parts and diluted with 15 ml of mixture of water/MeOH (4:1 v/v). The solid was recovered by centrifugation (Jouan BR4i, Swing-out rotor S40) 4100 tr/min (3000 x g) for a total time of 30 min). This washing is repeated four times to make sure that all the template was extracted from the polymeric matrix. The polymer recovered in the last cycle, was then treated with a 20 ml of 2M aqueous solution of HCl under stirring for 5 min. After recuperation of the solid by centrifugation, the polymer was washed several times with water, dried overnight in vacuum and finally lyophilized, to give the corresponding imprinted polymer.

Procedure for the esterification of imprinted polymer IP_{T4}:

20 mg of **IP_{T4}** is suspended in a 1/1 (v/v) mixture of toluene/methanol. Then, at 0 °C trimethylsilyldiazomethane (110 µl, 2 eq. for COOH) was slowly added dropwise. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h and slowly heated to room temperature. Acetic acid (300 µl) was added and the mixture was centrifuged (Jouan BR4i, Swing-out rotor S40) 4100 tr/min (3000 x g) for a total time of 30 min. After several washings and centrifugation with a 1:1 mixture of water/acetonitrile, the polymer was recovered and dried under vacuum in order to obtain the **IP_E**.

Characterisation of the imprinted polymers

TEM microscopy:

The morphological characterization of the functionalized nanospheres was carried out with transmission electron microscopy (TEM) observation (Philips CM-120 microscope operating at 100 kV). The samples were deposited as a chloroform suspension (1 mg in 1 ml of chloroform) on a copper grid. After drying by removal of the organic phase, the examination was performed directly without prior any coloration.

BET measurements:

The specific surface area of the nanospheres was determined by gravimetric nitrogen gas adsorption measurements (BET method), using a Carlo Erba Sorpty 1750 instrument. For the BET measurements, the samples were first dried and degassed at 50°C, until constant mass prior analysis.

Light scattering measurements:

For the measurements of the average diameter of polymeric particles were measured by Zetasizer Malver instrument. or the particle size distribution, 1-2 mg of polymers was suspended in 1-2 ml of chloroform. The suspension was sonicated in water bath for good homogenization of the sample and the suspension was analyzed by Malvern instrument.

Binding experiments using the batch process and HPLC analysis:

The percentage of binding was measured by HPLC (Shimadzu LC 10 ADVP) using a Zorbax 300SB-C₁₈ column (5µm, 4.6 x 250 mm) for phosphorous analytes **1-4** (UV wavelength was set to 220 nm), and Thermo Betasil column (4,6 mm 5u BS diol 100) for the carbohydrates **40-43** (UV wavelength was set to 276 nm). For the measurements of the binding ability, 10 mg (or 5 mg in the case of imprinted polymers **IP_{T1-T3}**) of imprinted and control polymers was put in a small eppendorf centrifuge tube (1.5 ml). Then, 1 ml of acetonitrile solution at different concentrations of the corresponding analytes was added, at 20-22 °C and for the desired incubation time (24 or 5h in correspondence analysis). The particles are separated by centrifugation (Jouan BR4i, Angle rotor AB 1.14) 14000 tr/min (14000 x g) for a total time of 5 min. After separation, the acetonitrile solution is directly measured and quantified by HPLC. The concentration of the missing template in the acetonitrile solution compared to the initial concentration, is assigned as that portion being absorbed by the different imprinted and control polymers.

To measure the concentrations by HPLC, a series of calibration curve for each analyte was achieved. Each measurement was repeated three times, and the error is given by standard deviation (95% confidence limit). The reproducibility of binding experiments was performed by repeating the analysis with a minimum of two batches of polymer prepared independently.

Bibliographie

1. Alexander C., Andersson H.S., Andersson L.I., Ansell R.J., Kirsch N., Nicholls I.A., Whitcombe M.J., *J. Mol. Recogn.*, **2006**, *19*, 106-180.
2. Polyakov M.V., *Zhur. Khim.*, **1931**, *2*, 799-805.
3. a) Sellergren B., *Chiral Separation Technique*, 2nd edition, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**, 153-184; b) Shim Y.-H., Yilmaz E., Lavielle S., Haupt K., *Analyst* **2004**, *129*, 1211-1215.
4. a) Claude B., Morin P., Lafosse M., Belmont A.-S., Haupt K., *Talanta* **2008**, *75*, 344-350; b) Pichon V., Haupt K., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Techn.*, **2006**, *29*, 989-1023; c) Andersson L.I., Schweitz L., *Handb. Anal. Sep.*, **2003**, *4*, 45-71; d) Lanza F., Sellergren B., *Adv. Chromatogr.*, **2001**, *41*, 137-173.
5. Haupt K., Mosbach K., *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 2495-2504.
6. Whitcombe M.J., Alexander C., Vulfson E.N., *Trends Food Sci. Technol.*, **1997**, *8*, 140-145.
7. Sellergren B., Allender C. J., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, *57*, 1733-1741.
8. Wulff G., Dederichs R., Grotstollen R., Jupe C., *Affinity Chrom. and Related Techniques*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, **1982**, 207-216.
9. Wulff G., *Pure Appl. Chem.*, **1982**, *54*, 2093-2102.
10. Wulff G., Vietmeier J., *Makromol. Chem.*, **1989**, *190*, 1727.
11. Shea K.J., Dougherty T.K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 1091.
12. Shea K.J., Sasaki D.Y., Stoddard G.J., *Macromolecules*, **1989**, *22*, 1722.
13. Wulff G., Sarhan A., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1972**, *11*, 341.
14. Wulff G., Schauhoff S., *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 395-400.
15. Kugiyama A., Matsui J., Takeuchi T., Yano K., Muguruma H., Eigersma A.V., Karube I., *Anal. Lett.*, **1995**, *28*, 2317.
16. Wulff G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1995**, *34*, 1812-1832.
17. Shea K.J., *Trends Polym. Sci.*, **1994**, *2*, 166-173.
18. Mosbach K., *Trends Biochem. Sci.*, **1994**, *19*, 9-14.
19. Gallego-Gallegos M., Munõz-Olivas R., Camara C., Mancheno M.J., Sierra M.A., *Analyst*, **2006**, *131*, 98-105.
20. Arshady R., Mosbach K., *Macromol. Chem. Phys.*, **1981**, *182*, 687-692.

21. Ramström O., Nicholls I.A., Mosbach K., *Tetrahedron:Asymmetry*, **1994**, *5*, 649–656.
22. a) Svenson J., Andersson H.S., Piletsky S.A., *J. Mol. Recognit.*, **1998**, *11*, 83-86; b) Andersson H.S., Nicholls I.A., *Bioorganic Chemistry* **1997**, *25*, 203-211.
23. Karlsson J.G., Andersson H.S., Karlsson B., Nicholls I.A., *Analyst* **2004**, *129*, 456-462.
24. Osmani Q., Hughes H., Flavin K., Hedin-Dahlstrom J., Allender C.J., Frisby J., McLoughlin P., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *39*, 1229-1236.
25. Hsu C.Y., Lin H.Y., Thomes J.L., Chou T.C., *Nanotechnology* **2006**, *17*, S77-S83.
26. a) Mayes A.G., Whitcombe M.J., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2005**, *57*, 1742–1778; b) Kirsch N., Whitcomb M.J., in *Molecularly Imprinted Materials*, Eds: Marcel Dekker, New York, USA **2005**, 93-122; c) Yilmaz E., Haupt K., Mosbach K., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 2115-2118.
27. a) Sellergren B., Shea K.J., *J. Chromatogr. A* **1995**, *690*, 29-39; b) Umpleby I.I., Baxter S.C., Rampey A.M., Rushton G.T., Chen Y., Shimizu K.D., *J. Chromatogr. B* **2004**, *804*, 141-149.
28. Wulff G., Knorr K., *Bioseparation* **2002**, *10*, 257–276.
29. Wulff G., Schönfeld R., *Adv. Mater.*, **1998**, *10*, 957–959.
30. a) Kim J.M., Ahn K.D., Wulff G., *Macromol. Chem. Phys.*, **2001**, *202*, 1105–1108; b) Emgenbroich M., Wulff G., *Chem. Eur. J.*, **2003**, *9*, 4106–4117.
31. Umpleby R.J., Bode M., Shimizu K.D., *Analyst*, **2000**, *125*, 1261-1265.
32. Sellergren B., Andersson L., *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 3381-3383.
33. Whitcombe M.J., Rodriguez M.E., Villar P., Vulfson E.N., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 7105-7111.
34. Cheong S.H., McNiven S., Rachkov A.E., Levi R., Yano K., Karube I., *Macromolecules*, **1997**, *30*, 1317–1322.
35. Byström S.E., Börje A., Akermark B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 2081–2083.
36. Batra D., Shea K.J., *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 3895-3898.
37. Hancock R.D., Martell A.E., *Chem. Rev.*, **1989**, *89*, 1875-1914
38. Fujii Y., Matsutani K., Kikuchi K., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1985**, 415.
39. Dhal P.K., Arnold F.H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 7417-7418.
40. Shnek D.R., Pack D.W., Sasaki D.Y., Arnold F.H., *Langmuir*, **1994**, *10*, 2382-2388.

41. Plunkett S.D., Arnold F.H., *J. Chromatogr. A*, **1995**, 708, 19-29.
42. Chen G.H., Guan Z.B., Chen C.T., Fu L.T., Sundaresan V., Arnold F.H., *Nat. Biotechnol.*, **1997**, 15, 354-357.
43. Striegler S., *Tetrahedron*, **2001**, 57, 2349-2354.
44. Striegler S., Dittel M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 11518-11524.
45. Yan M., Ramström O., in *Molecularly Imprinted Materials*, Eds: Marcel Dekker, New York, USA **2005**, 123-180.
46. For examples see: a) Matsui J., Nicholls I.A., Karube I., Mosbach K., *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 5414-5417. b) Brunkan N.M., Gagné M.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 6217-6225. c) Gamez P., Dunjic B., Pinel C., Lemaire M., *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 8779-8782.
47. Wulff G., Kemmerer R., Vietmeier J., Poll H.G., *Nouv. J. Chim.*, **1982**, 6, 681-687.
48. Sellergren B., *Makromol. Chem.*, **1989**, 190, 2703-2711.
49. Guyot A., *Synthesis and Separations Using Functional Polymers*. D.C. Sherrington, P. Hodge (Eds.), John Wiley & Sons, New York, **1989**, pp. 1-36.
50. a) Schmidt R.H., Belmont A.-S., Haupt K., *Anal. Chim. Acta* **2005**, 542, 118-124; b) Lloyd L., *J. Chromatogr.*, **1991**, 544, 201.
51. Sellergren B., Shea K.J., *J. Chromatogr. A* **1993**, 635, 31-49.
52. Yoshizako K., Hosoya K., Iwakoshi Y., Kimata K., Tanaka N., *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 386-389.
53. O'Shannessy D.J., Ekberg B., Mosbach K., *Anal. Biochem.*, **1989**, 177, 144.
54. Kempe M., Mosbach K., *Anal. Lett.*, **1991**, 24, 1137-1145.
55. Brüggemann O., Haupt K., Ye L., Yilmaz E., Mosbach K., *J. Chromatogr. A*, **2000**, 889, 15-24.
56. Tovar G., Kräuter I., Gruber C., *Topics in Current Chemistry - Colloid Chemistry II*, **2003**, 125-144.
57. Mayes A.G., Mosbach K., *Anal. Chem.*, **1996**, 63, 769.
58. Hosoya K., Iwakoski Y., Yoshizako K., Kimata K., Tanaka N., *J. High Resolution Chromatogr.*, **1999**, 22, 256.
59. Ansell R.J., Mosbach K., *J. Chromatogr. A*, **1997**, 787, 55-66.
60. Ye L., Mosbach K., *Anal. Commun.*, **1999**, 36, 35.

61. Ye L., Mosbach K., *Reac. Func Polym.*, **2001**, *48*, 149.
62. Smith W.V., Ewart R.H., *J. Chem. Phys.*, **1948**, *16*, 592.
63. Hawkins W.D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1947**, *69*, 1428.
64. Pérez N., Whitcombe M.J., Vulfson E.N., *J. Appl. Polym. Sci.*, **2000**, *77*, 1851–1859.
65. Pérez N., Whitcombe M.J., Vulfson E.N., *Macromolecules* **2001**, *34*, 830-836.
66. Carter S.R., Rimmer S., *Adv. Mater.*, **2002**, *14*, 667.
67. a) Landfester K., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 2-22; b) Landfester K., *Annual Review of Materials Research*, **2006**, *36*, 231-279.
68. a) Landfester K., *Macromol. Rapid. Commun.*, **2001**, *22*, 896-936; b) Sudol E.D., El-Aasser M.S., in: *Emulsion Polymerization and Emulsion Polymers*, Eds: John Wiley & Sons Ltd., Chichester **1997**, 699-722.
69. Landfester K., Bechthold N., Tiarks F., Antonietti M., *Macromolecules*, **1999**, *32*, 5222-5228.
70. a) Weber A., Dettling M., Brunner H., Tovar G., *Macromol. Rapid Commun.*, **2002**, *23*, 824; b) Vaihinger D., Landfester K., Kräuter I., Brunner H., Tovar G., *Macromol. Chem. Phys.*, **2002**, *203*, 1965–1973.
71. Tan C.J., Wangrangsimakul S., Bai R., Tong Y.W., *Chem. Mater.*, **2008**, *20*, 118–127.
72. Wulff G., Grobe-Einsler R., Vesper W., Sarhan A., *Macromol. Chem.*, **1977**, *178*, 2817-2825.
73. Umpleby II R.J., Baxter S.C., Bode M., Berch J.K., Shah R.N., Shimizu K.D., *Anal. Chim. Acta*, **2001**, *435*, 35-42.
74. Sajonz P., Kele M., Zhong G., Sellergren B., Guiochon G., *J. Chromatogr. A*, **1998**, *810*, 1-17.
75. Spivak A.D., in *Molecularly Imprinted Materials*, Eds: Marcel Dekker, New York, USA **2005**, 395-417.
76. Striegler S., Dittel M., *Anal. Chim. Acta*, **2003**, *484*, 53-62.
77. a) Shimizu K.D., in *Molecularly Imprinted Materials*, Eds: Marcel Dekker, New York, USA **2005**, 419-434; b) Spivak D.A., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2005**, *57*, 1779–1794.
78. Lehn J.-M., in *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, VCH: New York, **1995**.
79. a) Kugimiya A., Takei H., *Anal. Chim. Acta* **2008**, *606*, 252-256; b) Kugimiya A., Takei H., *Anal. Chim. Acta* **2006**, *564*, 179-183.

80. a) Robinson D.K., Mosbach K., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 969–970; b) Sellergreen B., Shea K.J., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, 5, 1403-1406; c) Sellergreen B., Karmalkar R.N., Shea K.J., *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 4009-4027.
81. Heilmann J., Maier W.F., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1994**, 33, 471-473.
82. Wulff G., Gross T., Schönfeld R., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1997**, 36, 1962-1964.
83. Strikovskiy A.G., Kasper D., Grün M., Green B.S., Hradil J., Wulff G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 6295-6296.
84. Wulff G., Chong B.-O., Kolb U., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 2955–2958.
85. Hammond A.E., *Science* **1971**, 172, 361–364.
86. Kuroda A., Takiguchi N., Gotanda T., Nomura K., J. Kato, Ikeda T., Ohtake H., *Biotechnol. Bioeng.*, **2002**, 78, 333-338. b) Takiguchi N., Kuroda A., Kato J., Nakanobu K., Ohtake H., *J. Biosci. Bioeng.*, **2004**, 97, 365-368.
87. a) Nishizawa S., Shigemori K., Teramae N., *Chem. Lett.*, **1999**, 11, 1185; b) Aoki H., Hasegawa K., Tohda K., Umezawa Y., *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, 18, 261; c) Kumamoto K., Misawa Y., Tokita S., Kubo Y., Kotsuki H., *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 1035.
88. Hall A.J., Lanza-Sellergren F., Manesiotis P., Sellergren B., *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 538, 9-14.
89. Wu X., Goswami K., Shimizu K.D., *J. Mol. Recognit.*, **2008**, 21, 410-418.
90. a) Michaelis A., Kaehne R., *Chem. Ber.*, **1898**, 31, 1048; b) Arbuzov A.E., *J. Russ. Phys. Chem. Soc.*, **1906**, 38, 687.
91. Mark V., *Mech. Mol. Migr.*, **1969**, 2, 319.
92. Han L.-B., Zhao C.-Q., *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 10121-10123.
93. Yang Y., Coward J.K., *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 5748-5758.
94. Klein J.U., Whitcombe M.J., Mulholland F., Vulfson E.N., *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **1999**, 38, 2057-2060.
95. Odian G., *Principles of Polymerization*, 3rd edition, Wiley-VCH, New York, **1991**, 259-266.
96. Zimmerman S.C., Wendland M.S., Rakow N.A., Zharov I., Suslick K.S., *Nature*, **2002**, 418, 399-403.
97. Pasteur L., *Compt. Rend. Acad.Sci*, **1858**, 46, 15.

98. Nasipuri D., *Stereochemistry of Organic Compounds: Principles and Applications*, 2nd edition, South Asia Books, **1994**.
99. Miller M.T., Strömmland K., *Teratology*, **1999**, *60*, 306.
100. Stinson S.C., *Chem. Eng. News*, **2001**, October 1, 79.
101. a) Knowles W.S., *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, *345*, 3-13; b) Noyori R., *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, *345*, 15-32.
102. For recent general reviews see: a) Baiker A., Blaser H.U., In *Handbook of Heterogeneous Catalysis*; Ertl G., Knözinger H., Weitkamp J., Eds., VCH: Weinheim, **1997**, Vol. 5, 2422; b) Mallat T., Baiker A., In *Fine Chemicals through Heterogeneous Catalysis*; Sheldon R.A., Van Bekkum H., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, **2001**, 449; c) Studer M., Blaser H.U., Exner C., *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, *345*, 45-54; d) BaGhosh A., Kumar R., *Journal of Catalysis*, **2004**, *228*, 386-396; e) Murzin D.Y., Maki-Arvela P., Toukoniitty E., Salmi T., *Catal. Rev. - Sci. Eng.*, **2005**, *47*, 175-256.
103. Mallat T., Orglmeister E., Baiker A., *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 4863-4890.
104. Wulff G., *Chemical Reviews*, **2002**, *1*, 1-27.
105. a) Lerner R.A., Benkovic S.J., Schulz P.G., *Science*, **1991**, *252*, 659-667; b) Schultz P.G., *Angew Chem.*, **1989**, *101*, 1336-1348; *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **1989**, *28*, 1283-1295; c) Jencks W.P., in: *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, Dover publications: New York **1987**.
106. Locatelli F., Gamez P., Lemaire M., *J. Mol. Catal.*, **1998**, *135*, 89-98.
107. a) Polborn K., Severin K., *Chem. Commun.*, **1999**, 2481-2482; b) Polborn K., Severin K., *Chem. Eur. J.*, **2000**, *6*, 4604-4611; c) Severin K., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, *4*, 710-714.
108. Polborn K., Severin K., *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2000**, *8*, 1687-1692.
109. Benabra A., Alcudia A., Khair N., Fernández I., Alcudia F., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, *7*, 3353-3356.
110. a) Davis A.P., Wareham R.S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 2978-2996; b) Sharon N., Lis H., *Chem. Br.*, **1990**, *26*, 679; b) Hakomori S., *Pure Appl. Chem.*, **1991**, *63*, 473; c) Rosen S.D., Bertozzi C.R., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1994**, *6*, 663; d) Sharon N., Lis H., *Essays Biochem.*, **1995**, *30*, 59; e) Lee Y.C., Lee R.T., *Acc. Chem. Res.*, **1995**, *28*, 321; f) Dwek R.A., *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 683.
111. a) Quijoch F.A., *Pure. Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1293-1306; b) Vyas N.K., Vyas, M.N., Quijoch F.A., *Science* **1988**, *242*, 1290-1295; c) Weiss W.I., Drickamer K., *Annu. Rev.*

- Biochem.* **1996**, *65*, 441-473; d) Lemieux R.U., *Chem. Soc. Rev.*, **1989**, *18*, 347-374; e) Lis H., Sharon N., *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 637-674.
112. Yarema K.J., Bertozzi C.R., *Genome Biol.*, **2001**, *2*, 1-10.
113. For some recent examples of artificial carbohydrate receptors see: a) Klein E., Crump M.P., Davis A.P., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 298-302; b) Mazik M., Cavga H., Jones P.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 9045-9052; c) Mazik M., Radunz W., Boese R., *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7448-7462; d) Vacca A., Nativi C., Cacciarini M., Pergoli R., Roelens S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 16456-16464.
114. Mayes A.G., Andersson L.I., Mosbach K., *Anal. Biochem.*, **1994**, *222*, 483-488.
115. Nilsson K.G.I., Sakaguchi K., Gemeiner P., Mosbach K., *J. Chromatogr. A*, **1995**, *707*, 199-203.
116. Sineriz F., Ikeda Y., Petit E., Bultel L., Haupt K., Kovensky J., Papy-Garcia D., *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1857-1862.
117. Lee J., Greene N.T., Rushton G.T., Shimizu K.D., Hong J., *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 963-966.
118. Okutucu B., Onal S., Telefoncu A., *Talanta* **2009**, *78*, 1190.
119. a) Parmpi P., Kofinas P., *Biomaterials* **2004**, *25*, 1969-1973; b) Fazal F.M., Hansen D.E., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 235-238; c) Singh B., Chauhan N., *Journal of Macromolecular Science, Part A* **2008**, *45*, 776-784.
120. Osborn H.M.I., Harwood L.M., in *Carbohydrates: Best synthetic methods*; Osborn H.M.I., Edt.; Academic Press, **2003**, 75-76.
121. Zemplén G., Pascu E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1929**; *62*, 1613-1618.
122. Shimizu K.D., in *Molecularly Imprinted Materials*, Eds: Marcel Dekker, New York, USA, **2005**, 329-345.
123. Wulff G., *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 1-27.